UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Ana Cristina De Sanctis Girardi

Transtornos do espectro autista em pacientes com a pré-
mutação do gene *FMR1*

Autism spectrum disorders in patients with premutation in
FMR1 gene

São Paulo
2017

Ana Cristina De Sanctis Girardi

Transtornos do espectro autista em pacientes com a pré-
mutação do gene *FMR1*

Autism spectrum disorders in patients with premutation in
FMR1 gene

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de mestre em
ciências na área de concentração
aconselhamento genético e genômica
humana

Orientadora: Prof.a Dra. Maria Rita dos
Santos e Passos-Bueno

São Paulo
2017

Girardi, Ana Cristina De Sanctis
Transtornos do espectro autista em pacientes
portadores da pré-mutação no gene FMR1 / Ana Cristina De
Sanctis Girardi; orientadora Maria Rita dos Santos
Passos-Bueno. -- São Paulo, 2017.

54 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Versão original

1. transtorno do espectro autista. 2. *FMR1*. 3. pré mutação. 4.
autismo. I. Passos-Bueno, Maria Rita dos Santos, orient. II. Título.

Folha de Avaliação

Nome: Giradi, Ana Cristina De Sanctis

Título: Transtornos do espectro autista em pacientes com a pré-mutação do gene *FMR1*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em ciências na área de concentração aconselhamento genético e genômica humana

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

À professora Dra. Maria Rita dos Santos e Passsos-Bueno pela orientação, pelas discussões, pelos ensinamentos dessa questão complexa que é o aconselhamento genético em TEA e pelo estímulo em continuar nessa área

À professora Dra. Regina Célia Mingrone-Netto pelas sugestões e discussões

A todos os profissionais que acompanhei nos ambulatórios do CGH-CEL, Dra Célia Priskulnik Koiffman, Dra. Débora Romeo Bertola, Dra Rita de Cássia Mingroni Pavanello e Dra. Regina Célia Mingrone-Netto

À professora Dra. Angela Maria Vianna-Morgante um agradecimento especial pelos dados sobre as famílias de afetados com síndrome do X frágil, pelas sugestões e pela experiência interessante que foi acompanhá-la no aconselhamento genético das famílias de afetados pela síndrome

Aos colegas do laboratório 200 especialmente as companheiras do atendimento de TEA, Eduarda Morgana, Elisa Varella, Danielle Moreira e Claudia Costa. À Claudia também um agradecimento especial pelos exames de array CGH nos pacientes

Às técnicas Sílvia Costa e Vanessa Takahashi pelos testes da síndrome do X frágil

À Maraísa Sebastião pela ajuda nos arquivos antigos de FRAX

Às minhas muito queridas amigas Luciana Piva e Mel pela revisão do abstract

Aos meus pais pelo apoio constante

Aos meus filhos queridos João Pedro e Ana Clara por fazer tudo valer a pena

Ao Fernando, meu amor para a vida toda, por todas as formas de apoio e estímulo sem os quais não teria feito esse trabalho

Lista de Figuras

Figura 1- Heredograma representando a família do paciente 1 (F02269-1)

Figura 2- Heredograma representando a família do paciente 2 (F10687-1)

Lista de Tabelas

Tabela 1- Frequência de alelos expandidos do gene *FMR1* na população em geral em diversos trabalhos.

Tabela 2. Pesquisas relacionando a ocorrência de TEA em indivíduos portadores da pré-mutação do gene *FMR1*

Tabela 3: Proporção de pacientes com TEA que apresentam expansões no gene *FMR1*.

Tabela 4: Características dos pacientes do Laboratório de Genética Humana IB-USP com a pré-mutação no gene *FMR1*

Siglas e abreviações

a CGH *Microarray-based comparative genomic hybridization*

ADI-R *Autism Diagnostic Interview- Revised*

ADOS-G *Autism Diagnostic Observation Scale- Generic*

ACMG *American College of Medical Genetics*

ACOG *American Congress of Obstetricians and Gynecologists*

AQ *Autism Spectrum Quotient*

CARS *Childhood Autism Rating Scale* / Escala de Classificação de Autismo na Infância

CEGH-CEL Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco

CGH- *Comparative Genomic Hybridization*

CNV *Copy Number Variations*

DSM Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

IB-USP Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

FMR1 Fragile X Mental Retardation 1

FMRP *Fragile X Mental Retardation Protein*

FXPOI Insuficiência ovariana prematura associada ao X frágil

FXTAS Síndrome do tremor/ataxia associada ao X frágil

GABA Ácido gama aminobutírico

mRNP *messenger ribonucleoprotein*

mTOR *mammalian target of rapamycin*

mGLU Receptor metabotrópico de glutamato

NGS *Next Generation Sequencing*

PCR Reação em cadeia da polimerase

QI Quociente de inteligência

RNA Ácido ribonucléico

RNAm RNA mensageiro

SNV *Single nucleotide variants*

SXF Síndrome do X frágil

TEA Transtorno do Espectro Autista

UTR Regiões não traduzidas

Lista de Anexos

ANEXO A – PROTOCOLOS PARA TESTE DA SÍNDROME DO X FRÁGIL

Resumo:

Os transtornos do espectro autista (TEA) são caracterizados por dificuldades na interação social e na comunicação, interesses restritos e comportamentos estereotipados. Trata-se de doença complexa, podendo estar relacionada a fatores ambientais, genéticos ou a ambos. A heterogeneidade genética dos TEA pode ser explicada pela presença de variantes raras patogênicas únicas (modelo monogênico) bem como pela combinação de alelos raros (modelo oligogênico) ou ainda pela combinação de alelos comuns de baixo risco (poligênicos). Há um esforço mundial na tentativa de se identificar variantes que conferem risco e, nos últimos anos, a identificação de variantes raras tem sido mais bem sucedida. As estimativas indicam que 10% dos indivíduos dentro do espectro do autismo possuem uma síndrome de padrão de herança mendeliana dentre elas a síndrome do cromossomo X frágil cujo mecanismo molecular se explica pela mutação completa no gene *FMR1*. A partir dos anos 2000 aproximadamente, alguns trabalhos na literatura sugeriram que a pré-mutação do gene *FMR1*, associada à síndrome do tremor e ataxia e a insuficiência ovariana primária associada ao X frágil (FXTAS e FXPOI), pudesse estar relacionada ao TEA. Essa ligação, no entanto é incerta, sendo por isso, o foco deste trabalho. Para tanto, foi realizada uma revisão bibliográfica buscando dados na literatura que comparassem pacientes portadores da pré-mutação com controles quanto à manifestação dos TEA. Foi levantada a frequência de portadores da pré-mutação no gene *FMR1* entre 1056 probandos do grupo de pesquisas em transtornos do espectro autista do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco. Nesses pacientes foram também realizados exames complementares. Efetuou-se também um levantamento de eventuais casos de TEA entre os portadores da pré-mutação em outra casuística, composta de famílias de afetados pela síndrome do X frágil, no laboratório de genética humana do Departamento de Biologia Evolutiva - Instituto de Biociências - USP. O primeiro levantamento revelou uma frequência de 0.19% de pré-mutados na casuística

composta por pacientes com TEA (2:1055), semelhante à da população em geral. O segundo levantamento não revelou nenhum paciente com TEA entre os pré-mutados. Além disso, os dois pacientes pré-mutados na primeira casuística são portadores de uma CNV patogênica. Este estudo não apóia, portanto, uma relação causal entre TEA e a pré-mutação do gene *FMR1*.

Palavras-chave: transtorno do espectro autista, *FMR1*, pré mutação, autismo

Abstract:

Autism spectrum disorders (ASDs) are characterized by impairments in social interaction and communication as well as restricted interests and stereotyped behaviors. ASD is a complex disease that may be related to environmental factors, genetic factors or both. Genetic heterogeneity in ASD may be explained by rare pathogenic variants (monogenic model), by a combination of rare alleles (oligogenic model) or by other combinations of low-impact common alleles (polygenic model). Researchers are working to identify risk variants and have been more successful in finding rare variants in recent years. Monogenic disorders (Mendelian disorders), such as fragile X syndrome, are found in 10% of ASD patients. Fragile X syndrome is caused by full mutation in the *FMR1* gene and account for a fraction of ASD cases. *FMR1* premutation is related to two different conditions: fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FRAXTAS) and fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). In the last two decades some researchers have associated premutation with behavior problems. However the association between premutation and ASD remains unclear and thus it was the focus of this investigation. This study includes an extensive review of articles that compare ASD manifestations in premutation carriers and controls. The study also estimated the premutation frequency in 1056 male patients from the ASD cohort at the Human Genome and Stem Cell Research Center. Complementary tests were performed on these patients to rule out any other genetic alterations that could explain clinical presentations of ASD. Moreover, a survey was performed of possible ASD cases among premutation males from fragile X families in the database of the Human Genetics Laboratory at the Biology Department of the Biosciences Institute. A frequency of 0.19% of premutation carriers was detected in the sample of ASD patients(2:1055), which is similar to the general population. No ASD patients were detected among the premutated males. Furthermore the two pre-mutated patients in the first sample harbored a pathogenic CNV. Therefore this study do not support an association between the *FMR1* premutation and ASD.

Keywords: autism spectrum disorders, *FMR1*, premutation, autism.

ÍNDICE

1. Introdução:	1
1.1. Transtornos do espectro autista	1
1.2 O gene <i>FMR1</i>	9
1.2.1 A síndrome do X frágil	9
1.2.2 As expansões do gene <i>FMR1</i>	11
1.2.3 Os testes diagnósticos para detectar alelos expandidos do gene <i>FMR1</i>	12
1.2.4 O gene <i>FMR1</i> e a função da proteína FMRP	14
1.2.5 A pré-mutação do gene <i>FMR1</i>	15
1.2.5.1 A frequência da pré-mutação na população	15
1.2.5.2 Quadros clínicos associados à pré-mutação: insuficiência ovariana e síndrome do tremor e ataxia associada ao X frágil	17
1.2.5.3 Outras possíveis condições associadas à pré-mutação – Transtornos psicológicos	19
1.2.5.4 Outras possíveis condições associadas à pré-mutação - TEA	21
2. Objetivos	29
3. Material e métodos:	30
3.1 Casuística:	30
3.2 Etapas da pesquisa:	31
3.3 Métodos laboratoriais:	32
3.3.1 Análise da região 5' UTR do gene <i>FMR1</i> :	32
3.3.2 Outros testes moleculares:	32
4. Resultados:	33
4.1 Casuística 1 – Pacientes encaminhados ao grupo de	33
4.1.1 Análise das expansões do gene <i>FMR1</i>	33
4.1.2 Testes genéticos complementares em pacientes com pré-mutação	33
4.2 Casuística 2 - Indivíduos do sexo masculino testados no do laboratório de genética humana do Departamento de Biologia Evolutiva do I B - USP	38
4.2.1 Análise das expansões do gene <i>FMR1</i>	38

5. Discussão	39
5.1 Análise de expansões no gene <i>FMR1</i> na casuística do CEGH-CEL –	39
grupo de.....	39
5.2 Análise da relação de indivíduos afetados por TEA na casuística do laboratório de genética humana do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências - USP	41
6. Conclusões:.....	42
7. Referências bibliográficas.....	43

1. Introdução:

1.1. Transtornos do espectro autista

Os transtornos do espectro autista (TEA) constituem um conjunto de condições complexas que afetam o neurodesenvolvimento, caracterizadas por dificuldades na interação social, na comunicação verbal e não-verbal, interesses restritos e comportamentos estereotipados. Para que um indivíduo venha a ser diagnosticado como pertencente ao espectro autista, os sintomas têm que estar presentes desde a infância, mas podem não ser observados até que as demandas sociais excedam os limites da capacidade do indivíduo (Brunoni et al. 2014).

O termo autismo foi utilizado pela primeira vez por Kanner em 1943 para descrever um grupo de pacientes que apresentavam dificuldades de relacionamento, falta de interesse em seus pares, grande resistência a mudanças no ambiente bem como padrões de comportamento atípicos e sem propósito aparente (Volkmar et al. 2014). O desenvolvimento da linguagem, quando ocorria, apresentava particularidades como tendência a interpretar os significados literalmente e ecolalia. Em 1944 Hans Asperger publicou seu trabalho descrevendo o que ele denominou de “psicopatia autística” descrevendo também um grupo de pacientes que apresentavam dificuldades na comunicação não verbal e habilidades sociais (*apud* Masi et al. 2017). Sendo assim, desde as observações iniciais realizadas por Kanner e Asperger até o presente há um intenso debate a respeito do diagnóstico, dos subtipos e da etiologia relacionada ao que conhecemos hoje como transtornos do espectro autista (TEA). Em uma revisão histórica sobre o diagnóstico e caracterização dos TEA Masi et al. (2016) discutiram a evolução do conceito de autismo desde o trabalho de Kanner e Asperger na década de 1940 passando pelas edições III IV e V do Manual diagnóstico e estatístico de desordens mentais. Embora o conceito tenha passado por modificações desde os primeiros trabalhos até o presente, os sintomas centrais que definem a condição permanecem os mesmos.

Os TEA podem ser definidos por um padrão de sintomas múltiplos que podem ser classificados em duas grandes categorias: os sintomas principais e secundários.

Os sintomas principais se resumem no prejuízo nas habilidades de linguagem e de interação social, bem como presença de comportamento repetitivo e estereotipado (Fakoury, 2015). Dessa forma, indivíduos dentro do espectro autista têm uma tendência a respostas inapropriadas durante a conversação e não possuem habilidade para construir relacionamentos. Frequentemente esses indivíduos se envolvem em rotinas incomuns e desenvolvem obsessões relacionadas a itens específicos (American Psychiatric Association, 2013).

Os sintomas secundários incluem complicações como auto-agressão, hiperatividade e agressividade. Esses sintomas podem variar conforme a idade do paciente. Assim, muitos indivíduos apresentam déficits de linguagem e hiperatividade durante a primeira infância e problemas de relacionamento e variação de humor durante a adolescência (Nazeer e Ghaziuddin, 2012).

A gravidade do quadro clínico, de acordo com o DSM V, é baseada no nível de suporte necessário requerido pelo paciente frente às suas limitações na comunicação social e padrões restritivos de comportamentos interesses e atividades (American Psychiatric Association, *op. cit.*).

A etiologia, o fenótipo e o prognóstico são muito variáveis nos TEA. Dessa forma, alterações no sistema nervoso central em crianças autistas podem ocorrer em diferentes níveis. Estudos utilizando métodos de imagem cerebral, como ressonâncias magnéticas funcional revelaram padrões de hiper e hipoativação de áreas envolvidas na percepção social bem como outros padrões de ativação anômalos relacionados com a comunicação comportamentos repetitivos e outros (Zilbovicius et al. 2006; Dichter, 2012, Kana et al. 2014). Outros estudos sugerem que o cérebro dos autistas é caracterizado por anomalias morfológicas como crescimento exagerado nos primeiros meses de vida envolvendo, sobretudo, estruturas como o córtex frontal, amígdala e cerebelo. (Fakhoury, 2015). Alguns estudos sugerem que crianças diagnosticadas com TEA apresentam menor perímetro cefálico ao nascimento, comparadas aos controles e que durante os dois

primeiros anos o perímetro cefálico tende a aumentar superando os controles (Courchesne et al, 2003; Mraz et al. 2007).

As alterações de comportamento podem ser acompanhadas de outros quadros clínicos que coexistem com os transtornos do espectro autista. A literatura aponta como comorbidades epilepsia, deficiência intelectual, hipotonia, distúrbios gastrointestinais, alterações de peso (tanto sobrepeso quanto baixo peso), distúrbios do sono bem como comorbidades psiquiátricas – transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade entre outros (Moreira et al, 2014; Jones et al, 2016; Kleijer et al. 2017). Além dos citados um traço bem comum nos TEA é uma resposta anormal aos estímulos sensoriais que ocorre de forma exagerada ou pobre (Huguet et al. 2013).

O autismo pode ser estudado como uma variável discreta (afetado *versus* não afetado) ou como o extremo de um *continuum* de traços autísticos que podem estar presentes tanto em casos clínicos quanto na população em geral. Estudos demonstraram que familiares de indivíduos com TEA podem exibir traços subclínicos relacionados aos domínios centrais do transtorno, isto é déficit na comunicação social e interesses restritos e comportamento repetitivo, especialmente em famílias com mais de um afetado (Constantino et al. 2011). Constantino et al. (2010) averiguando a recorrência de TEA em irmãos de afetados, em 1235 famílias concluiu que 10% eram clinicamente afetados no entanto 16% eram crianças não diagnosticadas que apresentavam déficits na comunicação social. Este tipo de abordagem permite a identificação de componentes fenotípicos, os endofenótipos, isto é características relacionadas aos TEA herdáveis que podem ser estudados de maneira quantitativa e independente em indivíduos afetados, membros da família ou na população geral, abrindo a possibilidade de relacioná-los a fatores genéticos, biológicos ou psicológicos. Os endofenótipos estudados em TEA tem sido, por exemplo, perímetro cefálico na infância, respostas cerebrais a estímulos visuais ou auditivos, disfunções sensoriais bem como déficits neuropsicológicos ou endofenótipos relacionados à linguagem como anormalidades na compreensão de

sentenças ou nos marcos de desenvolvimento de linguagem (Constantino et al. 2011).

Os estudos epidemiológicos aparentemente indicam um aumento na prevalência dos TEA. Uma revisão de estudos realizados no Reino Unido, Japão, Estados Unidos e Escandinávia entre 1996 e 2001 indicou frequência de 30 a 60 casos por 10.000 (Rutter 2005). Recentemente, uma estimativa nos Estados Unidos apontou uma frequência de 1 para 68. Esse aparente aumento de prevalência, no entanto, pode refletir uma mudança no critério diagnóstico de TEA, englobando os quadros mais brandos sub-clínicos, por exemplo, bem como diferenças de metodologias nas pesquisas (Masi et al, 2017). Os únicos dados sobre a frequência de TEA na população brasileira são provenientes de um estudo realizado no município de Atibaia em uma amostra de 1400 crianças. A prevalência estimada foi de 27,2/10.000 (0,3%). Este valor é inferior ao encontrado para a população mundial o que pode ser explicada pelo pequeno tamanho da amostra, pouca conscientização dos profissionais de saúde sobre o tema e erro no diagnóstico (Paula et al. 2011).

Marcadores biológicos não estão disponíveis e o diagnóstico é comumente clínico, sendo realizado a partir de observação comportamental. Para tanto, são utilizados diversos instrumentos de avaliação padronizados que incluem entrevistas com o paciente e seus familiares. A revisão do histórico de evolução do paciente e resposta aos tratamentos também são úteis no processo. As intervenções e tratamentos precoces melhoram o prognóstico o que torna o diagnóstico antecipado particularmente importante (Volkmar et al., 2014).

A etiologia dos TEA é comumente descrita como heterogênea onde contribuem fatores ambientais e genéticos. O papel dos fatores ambientais no desenvolvimento dos TEA tem sido objeto de muitas pesquisas, sobretudo, relacionando exposição do feto durante a gestação a substâncias como álcool, tabaco, alguns medicamentos como anticonvulsivantes e infecções (Fakhouri, 2015). A influência relativa dos fatores ambientais, genéticos e epigenéticos são motivo de

discussão. No entanto, estudos epidemiológicos reforçam a forte contribuição dos fatores genéticos aos TEA.

Em uma revisão realizada por Bougeron (2016) levando em conta 13 estudos sobre TEA em gêmeos revelaram uma concordância de 45% para gêmeos monozigóticos e 16% para dizigóticos. Na mesma revisão a herdabilidade média estimada considerando 17 trabalhos, foi de 50%. Se levada em conta a concordância para o fenótipo autista e a presença de traços sub-clínicos da condição que caracterizam o “broader autism phenotype”, o valor aumenta para 82% entre gêmeos monozigóticos comparado com 10% em gêmeos dizigóticos (Losh et al., 2008).

Estudos em famílias também revelam que a chance de recorrência dos TEA varia conforme a proporção do genoma que o indivíduo compartilha com o parente afetado. Risch et al. (2014), em levantamento na Califórnia, determinou o risco de recorrência em 14% para irmãos do probando e 5,3% para irmãs, sendo 10,15% o risco para ambos os sexos combinados. Para meios-irmãos pelo lado materno o risco determinado foi de 4,8% contra 3,2% pelo lado paterno. Resultado semelhante foi obtido em estudo na Suécia (Sandim et al., 2014), no qual o risco de recorrência para irmãos foi de 10,3% contra 3,3% e 2,9% para meio-irmão pelo lado materno e paterno respectivamente. Nesses estudos o risco estimado foi menor do que os 18,7% obtidos em Ozonoff et al (2011). Em resumo, estudos epidemiológicos geraram informações que ressaltam a importância dos fatores genéticos na etiologia dos TEA, e as pesquisas têm concentrado esforços para responder as questões pertinentes como modelo de herança, genes envolvidos, seus efeitos e a frequência na população. Nos últimos anos, os esforços em identificar genes relacionados ao autismo seguiram diferentes estratégias para responder a estas questões.

Os primeiros trabalhos relacionando variantes genéticas aos TEA concentraram-se nos estudos citogenéticos (revisão de Huguet et al. 2016). Rearranjos cromossômicos são identificados em cerca de 2 a 5% dos pacientes com TEA (Devlin e Shereer, 2012). A resolução inerente ao método, entretanto, não

permite associar genes ligados aos TEA por meio dessa abordagem. Posteriormente, tecnologias moleculares como hibridização genômica em microarranjo (Array CGH- *Comparative Genomic Hybridization*), possibilitaram aumento na resolução para se detectarem deleções e duplicações sub-microscópicas as variações no número de cópias (CNVs *Copy Number Variations*). Desde os primeiros trabalhos publicados em 2006 (Jacquemont et al., 2006), vários estudos têm reforçado a importância dessas alterações na etiologia dos TEA. As estimativas da frequência das CNVs *de novo* nos pacientes com TEA estão em torno de 4 a 7% significativas em comparação com seus irmãos não afetados e controles (Sanders et al. 2011; Pinto et al. 2014). Esses estudos indicaram também que a maioria dos genes alterados pelas CNVs estava associada com funções sinápticas ou regulada pela FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), produto do gene *FMR1*, cuja perda de função devida à mutação completa causa a síndrome do X frágil (Huguet e Bougeron, 2015). A maioria das CNVs é única em cada paciente, mas algumas são recorrentes, por exemplo, os *loci* 7q 11, 15q 11.2 16p11. 2 (Huguet e Bougeron, op. cit.). Em alguns indivíduos com TEA foram identificadas mais de uma CNV potencialmente patogênica, sugerindo um mecanismo tipo “multiple-hit” nesses pacientes (Sanders et al., 2011, Leblond et al 2012).

Trabalhos em que foram aplicadas técnicas de sequenciamento de última geração (NGS, *Next Generation Sequencing*), que permitem analisar toda a região codificadora ou mesmo todo o genoma humano, também têm sido importantes na tarefa de identificar genes relacionados aos TEA. O foco desses trabalhos vem sendo a contribuição das variações de nucleotídeo único - SNVs (*Single Nucleotide Variants*) e Indels (pequenas inserções e deleções de nucleotídeos) raras e *de novo* nos TEA mostrando que 3,6 a 8,8% dos pacientes apresentam uma variante *de novo* possivelmente causativa (Iossifov et al., 2012).

Esses estudos revelaram que variantes *de novo* que levam à perda de função do gene introduzindo um código de parada prematuro, ou Indels que mudam a matriz de leitura ou afetam o sítio de excisão (*splice site*) são mais frequentes nos afetados do que em seus irmãos não autistas (Iossifov et al. 2014). Os portadores

dessas variantes *de novo* têm maior probabilidade de serem diagnosticados com baixo QI não verbal. Essas variantes estão concentradas em genes relacionados ao complexo FMRP, envolvidos na remodelação da cromatina (Iossifov op. cit.), ou ligados às funções sinápticas (De Rubeis et al. 2014).

Alguns estudos analisaram a contribuição de variantes comuns herdadas ou não. Um dos primeiros modelos de herança para os TEA foi o poligênico, envolvendo muitas variantes comuns cada qual com pequeno efeito individual, mas que combinadas entre si e/ou com fatores ambientais, aumentariam o risco de desenvolver a doença (Huguet et al., 2013). Esse tipo de abordagem leva em conta as variantes comuns mais amplamente distribuídas na população, concentrando-se nos polimorfismos de nucleotídeo único, SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Estudos de ligação e associação foram realizados a fim de analisar o papel das variantes comuns na suscetibilidade aos TEA (Wang et al. 2009, Anney et al. 2012, Klei et al. 2012). Esses estudos reforçaram a ideia de que as variantes comuns têm papel importante na susceptibilidade aos TEA, no entanto, individualmente, são associadas a efeitos modestos (Bougeron, 2016).

Existe grande diversidade de genes candidatos ao autismo e o SFARI (*Simons Foundation Autism Research Initiative*), tem em seu banco de dados 881 genes implicados nos TEA. No entanto, os genes de suscetibilidade aos TEA parecem convergir a um limitado número de vias de sinalização que interferem em plasticidade sináptica e conectividade em diferentes níveis (Huguet et al. 2013, Bougeron 2015, Krishnan et al. 2016).

A arquitetura genética dos TEA é altamente complexa e variável podendo ser definida por modelos diferentes para explicar sua herança. O modelo poligênico assume que os TEA resultam da combinação de variantes genéticas comuns, frequentes na população (frequência maior que 1%), em geral herdadas. Individualmente, a contribuição desses alelos para a doença seria modesta, mas algumas combinações dessas variações, em efeito aditivo, aumentariam a susceptibilidade e outras confeririam proteção a essas condições. Esses alelos, por

terem contribuição discreta, não estariam sujeitos a efeitos drásticos de seleção e permaneceriam na população (El Fishaw e State, 2001; Safen, 2015, de La torre-Ubieta et al. 2016).

As variantes genéticas raras, com frequência menor que 1% na população, que podem incluir mutações de ponto, pequenas e grandes deleções ou duplicações bem como rearranjos cromossômicos que afetem a estrutura e o funcionamento dos genes, em geral ocorrem *de novo* nos gametas que geram o indivíduo afetado ou são transmitidas em apenas algumas gerações dentro das famílias dos afetados (Safen, 2015; de La Torre-Ubieta et al. 2016). No entanto, apenas uma fração delas é de fato causativa e confere aumento de risco para TEA sem, entretanto, serem responsáveis por si só pelo quadro (Pérsico e Napoli, 2013). Essas afirmações são compatíveis com o modelo de um gene principal (oligogênico) no qual uma variante de alto impacto ou um conjunto limitado de variantes de efeito grave a moderado, é responsável por causar a doença (La torre Ubieta 2016, Turner et al. 2017).

Os dados epidemiológicos e moleculares acumulados sugerem que a contribuição genética para os TEA pode ser moldada tanto pela combinação de variantes raras deletérias e da miríade de alelos comuns de baixo risco, ou *background* genético. A combinação de variantes raras e comuns de efeitos graves, moderados e discretos seria a responsável pela enorme diversidade fenotípica observada nos TEA. Sob essa ótica, dependendo da habilidade dos alelos comuns de baixo efeito (*background* genético) em amenizar o impacto de uma variante rara deletéria, diferentes fenótipos poderiam ser observados. Por outro lado, um *background* genético com baixo poder de proteção, poderia revelar na criança o efeito de mutações mantidas silenciosas nos pais (Bougeron 2015).

Por outro lado, os TEA também podem estar associados com doenças genéticas de padrão de herança monogênico conhecidas. As estimativas indicam que 10% dos indivíduos dentro do espectro do autismo possuem uma síndrome de padrão de herança mendeliana em que o comportamento autista aparece como característica secundária, por exemplo, em condições como Esclerose Tuberosa,

Síndrome de Cowden, Síndrome de Rett, Neurofibromatose e a Síndrome do Cromossomo X Frágil (Milles, 2011, Devlin e Scherer, 2012).

A síndrome do X frágil é causada por uma expansão da repetição de trinucleotídeos (CGG)_n na região reguladora do gene *FMR1*. Acima de 200 trincas ocorre o silenciamento do gene e subsequentemente a ausência da proteína FMRP (*Fragile Mental Retardation Protein*). A FMRP é uma proteína de ligação ao mRNA (RNA mensageiro) que controla a tradução de genes importantes para o neurodesenvolvimento e a plasticidade sináptica. Muitas das questões da desregulação celular relacionadas à síndrome do X frágil têm paralelo com aquelas documentadas nos TEA idiopáticos, o que pode explicar a grande comorbidade entre os TEA e a síndrome do X frágil (Hagerman e Hagerman 2011). Alelos expandidos do gene *FMR1* na faixa da pré-mutação (55 a 200) também podem dar origem a outras doenças por meio de mecanismo molecular distinto discutido a seguir.

1.2 O gene *FMR1*

1.2.1 A síndrome do X frágil

Ocasionada por uma mutação no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), a síndrome do X frágil é a segunda causa de deficiência intelectual, ficando atrás apenas da síndrome de Down. As pessoas afetadas por essa síndrome apresentam deficiência intelectual em diferentes graus. A frequência estimada da síndrome é em torno de 1:5.000 homens e 1:4.000 a 1:8000 mulheres (Hagerman et. al. 2017).

A síndrome foi inicialmente descrita por Martin e Bell em 1943 em uma família com vários homens afetados por deficiência intelectual, na qual o heredograma sugeria fortemente um padrão de herança ligado ao cromossomo X. Posteriormente em 1969, Lubs relacionou a síndrome com a presença de um sítio frágil no cromossomo X em estudos citogenéticos. Durante as décadas de 1970 e 1980, os pacientes eram diagnosticados por meio de estudos citogenéticos, realizando cultura de tecidos em meio deficiente em ácido fólico que permitia a identificação do sítio

frágil. Finalmente, em 1991, três grupos clonaram independentemente o gene (revisão em Mingrone-Netto, 1995). Subsequentemente a essa descoberta foram desenvolvidos testes moleculares para o diagnóstico da síndrome.

O fenótipo da síndrome é variável, dependendo do *background* genético, sexo, idade e efeitos ambientais (Hagerman et al. 2017). A maioria dos afetados apresenta deficiência intelectual moderada a grave, outros apresentam inteligência limítrofe, enquanto outros apresentam deficiência intelectual profunda (Mingroni-Netto, 1995, Jacquemont et al., 2007). A hiperatividade e déficit de atenção são características frequentes. Além da deficiência intelectual, algumas características físicas também estão presentes na maioria dos casos como orelhas proeminentes, face alongada, palato alto, prognatismo, macroorquidia após a puberdade e hiperextensibilidade das articulações. Problemas médicos incluem prolapso da válvula mitral, otite média, convulsões, estrabismo, distúrbios do sono e gastrointestinais (Hagerman 2011; Lozano et al., 2014). Nas meninas o fenótipo é atenuado, mas 25% delas apresenta deficiência intelectual. Os problemas comportamentais também são mais brandos, embora a timidez excessiva e a ansiedade social sejam comuns (Jacquemont et al. op. cit.). Cerca de 25% dos pacientes com a mutação completa apresentam mosaicismos, isto é possuem além de células com a pré-mutação células com a mutação completa e até mesmo células com alelos dentro da faixa normal, devido à instabilidade somática da mutação completa. O mosaicismo também pode ser referente à metilação, ocorrendo num mesmo indivíduo expansões metiladas e não metiladas. O mosaicismo pode permitir a expressão do gene, sendo que nesses casos o fenótipo pode ser atenuado (Milá et al. 2017).

Características comportamentais próprias do espectro autista são observadas em portadores da síndrome do X frágil como contato visual pobre, auto-agressão, *flapping* de mãos, atraso e peculiaridades na linguagem entre outros (Hagerman et al. 1986). Embora o assunto seja motivo de controvérsia, (Cohen, 1991; Fisch, 1992) a literatura indica que cerca de 25% a 60% preenchem os critérios para diagnóstico de TEA (Brown et al, 1982, Hagerman et al. 1986, Harris et al., 2008; Hagerman e Hagerman 2011). Os pacientes com a síndrome do X frágil, no entanto, têm em

geral um déficit cognitivo maior e menor dificuldade de sociabilização, quando comparados aos pacientes com TEA idiopático (Mc Duffie et al. 2015).

1.2.2 As expansões do gene *FMR1*

Cerca de 99% dos pacientes com a síndrome do X frágil possuem uma mutação de perda de função causada pela expansão de uma repetição de trinucleotídeos (CGG)_n localizada na porção reguladora do gene *FMR1*, mapeado em Xq 27.3. O resultado dessa expansão é a hipermetilação do promotor do gene *FMR1* e consequente inibição da transcrição com perda ou drástica redução do produto proteico (FMRP – *fragile X mental retardation protein 1*). Diferentes alterações no gene *FMR1* como deleções do gene ou intragênicas bem como mutações de ponto são responsáveis pelo restante dos casos que somam menos de 1% (Ciaccio et al., 2017)

O número de repetições dessa sequência (CGG)_n está distribuído na população em quatro classes de alelos. A faixa de repetições compreendida entre 5 a 44 vezes corresponde aos alelos normais, sendo as repetições situadas entre 29 ou 30 trincas as mais comum na população. Os alelos compreendidos nesta faixa se mantêm estáveis de geração a geração. Alelos na faixa de 45 a 54 repetições são descritos como intermediários (ou *Gray-zone*) e podem ser instáveis, podendo se expandir até a faixa da mutação completa em duas gerações (Madrigal et al. 2011). A pré-mutação situa-se na faixa 55 a 200 repetições podendo se expandir para mutação completa em uma geração na meiose feminina (Monaghan et al. 2013; Lozano et al, 2014; Yrigollen et al. 2014). Expansões acima de 200 repetições caracterizam a mutação completa o que leva à metilação das citosinas e consequente silenciamento da transcrição e ausência da proteína codificada FMRP.

A instabilidade dos alelos está relacionada a vários fatores. Expansões a partir de um alelo pré-mutado até a mutação completa ocorrem apenas na meiose feminina. A transmissão de uma mutação completa nunca ocorre por via paterna mesmo se este for portador da mutação completa. O risco de expansão de uma pré-

mutação até mutação completa, durante a meiose materna está diretamente relacionado com o tamanho das repetições das trincas CGG e inversamente com a presença de interrupções AGG, a menor repetição que expandiu para mutação completa em uma geração tinha 56 trincas de bases (Nolin et al., 2003, Yringolen et al. 2014). Yringolen et al. (2014) propuseram um modelo que mede o risco de expansão da pré-mutação até a mutação completa via materna, que leva em conta o número de repetições CGG, o número de interrupções AGG e a idade materna. O estudo de marcadores do tipo microssatélite que flanqueiam o gene *FMR1* pode atuar como indicador indireto da instabilidade da expansão (Capelli et al, 2005; Capelli, 2007). A análise de haplótipos mostrou desequilíbrio de ligação entre certos haplótipos e a mutação do *FMR1*, sendo alguns haplótipos mais frequentemente associados a alelos normais e outros a alelos expandidos (Mc Person e Murray, 2016).

1.2.3 Os testes diagnósticos para detectar alelos expandidos do gene *FMR1*

Antes da identificação do gene *FMR1* o teste indicado para diagnosticar a síndrome do cromossomo X frágil era a análise citogenética. A cultura de células em meio deficiente de folato era utilizada para identificar o sítio frágil presente em Xq 27.3. O exame citogenético, embora seja útil para detectar outras anormalidades cromossômicas, é trabalhoso e não permite a distinção entre os dois sítios frágeis adjacentes FRAXA e FRAXE, que é associado a uma forma mais branda e não sindrômica de deficiência intelectual. Além disso, para as mulheres, a sensibilidade decresce, podendo resultar em falso negativo em parte das portadoras de mutação completa. Não permite também o diagnóstico de pré-mutação (Mc Person e Murray 2016).

Atualmente o exame citogenético não é mais indicado para o diagnóstico específico da síndrome do X frágil. A partir da identificação da mutação do gene *FMR1* como causa da síndrome do X frágil a análise molecular do gene *FMR1* é realizada. Essas técnicas só não são capazes de detectar outros tipos de alteração que não expansões, como deleções ou mutações de ponto, responsáveis por uma

ínfima parcela dos casos. Por muitos anos o teste recomendado para diagnóstico foi o *Southern blotting*, em que uma sonda correspondente a um segmento do gene *FMR1* é hibridada com o DNA genômico. Esse teste diferencia os alelos normais, as pré-mutações e as mutações completas, mas não permite detectar o número de trincas de nucleotídeos da repetição. Para isso, a amplificação da repetição (CGG)_n por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é necessária. As dificuldades inerentes à amplificação de segmentos de DNA ricos em CG (citosina e guanina) representou obstáculo para a amplificação de alelos com grandes expansões da repetição (CGG)_n; o diagnóstico de mulheres mostrou-se particularmente difícil diante da amplificação preferencial do alelo normal em heterozigóticas e, assim, uma mulher homozigótica quanto a um alelo normal não podia ser distinguida de uma portadora cuja repetição expandida não foi amplificada pela PCR. Algumas estratégias foram adotadas para contornar esses problemas e hoje estão disponíveis testes baseados em PCR que identificam o espectro completo dos alelos do gene *FMR1* e permitem inferir corretamente a homozigose nas mulheres (Filipovic-Sadic et al., 2010). É possível mesmo determinar concomitantemente o tamanho da repetição (CGG)_n e o status de metilação dos alelos do gene *FMR1* (Chen et al., 2011). Atualmente estão disponíveis kits comerciais para eficiente diagnóstico baseado em PCR (Macpherson, 2016).

Algumas técnicas de PCR têm sido desenvolvidas para fins de triagem para pacientes com deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento ou autismo permitindo a análise de vários pacientes a baixo custo (revisão de Tassone et al., 2015). Um exemplo foi a técnica desenvolvida por Hadad et al (1996) baseada justamente na dificuldade de amplificação dos alelos com mutação completa. O teste permite a detecção da mutação, por ausência de amplificação com sensibilidade de 98% em indivíduos do sexo masculino. Os autores recomendam a confirmação dos casos positivos por técnica que permita a identificação de todos os alelos.

De acordo com a ACMG (American College of Medical Genetics) e a ACOG (American Congress of Obstetricians and Gynecologists), os testes pré-natais para alelos expandidos do *FMR1* devem ser oferecidos aos casais com história pessoal e

familiar de síndrome do X frágil e desordens relacionadas, deficiência intelectual ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, autismo, ataxia cerebelar isolada com tremor e falência ovariana primária idiopática familiar. O rastreamento neonatal para SXF (síndrome do x frágil) tem sido proposto (Famula, 2015), no entanto, há controvérsias já que o tratamento para a síndrome não é específico e sim baseado nos sintomas.

1.2.4 O gene *FMR1* e a função da proteína FMRP

O *FMR1* é um gene altamente conservado composto por 17 exons, estendendo-se por 38 Kb. O transcrito, de 4,4 Kb, pode sofrer *splicing* alternativo e várias isoformas já foram detectadas (Tassone, 2016).

A FMRP é amplamente expressa nos tecidos fetais e adultos, sobretudo nas gônadas e no cérebro (Devys et al. 1993). Funcionalmente a FMRP pertence à família de proteínas de ligação ao RNA, transitando entre o núcleo e o citoplasma. A FMRP interage com outras proteínas e RNAs formando um complexo ribonucleoproteico (mRNP). Possui quatro domínios estruturais de ligação a RNAm e micro RNAs. (Zalfa e Bagni 2004, De Rubeis e Bagni, 2010). Além disso, atua no transporte de proteínas e no transporte e estabilização de RNA mensageiros. No nível das sinapses regula a tradução de vários RNA mensageiros importantes para a plasticidade sináptica, migração neuronal e neurogênese adulta (De Rubeis e Bagni, 2010; Sidorov e Bear 2013). Uma mutação de ponto em um dos domínios de ligação a RNA é suficiente para causar o fenótipo em camundongos Knockout (Sidorov e Bear, op. cit.).

Estudos funcionais demonstraram que várias proteínas pré e pós sinápticas são reguladas pela FMRP. Há evidências de que a FMRP reprime a tradução. Consequentemente, na ausência da FMRP, há desregulação na plasticidade sináptica (Hagerman e Hagerman, 2010).

Estudos mostram que várias proteínas que se ligam à FMRP e que, presumivelmente, são reguladas por ela, estão relacionadas aos TEA como SHANK3, PTEN, CYFIP1, algumas neurexinas e neuroliginas (revisão de Hagerman

e Hagerman, 2011). Além disso há evidências de que a ausência da FMRP na síndrome do X frágil impacta vias de sinalização celular também desreguladas em outras formas de TEA como mTHOR, GABA e mGLUR5. Estudos demonstraram superativação da via mTOR em modelos animais de FRAX (De Rubeis e Bagni, 2011) e em humanos com FRAX (Tassone 2010). Mutações de genes na via mTOR estão presentes em outras formas de TEA, incluindo síndromes monogênicas como Esclerose Tuberosa e causadas por mutação no gene PTEN (Sato, 2016). Outro sistema superativado na ausência da FMRP é o mGLUR5, o que em última instância interfere na plasticidade sináptica. O resultado observado é a presença de espinhas dendríticas imaturas, mais longas e finas no hipocampo e em outras regiões do cérebro (revisão de Hagerman e Hagerman, 2011).

1.2.5 A pré-mutação do gene *FMR1*

1.2.5.1 A frequência da pré-mutação na população

Os dados epidemiológicos relativos à pré-mutação variam bastante conforme a fonte da informação. Nos Estados Unidos os números giram em torno de 1/291 mulheres e 1/855 homens (Hunter et al 2014), 1/259 mulheres e 1/813 homens (Russeau et al, 1995). Song (2003) em revisão de 16 trabalhos totalizando 19.929 indivíduos do sexo masculino de vários países chegou ao valor de 0,156 % (1 em 643) para a frequência da pré-mutação na população em geral.

Para a população brasileira os dados são escassos e os levantamentos contam com amostras muito pequenas para estabelecer um valor de comparação. Sucharov et al. (1999) encontrou 1 em 100 indivíduos do sexo masculino portador da pré-mutação em pesquisa realizada no Rio de Janeiro (RJ). Mingroni-Netto et al (2002) não encontraram nenhum portador da pré-mutação em um total de 101 homens provenientes de populações brasileiras de origem indígena e africana remanescente de quilombos. Da mesma forma, Gomez (2011) examinando uma amostra de 511 indivíduos do sexo masculino em Salvador (BA) não encontrou portador.

A Tabela 1 abaixo resume os resultados das pesquisas a respeito da frequência das expansões do gene *FMR1* entre indivíduos do sexo masculino da população geral.

Tabela 1- Frequência de alelos expandidos do gene *FMR1* na população geral.

Estudo	Local	Alelos intermediários	Pré-mutação	Número de Indivíduos do sexo masculino	Número de portadores de pré-mutação
Song <i>et al.</i> 2003	Vários (revisão)	-	1/643 (0,16%)	-	-
Fernandez Carvajal <i>et al.</i> 2009	Espanha (Castilla y León)	1/26 (3,7%), 95% IC 1/23-1/30	1/251 (0,4%) 95% IC 1/164-1/385	5.267	21
Sucharov <i>et al.</i> (1999)	Brasil (Rio de Janeiro)	-	1%	100	1
Gomez, 2011	Brasil (Salvador)	0 (zero)	0 (zero)	511	0
Tassone <i>et al.</i> 2012	Estados Unidos (Califórnia, Chicago e Carolina do Norte)	1/112 (0,9%) 95% IC 1/145-1/88	1:430 (0,2%) 95% IC: 1/736-1/268	7.312	17
Maener <i>et al.</i> ; 2013	Estados Unidos (Wisconsin)	1/62 (0,6%) 95% IC 1/78-1/50	1/290 (0,3%) 95% IC 1/530-1/194	8.469	26
Seltzer, 2012	Estados Unidos (Wisconsin)	1/42 IC 95% 1/ - 1/252	1/468 (0,2%) IC 95% 1/628-1/252	3.273	7
Total			0,29%	24.421	72

1.2.5.2 Quadros clínicos associados à pré-mutação: insuficiência ovariana e síndrome do tremor e ataxia associada ao X frágil

Inicialmente acreditou-se que a síndrome do cromossomo X frágil fosse a única condição associada a expansões da repetição (CGG)_n no gene *FMR1* e que os portadores da pré-mutação não tivessem qualquer tipo de manifestação. No entanto, a identificação de duas condições relacionadas à pré-mutação, a insuficiência ovariana primária associada ao X frágil, FXPOI (Shwartz et al, 1994, Vianna-Morgante et al 1996; Allingham-Hawkins et al. 1999) e da síndrome do tremor e ataxia associada ao cromossomo X frágil, FXTAS (Hagerman et al 2001) trouxe nova luz a eventuais condições associadas à presença da pré mutação.

A insuficiência ovariana primária (POI) é definida como ocorrência de amenorréia antes dos 40 anos de idade acompanhada da alteração de marcadores hormonais específicos (hormônio folículo-estimulante e estradiol). Ocorre em cerca de 1% da população. Entre as portadoras de pré-mutação o risco é de cerca de 20%, sendo assim esta a causa genética mais comum dessa condição. Seu mecanismo molecular ainda não foi elucidado, no entanto, foi constatado que existe associação positiva e não linear entre o número de repetições (CGG)_n e a FXPOI, estando a maior probabilidade de ocorrência na faixa de 80 a 99 trincas CGG (Sullivan et al. 2005, Ennis et al. 2006; Alvarez-Mora et al. 2015)

A síndrome do tremor e ataxia associada ao cromossomo X frágil (FXTAS) caracteriza-se por tremor intencional, atrofia cerebelar, alterações no andar e dificuldades cognitivas e comportamentais, manifestando-se após os 50 anos de idade (Hagerman et al 2001). Ocorre em aproximadamente 16% das mulheres e 40% dos homens portadores da pré-mutação, a penetrância aumentando conforme a idade. Jacquemont et al. (2004) demonstraram que a penetrância em homens de 50 a 59 anos é de 17%, aumentando para 38% na faixa entre 60 e 69 até chegar em 75% para homens de mais de 80 anos. Além disso, essa condição parece afetar apenas portadores cujos alelos tenham mais de 70 trincas CGG (Jacquemont et al 2006). O tamanho da repetição CGG também parece estar diretamente correlacionado com a gravidade dos sintomas (Jacquemont et al., 2007) e inversamente correlacionado com a idade de início dos sintomas e morte dos

pacientes (Tassone et al. 2007). A penetrância incompleta da FXTAS pode estar ligada a um “segundo hit”. Mutações do gene APOE, que codifica a apolipoproteína E, relacionada à doença de Alzheimer parecem aumentar o risco de desenvolver FXTAS (Silva et al. 2013). Além disso, alguns fatores ambientais como tabagismo, alcoolismo ou tratamento quimioterápico parecem aumentar a predisposição à doença (Hagerman e Hagerman, 2015).

Diferente do que ocorre na síndrome do X frágil, onde há o silenciamento do gene e ausência de transcrição, na pré-mutação a atividade transcricional está presente. A presença de níveis elevados de RNA mensageiro em portadores da pré-mutação (Tassone et al., 2000) levou à proposição do modelo de ganho de função proposto por Hagerman et al. (2001). Esse modelo molecular, análogo ao modelo proposto para a distrofia miotônica, propõe o sequestro de uma ou mais proteínas de ligação a RNA pela porção expandida de (CGG)_n na extremidade 5'-UTR do RNAm do *FMR1*. Esse chamado “efeito tóxico” reduziria a capacidade dessas proteínas “sequestradas” de executarem suas próprias funções.

Esse modelo encontra apoio pelo único achado neuropatológico na FXTAS, a presença de inclusões intranucleares nos neurônios e astrócitos no cérebro, particularmente no hipocampo, de pacientes com o fenótipo (Greco et al., 2002). Essas inclusões contêm RNAm do gene *FMR1* e várias proteínas (Tassone et al., 2004).

Outras alterações documentadas nos pacientes de FXTAS foram a ruptura da lamina nuclear, disfunções mitocondriais e deficiência de FMRP (Ross-Inta et al. 2010; Hagerman e Hagerman, 2013). Embora o aumento dos níveis de RNA mensageiro nas células de portadores de pré-mutação seja consenso não há unanimidade se os níveis da proteína FMRP diferem dos controles. Kenneson et al. (2001) observaram diminuição nos níveis da proteína especialmente nos portadores das expansões maiores do que 140 trincas CGG. Liff et al (2012) utilizando camundongos com repetições na faixa de 120 a 150 CGG notaram redução da eficiência de tradução e diminuição dos níveis de FMRP. Já os resultados de Feng et al (1995) e de Jacquemont et al. (2003) não corroboram esses achados, não

tendo sido detectadas na abundância da proteína entre os grupos de pré-mutados e controles.

Modelos funcionais ilustram as possíveis alterações decorrentes da pré-mutação. Chen et al (2010) demonstraram que, em cultura, neurônios de fêmeas de murino heterozigóticas quanto à pré-mutação do *FMR1*, apresentaram uma série de alterações, presentes desde o começo do desenvolvimento, em comparação com as linhagens selvagens. As alterações incluíam dendritos mais curtos e menos ramificados, alteração da morfologia sináptica, aumento dos marcadores de estresse oxidativo, aumento do volume de heterocromatina no núcleo e morte prematura dos neurônios. Modelos utilizando células pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos portadores da pré-mutação e diferenciadas em neurônios, revelaram atividade anômala relacionada aos canais de cálcio, além de diminuição do comprimento dos dendritos e axônios e redução de algumas proteínas pós sinápticas (Liu et al. 2012).

1.2.5.3 Outras possíveis condições associadas à pré-mutação – Transtornos psicológicos

Após a descrição da insuficiência ovariana primária e a síndrome do tremor e ataxia associadas à pré-mutação do gene *FMR1* ampliaram-se os estudos em torno da pré-mutação. Inicialmente realizados em adultos, os estudos se concentraram em investigar a possível relação entre a pré-mutação e demais condições psicológicas, psiquiátricas e neurológicas. Os estudos foram primeiramente realizados em mulheres, porque, além da pré-mutação ser mais frequente nelas, as mães de crianças com a síndrome do X frágil costumavam referir-se a uma série de transtornos, como ansiedade e depressão, condições essas inicialmente atribuídas ao encargo de criar uma criança deficiente.

Posteriormente outros estudos foram realizados a fim de se subtrair esse viés. Franke et al., (1998) utilizaram como controle mães de autistas ou portadores de outras deficiências e constataram aumento substancial na frequência de desordens como ansiedade e depressão entre as portadoras da pré-mutação em comparação

ao grupo controle. Estudos envolvendo portadoras de pré-mutação sem filhos revelaram frequência aumentada de ansiedade, depressão e comportamentos obsessivo-compulsivos nas portadoras, comparadas aos controles. (Gosset et al., 2016).

Cornish et al.(2004) estudando um grupo de 22 homens portadores da pré-mutação constataram por meio de uma série de testes, que os portadores apresentavam um déficit na cognição social¹.

Hessl et al. (2007) observaram diminuição do volume da amígdala no grupo de homens portadores de pré-mutação em comparação ao grupo controle bem como redução da ativação da amígdala durante teste de reação a rostos representando diferentes emoções. Posteriormente Hessl et al. (2011) correlacionaram a redução na ativação da amígdala com uma redução de FMRP. Nesse mesmo trabalho constataram-se que os homens portadores da pré-mutação apresentavam mais sintomas isolados de TEA em comparação ao grupo controle, porém sem atingir significância clínica.

Hunter et al., (2008) realizaram revisão de 16 trabalhos que avaliaram perfis neuropsicológicos e neurocomportamentais e medidas das expansões das trincas CGG em adultos portadores da pré-mutação, entre 18 e 50 anos sem a FXTAS a fim de verificar se havia um fenótipo típico associado à pré-mutação. Os autores concluíram que, embora haja um grande número de manifestações documentadas que variam desde sintomas neuropsiquiátricos, tais como ansiedade, depressão e traços esquizoides não há um padrão que defina um fenótipo associado à pré-mutação do gene *FMR1*.

À semelhança do que ocorre na FXPOI, a frequência de distúrbios psicológicos nas mulheres também não está correlacionada linearmente com o tamanho da expansão (CGG)_n. Loesh et al. (2015) analisaram 299 mulheres

¹ A cognição social é o processo neurobiológico que permite tanto humanos como animais interpretar adequadamente os signos sociais e, conseqüentemente, responder de maneira apropriada. Outra definição poderia corresponder ao processo cognitivo que elabora a conduta adequada em resposta a outros indivíduos da mesma espécie. aqueles processos cognitivos superiores que sustentam as condutas sociais extremamente diversas e flexíveis (Butman et al 2001).

portadoras com repetições (CGG)_n entre 50 a 141 trincas a fim de relacionar o tamanho das expansões aos distúrbios psicológicos (avaliados com base no Symptom Checklist 90-Revised). Foi constatada correlação não linear, sugerindo que as portadoras na faixa intermediária (60 a 80 trincas CGG) tem maior probabilidade de desenvolver doenças psiquiátricas.

Um conjunto de manifestações neuropsiquiátricas (Besterman et al, 2014) e outras condições médicas relacionadas ao sistema imune e endócrino têm sido descritas associadas à pré-mutação (Coffei et al. 2008, Hagerman e Hagerman, 2011, Hagerman e Hagerman, 2013).

Cordeiro et al (2015) objetivando detectar o grau de ansiedade entre os portadores estudou um grupo de 35 pessoas, 27 homens e sete mulheres, dos quais 20 eram probandos e 15 não probandos. Dentre esses, nove (8 homens e 1 mulher) receberam o diagnóstico de TEA.

Nenhum desses trabalhos conseguiu determinar porque alguns indivíduos portadores da pré-mutação sofrem dessas condições e outros não. A maioria dos autores procurou explicação em fatores genéticos secundários ou ambientais, e fenótipos muitas vezes sub-clínicos (Hessl et al. 2011).

1.2.5.4 Outras possíveis condições associadas à pré-mutação - TEA

Em paralelo a essas pesquisas com adultos, alguns autores levantaram a hipótese de que a pré-mutação pudesse causar nos portadores o aparecimento de características semelhantes àquelas da síndrome do X frágil, porém mais brandas como atraso no desenvolvimento, dificuldades sociais e comportamentais. Baseando-se nessa hipótese, foram iniciadas pesquisas com crianças, incluindo a investigação de transtornos do espectro autista (Tabela 2).

De maneira bem geral os métodos de avaliação de TEA utilizados nesses trabalhos consistiram de entrevistas padronizadas aplicadas aos pais ou de avaliações diretas na criança. O SCG *Social Communication Questionnaire* (Rutter et al. 2001) consiste de 40 questões dirigidas aos pais sobre o comportamento da

criança sendo utilizado como teste de triagem para risco de TEA. Já o ADI-R (Autism Diagnostic Interview- Revised, Lord et al 1994) consiste de entrevista com os pais avaliando a presença e gravidade dos sintomas de TEA, considerando os três domínios principais – comunicação, interação social e padrões de comportamento estereotipado e restrito. A ADOS-G (*Autism Diagnostic Observation Scale- Generic*) é aplicada diretamente ao paciente e avalia as áreas de interação social, linguagem e comunicação, brincadeiras e imaginação além de comportamentos repetitivos e restritos. Essa forma de avaliação faz distinção entre os quadros de “desordem autista”, (*autistic disorder*) e “desordem do espectro autista” (*autistic spectrum disorder*), considerado um quadro mais brando. Por esta razão em alguns trabalhos mais antigos existe a divisão AUT correspondendo a “desordem autista” e ASD “desordem do espectro autista”(Lord et al., 1999). Atualmente após a publicação do DSMV (*Diagnostic and statistical Manual o Mental disorders*) essa divisão não se aplica. A escala CARS (*Childhood Autism Rating Scale*) também é um instrumento padronizado para avaliação de TEA (Shopler et al. 1993).

Dentre as avaliações mais comumente aplicadas aos adultos estão o AQ - Autism spectrum quotient (Baron-Cohen et al. 2001), instrumento de triagem auto-aplicado que mede o grau de traços autísticos em um indivíduo de inteligência normal. O SRS-A, *Social Responsiveness Sscale* (Constantino e Todd 2005) é baseado no SRS que originalmente é aplicado a crianças e adolescentes também mede o grau de traços autísticos no indivíduo e deve ser respondido por parente próximo ou cônjuge.

Tabela 2. Pesquisas relacionando a ocorrência de TEA em indivíduos portadores da pré-mutação do gene *FMR1*

Referência	Origem dos pacientes	Objetivos	Grupo estudado/Grupo controle	Instrumentos de avaliação	Resultados
Tassone et al. 2000	Não especificada	Estudo de caso seis pacientes pré-mutados	2 meninas e 4 meninos com PM/ Sem grupo controle	Avaliação clínica e WISQC3	Pacientes no limite superior da pré-mutação apresentaram QI rebaixado

Aziz et al. 2003	Centros de Genética Londres, Inglaterra	Avaliação física psicológica e de linguagem	10 meninos: 6 com PM e 4 com alelos GZ /Sem grupo controle	<i>Autistic Disorders Diagnostic Checklist</i>	3 com alelos GZ e 1 com PM preencheram os critérios para autismo
Goodlin-Jones et al., 2004	M.I.N.D.Institut e UC Davis Medical Center California US Famílias de FraX-	Relato de cinco crianças com PM e diagnóstico de autismo	3 meninos 2 meninas com PM e TEA /2 meninas e 3 meninos com PM sem TEA	ADOS-G CARS SCQ ADI-R	PM com TEA tem comportamento adaptativo mais baixo mas QI equivalente aos controles
Farzin et al 2006	La Trobe University Victoria, Australia e University of California, Davis US	Comparar sintomas de TEA e TDAH entre meninos probandos e não probandos pré-mutados	14 PM probandos 13 PM não-probandos / 16 controles com alelos normais irmãos de FraX	SCQ ADOS ADI DSM IV	71% dos probandos e 8% dos não probandos pontuaram para TEA contra 0% dos controles.
Clifford et al. 2007	Victorian Genetic Health Services - the Royal Children's Hospital Melbourne, Australia "Cascade-test"	Avaliar o comportamento autista em pessoas com alelos expandidos do <i>FMR1</i>	7 homens e 43 mulheres com PM/29 homens 9 mulheres com alelos normal	ADOS-G ADI-R. VABS	2,6% dos controles, 14% dos homens 7% das mulheres com PM pontuaram para TEA em um ou outro questionário
Bailey et al. 2008	National Fragile X Foundation, FRAXA Research Foundation, Conquer Fragile X Foundation – Familiares de Fra X	Avaliar condições que co-ocorrem com os alelos expandidos	57 meninos com PM 199 meninas com PM 975meninos com MC 259 meninas com MC	Relato dos pais sobre condições médicas diagnosticadas ou tratadas	Dos 19/57 33% dos meninos com PM 19 foram diagnosticados ou tratados como autistas
Hunter et al 2008	Revisão	Verificar qual o impacto neuropsicológico de ser portador de PM	-	-	Não há impacto neuropsicológico em ser portador. Testes não revelaram diferenças significativas
Chonchaia et al 2009	Fragile X Research and Treatment Center, University of California Davis MIND Institute	Estudo de caso descritivo de família com PM	2 meninos e 1 adulto com PM	ADI-R. VABS DSM-IV	1 menino autismo típico outro com fenótipo autista sub-clínico (ASD). 1 adulto FXTAS
Chonchaia	Fragile X	Estudar a	25 probandos	SCQ	TEA e

et al. 2012	Research and treatment Center University of California Davis MIND Institute	incidência de convulsões e TEA entre probandos e não probandos com PM	com PM 25 não probandos com PM 32 controles com alelos normais	ADOS ADI-R DSM-IV	convulsões são mais prevalentes em pré-mutados probandos.
Tassone et al. 2012	CHARGE Childhood autism risk from genes and environment study	Triagem para portadores de alelos expandidos do <i>FMR1</i> em coorte de autistas e DI	AUT 313 ASD 144 AD 152 346 controles	ADI-R ADOS Vineland escala comportamento adaptativo	1 homem e 1 mulher no Grupo AUT com MC 2 homens no grupo AD com MC 1 homem e 1 mulher no grupo AD com PM
Schneider et al 2016	Familiares de FraX que não se apresentaram clinicamente		42 homens e 22mulheres com PM 48 homens e 19 mulheres controle com alelos normais	AQ SRS	Homens com PM exibem mais traços autísticos que controles
López-Mourelo et al 2016	Espanha	Avaliar ansiedade e traços autistas em pré-mutados com e sem FXTAS	59 com PM (40 mulheres, 19 homens)/ Pessoas com alelos normais	AQ SPIN	Pré-mutados com FRAXTAS pontuaram mais alto do que os PM sem FRAXTAS para traços autistas

ADI-R: Autism Diagnostic Interview- Revised; SCG Social Communication Questionnaire; ADOS-G: Autism Diagnostic Observation Scale- Generic; AQ: Autism spectrum quotient; SRS social responsiveness scale; MC: mutação completa, PM: pré-mutação; GZ alelos Gray-zone; SPIN: Social Phobia inventory -

Tassone *et al* (2000) relataram seis crianças (duas meninas e um menino) pré-mutados com déficit cognitivo e ou problemas emocionais como transtorno obsessivo-compulsivo, depressão grave, dificuldade de aprendizado, hiperatividade, agressividade e traços autistas, como auto-agressão, ausência de contato visual, aversão ao tato, e maneirismos motores. Nesse trabalho não houve avaliação sobre TEA propriamente apenas foram observados traços de TEA. Os autores hipotetizaram que essas alterações poderiam ser atribuíveis aos níveis elevados de mRNA e déficit de FMRP encontrados em alguns dos pacientes.

Aziz *et al* (2003) realizaram uma pesquisa na qual 10 meninos com expansões no *FMR1*, sendo 6 pré-mutados e 4 com alelos Gray-zone, foram submetidos a uma série de avaliações físicas, psicológicas e psiquiátricas. Dos dez meninos quatro obtiveram pontuação compatível com o diagnóstico de TEA, 1 pré-mutado e 3 com alelos Gray-zone.

Goodlin-Jones *et al.* (2004) estudaram cinco crianças pré-mutadas (2 meninos e 3 meninas) e uma com mutação completa com TEA e compararam com cinco crianças (2 meninas e 3 meninos) pré-mutados sem TEA, provenientes de famílias de crianças com síndrome do X frágil quanto a aspectos clínico e molecular fazendo medições dos níveis de FMRP, RNAm e aplicando escalas de mensuração do grau de TEA. Os pré-mutados com TEA apresentaram diminuição dos níveis de FMRP. Os autores discutiram se o resultado se deve ao alto nível de RNA do *FMR1*, à deficiência de FMRP ou ambos, já que ambas as características foram encontradas nos pacientes com TEA, e não nos controles. Os autores propuseram que a pré-mutação fosse um evento a mais (*genetic hit*) que, somado a outros fatores ambientais ou genéticos, determinariam o fenótipo autista. Interessante salientar que na amostra de Goodlin-Jones *et al.* (op. cit.), dentre os seis pacientes que desenvolveram autismo, cinco apresentaram quadro regressivo entre 18 e 36 meses de idade.

Objetivando comparar a prevalência dos sintomas de TEA e TDAH entre portadores da pré-mutação que se apresentavam como probandos com os não probandos (também portadores), Farzin *et al.*, (2006) avaliaram um grupo de 43 indivíduos do sexo masculino com idades variando entre 4 e 22 anos portadores da pré-mutação. Desses indivíduos, 14 eram probandos, 13 eram não probandos recrutados em famílias de crianças com a síndrome do X frágil, e 16 controles com alelos normais, irmãos de afetados pela a síndrome do X frágil. Os pesquisadores não encontraram diferença estatisticamente significativa de QI entre os grupos. Combinando todos os instrumentos para diagnóstico de TEA utilizados no estudo os pesquisadores observaram que no subgrupo dos probandos 71% preencheram os critérios para diagnóstico de TEA ou TGD (transtorno global do desenvolvimento),

8% dos não-probandos preencheram os critérios para diagnóstico de TEA e nenhum dos controles alcançou pontuação suficiente para diagnóstico de TEA.

Clifford et al. (2007) avaliaram 50 pessoas de idades variadas, 7 do sexo masculino e 43 do sexo feminino, portadores da pré-mutação quanto ao diagnóstico de TEA. Dois dos pré-mutados do sexo masculino e 4 do sexo feminino eram probandos os demais vieram por efeito “cascata”, ou seja, foram testados por serem parentes de pessoas com a síndrome do X frágil. Verificaram que 14% dos indivíduos do sexo masculino e 5% do sexo feminino pontuaram para pelo menos um dos testes aplicados para avaliar TEA.

Uma pesquisa envolvendo 1.276 famílias com a participação de três fundações norte-americanas (National Fragile X Foundation, FRAXA Research Foundation, Conquer Fragile X Foundation) recrutou um total de 2.964 crianças parentes de pessoas com a síndrome do X Frágil. O objetivo foi o de verificar as condições que co-ocorriam com o espectro de variações do gene *FMR1*. Dessas 2964 crianças, 1492 tinham a mutação completa, 565 tinham o alelo normal e 256, a pré-mutação (57 meninos e 199 meninas). A pesquisa, baseada em entrevista com os pais, por telefone ou email, sobre as eventuais comorbidades diagnosticadas ou tratadas nos filhos revelou que, dentre os portadores da pré-mutação, 19 dos 57 (33%) meninos haviam sido diagnosticados ou tratados para TEA contra uma das 199 meninas. Uma frequência de cerca de 10% (5/57) de TEA também foi reportada no grupo de meninos normais para *FMR1*, o que é superior ao detectado em outros trabalhos. Curiosamente no grupo de meninos portadores da mutação completa apenas 4,7% tiveram registro de diagnóstico ou tratamento para TEA. Os autores comentaram algumas limitações do trabalho como, por exemplo, o fato dos resultados do teste genético terem sido reportados pelos próprios familiares e não checados, sendo alguns dos parentes entrevistados eles mesmos portadores da mutação completa, prejudicando a objetividade do relato (Bailey et al. 2008).

Chonchaia et al. (2011) realizaram uma pesquisa que envolveu três grupos: probandos pré-mutados (N=25), não probandos pré-mutados (N=25) e controles (N=32), portadores de alelos normais irmãos de afetados pela síndrome do X frágil.

O objetivo foi o de avaliar a incidência de TEA e convulsões nos três grupos. No grupo dos probandos 17 em 20 pontuaram para TEA 7 deles tendo convulsões. Entre os não probandos com pré-mutação 7 em 25 pontuaram para TEA e nenhum deles tinha convulsões. Assim o grupo dos probandos com a pré-mutação era mais propenso a apresentar ambas as condições (TEA e convulsões), em comparação com os outros dois grupos e os não probandos pré-mutados eram mais propensos ao TEA do que os controles.

Tassone et al. (2012) investigaram a frequência de portadores de alelos expandidos do gene *FMR1* em uma coorte de crianças de 2 a 5 anos com diagnóstico de TEA, atraso no desenvolvimento e em controles. No grupo de 391 meninos com TEA um era portador da pré-mutação (0,25%). Nesse mesmo grupo um menino possuía a mutação completa. No grupo de 95 meninos com atraso no desenvolvimento foram encontrados dois com a mutação completa e um com pré-mutação.

Schneider et al (2016) testaram um grupo de jovens adultos (42 homens e 22 mulheres) pré-mutados que não haviam sido diagnosticados com qualquer transtorno, apresentando exames neurológicos normais, recrutados em famílias de afetados pela síndrome do X frágil. Esses indivíduos foram submetidos a uma série de testes e comparados com controles que possuíam alelos normais do *FMR1* de onde se concluiu que os homens portadores de pré-mutação têm uma maior tendência de exibir traços autísticos do que os controles.

Já a proposta de López-Mourelo et al. (2016) foi a de comparar sintomas e traços de TEA, bem como de fobia social (ou ansiedade social), em pré-mutados afetados ou não por FXTAS. Os autores verificaram que os portadores de pré-mutação que apresentavam FXTAS apresentaram maior pontuação nos testes de ansiedade social, sobretudo as mulheres, bem como nos testes para traços autísticos.

Resumindo, esses trabalhos são muito heterogêneos no que se refere à metodologia de avaliação, critério de inclusão, e comparação entre sujeitos e

controles. Em várias pesquisas a amostra de pré-mutados é muito pequena. Além disso, o viés de averiguação também é um problema a ser considerado. Uma vez que não existe triagem para alelos expandidos do *FMR1* nem tampouco nenhum estudo longitudinal que acompanhe os portadores de pré-mutação, estes apenas são identificados quando presentes em famílias em que ocorre a síndrome do X frágil ou apresentam alguma deficiência.

Outra questão importante a ressaltar é que os pacientes da maioria dos trabalhos citados não foram investigados quanto à uma segunda causa genética que pudesse explicar seu quadro clínico. A exceção é o trabalho de Lozano *et al.* (2014) no qual foi estudada uma amostra de 56 portadores de pré-mutação (52 homens e 4 mulheres) divididos em quatro categorias: pacientes com problemas comportamentais apenas, TEA apenas, TEA e problemas neurológicos e problemas neurológicos apenas. O intuito da pesquisa foi verificar a presença de CNVS nos pacientes além da pré-mutação. Foram encontradas CNVs raras em todos os grupos. Nos grupos com TEA foram encontradas CNVs em 14% dos pacientes, o que supera um pouco a frequência de 10% de CNVs em grupos de pacientes com TEA (Devlin e Sherer 2012). De acordo com os autores, portadores de pré-mutação são mais suscetíveis a um “segundo hit” que combinados à pré-mutação contribuiriam para modular o fenótipo.

Apesar disso os trabalhos mais recentes na literatura parecem apontar para a ideia de que a pré-mutação confira risco para transtornos do espectro autista na forma de efeitos sutis da pré-mutação combinados a outros genes do background genético, resultando no fenótipo autista. No entanto, essa associação ainda permanece incerta e motivou este trabalho. Seu objetivo foi avaliar se a pré-mutação pode oferecer risco para os TEA. Para isso foi levantada a frequência de portadores da pré-mutação em uma amostra de pacientes com TEA bem como a frequência de pacientes com diagnóstico de TEA em um grupo de portadores da pré-mutação provenientes de uma segunda casuística composta por famílias de afetados pela síndrome do X frágil.

2. Objetivos

O aconselhamento genético para doenças associadas às expansões da repetição (CGG)_n do gene *FMR1* por si só já é desafiador em função de seu mecanismo de herança complexo, fenótipo variável e do impacto emocional que recai sobre a família. Some-se a isso o aconselhamento para transtorno do espectro autista também altamente complexo devido à sua variabilidade clínica e genética. Dessa maneira, o entendimento sobre a gama de manifestações clínicas da pré-mutação do gene *FMR1* é fundamental para subsidiar o aconselhamento genético nas famílias. Sendo assim, nossos objetivos nesse trabalho foram:

Objetivos principais:

- Levantar a frequência de portadores da pré-mutação no gene *FMR1* entre os probandos do sexo masculino encaminhados ao grupo de pesquisas sobre transtornos do espectro autista do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - CEGH-CEL e comparar com os dados da literatura a fim de se verificar se há excesso de pacientes pré-mutados nessa casuística.
- Identificar a frequência de indivíduos do sexo masculino com diagnóstico de TEA entre portadores da pré-mutação, provenientes de famílias de afetados pela síndrome do X frágil, investigados no Laboratório de Genética Humana, Departamento de Biologia evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e comparar com os dados da literatura.

Objetivos secundários:

- Investigar, sob o aspecto clínico e genético os pacientes do sexo masculino portadores da pré-mutação encaminhados ao grupo de pesquisas em transtornos do espectro autista do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco com diagnóstico de TEA.

- Oferecer aconselhamento genético aos familiares desses pacientes que assim o desejarem.

3. Material e métodos:

3.1 Casuística:

O estudo inclui duas casuísticas diferentes descritas a seguir:

A primeira casuística (Casuística 1) consistiu de 1056 indivíduos do sexo masculino atendidos no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco (CEGH-CEL) pelo grupo de pesquisas em TEA sob a coordenação da Prof.a Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno, pelo período de 2001 a 2016. Esses pacientes têm sido encaminhados ao CEGH-CEL por psiquiatras ou neurologistas de instituições como Instituto de Psiquiatria (Ipq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas Santa Casa além de outros que realizaram o diagnóstico de TEA segundo critérios do DSM. Sempre que possível, esses pacientes foram reavaliados pela psicóloga do grupo (atualmente Dra. Elaine Zacchi) levando em conta os critérios da Escala de Classificação de Autismo na Infância, CARS, (Schopler *et al.*, 2002) e Escala de Comportamento Adaptativo de Vineland 2a Ed (Sparrow *et al.*, 1984). Aos pais ou responsáveis desses indivíduos foi aplicado um questionário sobre os dados da gestação, parto e desenvolvimento neuropsicomotor inicial da criança. Esses mesmos responsáveis foram convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido. Esta casuística foi utilizada para se estimar a frequência da pré-mutação entre indivíduos do sexo masculino com TEA.

A segunda casuística (Casuística 2) consistiu de indivíduos do sexo masculino encaminhados ao laboratório de genética humana do Departamento de Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, que fazem parte de famílias de afetados pela Síndrome do Cromossomo X frágil e que foram molecularmente detectados como portadores de pré-mutação no gene *FMR1*. Esta casuística foi averiguada no serviço de aconselhamento genético deste

laboratório sob a coordenação da Prof.a Dra. Angela Maria Vianna-Morgante no qual cerca de 380 famílias de afetados pela síndrome do cromossomo X frágil foram molecularmente investigadas desde 1991. O prontuário destes pacientes foi consultado, visando identificar a frequência de indivíduos com a pré-mutação para os quais há relatos de quadro clínico compatível com TEA.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob o escopo do projeto maior intitulado “Análise genômica e funcional dos transtornos do espectro autista: perspectivas de novas ferramentas de diagnóstico precoce” – parecer número 1.133.486.

3.2 Etapas da pesquisa:

O estudo foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

- a) Levantamento da incidência de pré-mutados entre os pacientes encaminhados ao Centro de Pesquisas Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) - grupo de pesquisas em TEA (casuística 1).
- b) Levantamento dos indivíduos com diagnóstico de TEA, portadores da pré-mutação por meio de consulta ao arquivo do Laboratório de Genética Humana do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (casuística 2).
- c) Para os pacientes da casuística 1 (CEGH-CEL, grupo de TEA) que corresponderam ao perfil selecionado (pacientes com TEA pré-mutados) foram realizados exames complementares, cariótipo e array CGH (*Microrray-based Comparative Genomic Hybridization*), para avaliar a presença de outras possíveis alterações genéticas, que não a pré-mutação, que explicassem o quadro clínico.
- d) Aconselhamento genético aos familiares dos pacientes que assim o desejaram.

3.3 Métodos laboratoriais:

3.3.1 Análise da região 5' UTR do gene *FMR1*:

Todos os indivíduos (n= 1056) do sexo masculino com TEA, da casuística 1 foram testados para a Síndrome do X frágil. Os testes foram realizados no CEGH-CEL pela bióloga Vanessa Takahashi, De 2001 a 2009 os testes foram realizados por PCR (*polymerase chain reaction*), em gel de acrilamida seguindo o protocolo proposto por Hadad *et al.* (1996). De 2009 em diante foi efetuada uma modificação no protocolo original e as amostras de DNA passaram a ser amplificadas com um *primer* fluorescente e os produtos da PCR passaram a ser analisados em sequenciador ABI 3730. Os protocolos detalhados estão disponíveis no anexo A.

Os resultados positivos, revelando alelos expandidos, obtidos na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram confirmados por *Sothorn Blot* e em alguns casos por meio de um kit comercial para PCR (Assuragen®) pelo grupo da Prof.a Angela Vianna-Morgante no Laboratório de Genética Humana do Departamento de Biologia Evolutiva do IB-USP. Os mesmos métodos foram utilizados para testar os pacientes da casuística 2.

3.3.2 Outros testes moleculares:

Os 2 pacientes com TEA e portadores da pré-mutação da casuística 1 foram também testados para avaliação de outras alterações genéticas além da pré-mutação. Sendo assim para o paciente 1 (F002269-1) foi realizado *array* CGH pela Dra. Carla Rosemberg (*microarray* genômico CytoSNP-850K – Illumina Technologies). O paciente 2 (F10687-1) realizou cariótipo em laboratório particular. O exame *array* CGH foi realizado pela bióloga Claudia Costa no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Para essa finalidade foi utilizada uma lâmina customizada de resolução 180 K desenvolvida para pesquisa. Essa lâmina inclui um total de 1527 genes associados a TEA e outras doenças neuropsiquiátricas.

4. Resultados:

4.1 Casuística 1 – Pacientes encaminhados ao grupo de pesquisa em TEA do CEGH-CEL

4.1.1 Análise das expansões do gene *FMR1*

O teste para expansões no gene *FMR1* foi realizado em um total de 1055 pacientes do sexo masculino no período de 2001 até dezembro de 2016 (Tabela 3). Foram identificados 29 indivíduos com expansões no gene *FMR1* no total, dos quais 27 portadores da mutação completa (2,56%) e 2 pacientes (0,19%) portadores da pré-mutação com expansões na faixa de (CGG)₆₅ no caso do paciente 1 (F002269-1) e (CGG)₆₂ - paciente 2. Não foi possível em nosso trabalho levantar a frequência de pacientes com expansões na faixa intermediária (*gray-zone*) devido a limitações metodológicas. Conforme já explicado em material e métodos nossos dados foram obtidos por metodologias diferentes, sendo parte deles por *southern blot* cuja resolução não permite a delimitação dessa categoria.

Tabela 3: Proporção de pacientes com TEA que apresentam expansões no gene *FMR1*.

	Número de indivíduos	Porcentagem
Normais	1026	97,25%
Pré-mutação	2	0,19%
Mutação completa	27	2,56%
Total	1055	100%

4.1.2 Testes genéticos complementares em pacientes com pré-mutação

Paciente 1 (F002269-1)

O paciente 1 (F002269-1), encaminhado com diagnóstico de TEA, filho de casal não consanguíneo, contava 5 anos à época da consulta. Nasceu com 40

semanas de parto por cesariana ao cabo de uma gestação sem complicações pesando 2,5 kg e 45 cm de comprimento. Teve atraso no desenvolvimento, andou com 2 anos e meio e à época da consulta não falava.

O levantamento da genealogia não revelou casos semelhantes na família (figura 1). Os demais integrantes da família materna foram testados para expansões no gene *FMR1* e verificou-se que a avó materna revelou um alelo normal enquanto que mãe e a tia pelo lado materno são portadoras da pré-mutação, herdada provavelmente de seu pai (avô do probando).

O exame de array CGH no paciente revelou uma deleção intersticial de aproximadamente 1,3 Mb no braço curto do cromossomo 4 arr(GRCh37), 4p16.3(1,190,518-2,505,091)x1.

Figura 1- Heredograma representando a família do paciente 1 (F02269-1)

Paciente 2 (F10687-1)

O paciente 2 (F10687-1), primeiro filho de casal não consanguíneo, nasceu com 38 semanas ao cabo de uma gestação sem complicações pesando 3,25 kg. A criança foi encaminhada com diagnóstico de TEA. Na época da consulta contava 7 anos e oito meses e falava apenas algumas palavras. Na avaliação realizada pela psicóloga obteve 36 pontos de acordo com a escala CARS, pontuação limite entre autismo em grau leve a moderado e autismo grave, 54 pontos na escala Vineland indicando comportamento adaptativo baixo.

O levantamento da genealogia revelou dois casos semelhantes (figura 2), um de TEA e outro de deficiência intelectual pelo lado da avó materna. O teste para mutações no gene *FMR1* nas pessoas em risco de serem portadores da pré-mutação foi realizado, com exceção de uma tia que preferiu não ser testada e revelou que a avó materna é portadora da pré-mutação.

O paciente possui cariótipo normal e o exame molecular para síndrome do X frágil (PCR) revelou um alelo com 62 repetições CGG na faixa da pré-mutação. Para esse paciente foi realizado exame de array CGH 180 K o qual detectou uma deleção de cerca de 330kb no braço curto do cromossomo 20 - 20p12.1 (15173239-15177728)x1 envolvendo o gene *MACROD2*. A mãe do paciente também foi testada sendo que a deleção não foi encontrada nesta. Não foi possível testar o pai do paciente.

Figura 2- Heredograma representando a família do paciente 2 (F10687-1)

4.2 Casuística 2 - Indivíduos do sexo masculino testados no do laboratório de genética humana do Departamento de Biologia Evolutiva do I B - USP

4.2.1 Análise das expansões do gene *FMR1*

O levantamento revelou um total de 86 indivíduos portadores da pré-mutação do gene *FMR1*. Esses indivíduos são provenientes de um total de 822 indivíduos do sexo masculino testados quanto às expansões do gene *FMR1* oriundos de famílias de afetados pela síndrome do X frágil. Desse total, 530 possuem a mutação completa, 206 são normais para as expansões do *FMR1* e 86 possuem a pré-mutação.

Dos 86 portadores da pré-mutação 12 reportaram alguns problemas. Dos menores de 18 anos, 1 reportou atraso no desenvolvimento e dificuldade de aprendizagem, 1 reportou deficiência intelectual e três reportaram dificuldade de aprendizagem. Dos indivíduos adultos (maiores de 18 anos) 5 reportaram FXTAS, 1 perda de memória e 1 temor intencional. Nenhum dos indivíduos reportou diagnóstico de TEA. O resumo destas condições está na tabela 4.

Tabela 4: Características dos pacientes do laboratório de genética humana IB- USP com a pré-mutação no gene *FMR1* que apresentaram distúrbios

Pacientes:	Faixa etária	Quadro clínico:
1	0 a 18 anos	Atraso no desenvolvimento e dificuldade de aprendizagem
2	0 a 18 anos	Dificuldade de aprendizagem
3	0 a 18 anos	Dificuldade de aprendizagem
4	0 a 18 anos	Dificuldade de aprendizagem
5	0 a 18 anos	Deficiência intelectual

6 a 10	>18 anos	FXTAS
11	>18 anos	Tremor intencional
12	>18 anos	Perda de memória

5. Discussão

5.1 Análise de expansões no gene *FMR1* na casuística do CEGH-CEL – grupo de pesquisa em TEA

O presente trabalho relacionou a frequência da pré-mutação e a mutação completa do gene *FMR1* à ocorrência dos TEA em uma amostra brasileira de 1026 pacientes do sexo masculino. Este dado havia sido anteriormente levantado por Moreira (2012) na época contando com 409 pacientes do sexo masculino testados, indicando frequência da pré-mutação e mutação completa de 0,2 e 3,2% respectivamente. A ampliação da nossa amostra não alterou significativamente esses valores. A frequência da mutação completa entre os pacientes do sexo masculino com TEA de 2,5% está dentro da faixa reportada na literatura que varia entre 6% (2 em 30) em Estécio et al. (2002), 2,2% (7 em 316) em Reddy (2005) e 0,5% (1 em 180) em Roesser (2011) e 0,13% em Shen et al. (2010) este último em uma frequência bem mais baixa que os demais talvez em função de um viés de averiguação discutido pelos próprios autores já que nessa amostra só havia 11% de pacientes com deficiência intelectual, o que destoa das demais coortes de pacientes com TEA.

A frequência da pré-mutação no presente trabalho entre os pacientes com TEA é de 0,19% (2 pacientes em 1055 testados), sendo a nossa a maior casuística na qual foi realizada essa análise. Esse valor não difere daqueles encontrados para a população em geral na literatura que variam de 0,16% em trabalho de revisão de

Song et al.(2003) com dados de vários países até 0,4% (Fernandez Carvajal. 2009) para levantamento realizado na Espanha, conforme visto na tabela 1.

Embora vários trabalhos na literatura venham chamando a atenção sobre o possível papel da pré-mutação na etiologia dos TEA (Aziz et al. 2003; Clifford et al. 2007; Farzin et al. 2006) poucos são os trabalhos que verificaram a proporção de pré-mutados em uma amostra de autistas que supostamente deveriam estar enriquecidas de pacientes pré-mutados caso a força dessa relação fosse relevante. No trabalho de Tassone et al. (2012) foi encontrado 1 menino pré-mutado dentre 391 meninos com TEA (0.25%). Shen et al. (2010) em uma coorte de 755 pacientes com TEA do sexo masculino não encontrou nenhum com a pré-mutação. Roesser (2011) testando 180 meninos com TEA identificou 2 com a pré-mutação (1%).

Nossos resultados são discrepantes em relação aos de Shekari-Khaniani (2017) que encontraram uma frequência de 4 portadores da pré-mutação em 96 pacientes Iranianos com TEA (cerca de 4%) comparados com 1 em 168 controles. A amostra dos autores, no entanto, é bastante pequena para efeito de comparação.

Quanto aos nossos estudos de caso, ambos os pacientes com TEA que são portadores da pré-mutação apresentaram também uma CNV. O paciente 1 (F02269-1) apresentou uma deleção em 4p16.3. Esta região está incluída no segmento classicamente deletado na síndrome de Wolf-Hirshhorn que inclui os genes *LETM1*, *HWSC1* e *CTBP1* entre outros. Esses genes de acordo com Zolino et al. (2008) e Maas et al. (2017) são responsáveis pelas características principais da síndrome sendo o *LETM1* relacionado a convulsões, *CTBP1* possivelmente relacionado a convulsões e *HWSC1* às características faciais.

Embora não seja comum, há registro na literatura de pacientes com TEA em grupos de pacientes com síndrome de Wolf-Hirshhorn. Recentemente em nossa casuística do CEGH-CEL foi identificado outro paciente com esta síndrome, encaminhado com diagnóstico de TEA, porém, com uma deleção maior com cerca de 5,5 Mb. Fisch (2010) constatou 1 paciente em um grupo de 19 com a síndrome

de Wolf-Hirshhorn (5%) que preenchia os critérios para diagnóstico de TEA. A presença de características e de comorbidades comuns aos TEA como estereotípias, hipotonia, convulsões, limitações na linguagem e deficiência intelectual mostram uma sobreposição de sinais clínicos entre as duas condições o que poderia explicar esse diagnóstico. Além disso, as deleções como a desse paciente da nossa casuística, menores que 5 Mb, representam menos que 3% do conjunto de casos reportados. A maioria dos pacientes apresenta deleções maiores que estão associadas com características mais pronunciadas (Zolino et al. 2008; Battaglia, 2015).

O nosso segundo estudo de caso, o paciente 2 (F10687-1) apresentou uma deleção em 20p12.1 (15173239-15177728)x1 envolvendo o gene *MACROD2*. A função desse gene é pouco estudada, mas as evidências parecem apontar para a importância dessa variante para alteração do quadro clínico. No DGV (*Database of Genomic Variants*) as deleções nessa região são muito raras – 2 observadas em amostra de 29.084 pessoas. Além disso, variantes nesse gene têm sido reportadas em estudos de associação relacionadas à presença de traços autísticos (Anney et al 2010, Jones et al., 2014). CNVs nessa região têm sido reportadas em casos de esquizofrenia, TDAH e volume cerebral em esclerose múltipla (revisão de Jones et al., op. cit.).

5.2 Análise da relação de indivíduos afetados por TEA na casuística do laboratório de genética humana do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências - USP

Dentre os 86 portadores da pré-mutação nenhum reportou diagnóstico de TEA. Esses resultados são discrepantes da maioria dos trabalhos levantados aqui (Farzim et al. 2006; Clifford et al., 2007; Bailey et al, 2008) nos quais uma grande parte da amostra de pré-mutados apresentava TEA sugerindo uma forte relação entre TEA e a pré-mutação. Deve-se ressaltar, no entanto, que no caso deste trabalho a amostra toda de pacientes foi computada e não parte dela como nos

referidos trabalhos. Além disso, esta amostra é destituída de viés, sendo todos os indivíduos testados parentes de afetados pela síndrome do X frágil e não pacientes encaminhados com algum quadro clínico. Outra diferença importante refere-se ao fato de que no caso desse trabalho não foram realizadas avaliações nos pacientes para se aferir o grau ou traços de TEA. As informações discutidas aqui foram baseadas nos relatos dos pacientes ao se apresentarem na consulta para realizar o teste para expansões do gene *FMR1*. Dessa maneira, as formas mais brandas ou sub-clínicas de TEA, como avaliadas em Schneider et al (2016) podem não ter sido equacionadas.

6. Conclusões:

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

A proporção de portadores da pré-mutação dentro da nossa casuística de pacientes com TEA do sexo masculino foi de 0,19%, o que se aproxima da frequência da pré-mutação entre os homens na população em geral.

Os dois pacientes portadores da pré-mutação identificados na casuística de pacientes com TEA apresentaram também uma CNV patogênica.

Não foram encontrados indivíduos do sexo masculino diagnosticados com TEA na amostra de pré-mutados parentes de afetados pela síndrome do X frágil.

Esses resultados não corroboram uma associação casual, apontada por vezes na literatura, entre a pré-mutação no gene *FMR1* e TEA ao menos nas suas formas mais graves.

7. Referências bibliográficas

Allingham-Hawkins, D. J., Babul-Hirji, R., Chitayat, D., Holden, J. J., Yang, K. T., Lee, C., ... & Jenkins, E. C. (1999). Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study—preliminary data. *American journal of medical genetics*, 83(4), 322.

Alvarez-Mora, M. I., Rodriguez-Revenga, L., Madrigal, I., Garcia-Garcia, F., Duran, M., Dopazo, J., ... & Mila, M. (2015). Deregulation of key signaling pathways involved in oocyte maturation in *FMR1* premutation carriers with Fragile X-associated primary ovarian insufficiency. *Gene*, 571(1), 52-57.

Anney, R., Klei, L., Pinto, D., Almeida, J., Bacchelli, E., Baird, G., ... & Brennan, S. (2012). Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Human molecular genetics*, 21(21), 4781-4792.

Aziz, M., Stathopulu, E., Callias, M., Taylor, C., Turk, J., Oostra, B., ... & Patton, M. (2003). Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 121(1), 119-127.

Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine*, 25(1), 63-77.

Bailey, D. B., Raspa, M., Olmsted, M., & Holiday, D. B. (2008). Co-occurring conditions associated with *FMR1* gene variations: Findings from a national parent survey. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(16), 2060-2069.

Basu, S. N., Kollu, R., & Banerjee-Basu, S. (2008). AutDB: a gene reference resource for autism research. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D832-D836.

Bauman, M. L. (2010). Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics*, 7(3), 320-327.

Besterman, A. D., Wilke, S. A., Mulligan, T. E., Allison, S. C., Hagerman, R., Seritan, A. L., & Bourgeois, J. A. (2014). Towards an understanding of neuropsychiatric manifestations in fragile X premutation carriers. *Future neurology*, 9(2), 227-239.

Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(9), 551.

Bourgeron, T. (2016). Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *Comptes rendus biologies*, 339(7), 300-307.

Brown, W. T., Jenkins, E. C., Friedman, E., Brooks, J., Wisniewski, K., Raguthu, S., & French, J. (1982). Autism is associated with the fragile-X syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 12(3), 303-308.

Brunoni, D. Mercadante, M. Schwartzman, J. S. transtornos do espectro do autismo. In: Lopes, A. C. *Clínica médica. Diagnóstico e tratamento*. 6 vol. 6254 p. Ateneu: São Paulo, 2014

Butman, J., & Allegri, R. F. (2001). Social cognition and the brain cortex. *Psicologia: Reflexão E Crítica*, 14(2), 275-279.

Buxbaum, J. D., Daly, M. J., Devlin, B., Lehner, T., Roeder, K., State, M. W., & Autism Sequencing Consortium. (2012). The autism sequencing consortium: large-scale, high-throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron*, 76(6), 1052-1056.

Capelli, L. P., Mingroni-Netto, R. C., & Vianna-Morgante, A. M. (2005). Structure and stability upon maternal transmission of common and intermediate *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1) alleles in a sample of the Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), 10-15.

Capelli, L. P. 2007 Estudos de repetição CGG do gene *FMR1*: I Caracterização de alelos propensos à instabilidade II. A história contada pelos alelos dos macacos do novo e do Velho Mundo III. A pré-mutação como causa de doença neurodegenerativa. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo: 213 p.

Chen, L., Hadd, A. G., Sah, S., Houghton, J. F., Filipovic-Sadic, S., Zhang, W., ... & Latham, G. J. (2011). High-resolution methylation polymerase chain reaction for fragile X analysis: evidence for novel *FMR1* methylation patterns undetected in Southern blot analyses. *Genetics in Medicine*, 13(6), 528-538.

Chen, Y., Tassone, F., Berman, R. F., Hagerman, P. J., Hagerman, R. J., Willemsen, R., & Pessah, I. N. (2010). Murine hippocampal neurons expressing *Fmr1* gene premutations show early developmental deficits and late degeneration. *Human molecular genetics*, 19(1), 196-208.

Chonchaiya, W., Au, J., Schneider, A., Hessler, D., Harris, S. W., Laird, M., ... & Hagerman, R. J. (2012). Increased prevalence of seizures in boys who were probands with the *FMR1* premutation and co-morbid autism spectrum disorder. *Human genetics*, 131(4), 581-589.

Coffey, S. M., Cook, K., Tartaglia, N., Tassone, F., Nguyen, D. V., Pan, R., ... & Doerflinger, M. (2008). Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146(8), 1009-1016.

Cordeiro, L., Abucayan, F., Hagerman, R., Tassone, F., & Hessler, D. (2015). Anxiety disorders in fragile X premutation carriers: Preliminary characterization of probands and non-probands. *Intractable & rare diseases research*, 4(3), 123.

Cornish, K., Kogan, C., Turk, J., Manly, T., James, N., Mills, A., & Dalton, A. (2005). The emerging fragile X premutation phenotype: evidence from the domain of social cognition. *Brain and cognition*, 57(1), 53-60.

Constantino, J. N. (2011). The quantitative nature of autistic social impairment. *Pediatric research*, 69(5 Pt 2), 55R

Clifford, S., Dissanayake, C., Bui, Q. M., Huggins, R., Taylor, A. K., & Loesch, D. Z. (2007). Autism spectrum phenotype in males and females with fragile X full mutation and premutation. *Journal of autism and developmental disorders*, 37(4), 738-747.

Cohen, I. L., Sudhalter, V., Pfadt, A., Jenkins, E. C., Brown, W. T., & Vietze, P. M. (1991). Why are autism and the fragile-X syndrome associated? Conceptual and methodological issues. *American journal of human genetics*, 48(2), 195.

Constantino, J. N., Zhang, Y., Frazier, T., Abbacchi, A. M., & Law, P. (2010). Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *American Journal of Psychiatry*, 167(11), 1349-1356.

Constantino, J. N. (2011). The quantitative nature of autistic social impairment. *Pediatric Research* 69(5 Pt 2): 55R-62 R.

[Devys D](#), [Lutz Y](#), [Rouyer N](#), [Bellocq JP](#), [Mandel JL](#). 1993 The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. [Nat Genet](#). Aug;4(4):335-40

Courchesne, E., Carper, R., & Akshoomoff, N. (2003). Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *Jama*, 290(3), 337-344.

De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., ... & Singh, T. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526), 209-215.

Devlin, B., & Scherer, S. W. (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current opinion in genetics & development*, 22(3), 229-237.

Dorn, M. B., Mazzocco, M. M., & Hagerman, R. J. (1994). Behavioral and psychiatric disorders in adult male carriers of fragile X. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 33(2), 256-264.

Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C. & Yasamy, M. T. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Research*, 5(3), 160-179.

Ennis, S., Ward, D., & Murray, A. (2006). Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *European journal of human genetics*, 14(2), 253-255.

Estécio, M. R. H., Fett-Conte, A. C., Varella-Garcia, M., Fridman, C., & Silva, A. E. (2002). Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 32(1), 35-41.

Famula, J., Basuta, K., Gane, L. W., Hagerman, R. J., & Tassone, F. (2015). Identification of a male with fragile X syndrome through newborn screening. *Intractable & rare diseases research*, 4(4), 198-202.

Fernandez-Carvajal, I., Walichiewicz, P., Xiaosen, X., Pan, R., Hagerman, P. J., & Tassone, F. (2009). Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(4), 324-329.

Filipovic-Sadic, S., Sah, S., Chen, L., Krosting, J., Sekinger, E., Zhang, W., ... & Tassone, F. (2010). A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clinical Chemistry*, 56(3), 399-408.

Fisch, G. S. (1992). Is autism associated with the fragile X syndrome?. *American Journal of Medical Genetics*, 43(1-2), 47-55.

Franke, P., Leboyer, M., Gänsicke, M., Weiffenbach, O., Biancalana, V., Cornillet-Lefebvre, P., ... & Hautzinger, M. (1998). Genotype–phenotype relationship in female carriers of the premutation and full mutation of FMR-1. *Psychiatry research*, 80(2), 113-127.

Gómez, M.K.A. Estudo dos alelos da região 5' UTR do gene FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) em homens da população geral de Salvador. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de pesquisas Gonçalo Muniz. 2011. 75 p.

Gosset, A., Sansone, S., Schneider, A. Hessler, D. *Psychiatric disorders among women with the fragile X premutation without children affected by fragile X syndrome* American Journal of Medical Genetics Part B *Neuropsychiatric Genetics* · September 2016

Grabrucker, A. M. (2013). Environmental factors in autism. *Frontiers in Psychiatry*, 3, 118.

Greco, C. M., Hagerman, R. J., Tassone, F., Chudley, A. E., Del Bigio, M. R., Jacquemont, S., ... & Hagerman, P. J. (2002). Neuronal intranuclear inclusions in a

new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain*, 125(8), 1760-1771.

Haddad, L. A., Mingroni-Netto, R. C., Vianna-Morgante, A. M., & Pena, S. D. (1996). A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Human genetics*, 97(6), 808-812.

Haddad, L. A., Aguiar, M. J., Costa, S. S., Mingroni-Netto, R. C., Vianna-Morgante, A. M., & Pena, S. D. (1999). Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 84(3), 198-201.

Hagerman, R. J., Jackson, A. W., Levitas, A., Rimland, B., Braden, M., Opitz, J. M., & Reynolds, J. F. (1986). An analysis of autism in fifty males with the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 23(1-2), 359-374.

Hagerman, R. J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., ... & Hagerman, P. J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*, 57(1), 127-130.

Hagerman, P. J. (2008). The fragile X prevalence paradox. *Journal of medical genetics*, 45(8), 498-499.

Hagerman, R. J., Staley, L. W., O'Conner, R., Lugenbeel, K., Nelson, D., McLean, S. D., & Taylor, A. (1996). Learning-disabled males with a fragile X CGG expansion in the upper premutation size range. *Pediatrics*, 97(1), 122-126.

Hagerman, R., & Hagerman, P. (2011). FMR1 premutation and full mutation molecular mechanisms related to autism. *Journal of neurodevelopmental disorders*, 3(3), 211.

Hagerman, R., & Hagerman, P. (2013). Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *The Lancet Neurology*, 12(8), 786-798.

Hagerman, P. J., & Hagerman, R. J. (2015). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1338(1), 58-70.

HAHLER, Eva-Maria; ELSABBAGH, Mayada. Autism: a global perspective. *Current Developmental Disorders Reports*, v. 2, n. 1, p. 58-64, 2015.

Harris, S. W., Hessler, D., Goodlin-Jones, B., Ferranti, J., Bacalman, S., Barbato, I., ... & Hagerman, R. J. (2008). Autism profiles of males with fragile X syndrome. *American Journal on Mental Retardation*, 113(6), 427-438.

Hessl, D., Tassone, F., Loesch, D. Z., Berry-Kravis, E., Leehey, M. A., Gane, L. W., ... & Grigsby, J. (2005). Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 139(1), 115-121.

Hessl, D., Rivera, S., Koldewyn, K., Cordeiro, L., Adams, J., Tassone, F., ... & Hagerman, R. J. (2007). Amygdale dysfunction in men with the fragile X premutation. *Brain*, 130(2), 404-416.

Hessl, D., Wang, J. M., Schneider, A., Koldewyn, K., Le, L., Iwahashi, C., ... & Rivera, S. M. (2011). Decreased fragile X mental retardation protein expression underlies amygdale dysfunction in carriers of the fragile X premutation. *Biological psychiatry*, 70(9), 859-865.

Huguet, G., Ey, E., & Bourgeron, T. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annual review of genomics and human genetics*, 14, 191-213.

Hunter, J. E., Abramowitz, A., Rusin, M., & Sherman, S. L. (2009). Is there evidence for neuropsychological and neurobehavioral phenotypes among adults without FXTAS who carry the *FMR1* premutation? A review of current literature. *Genetics in medicine*, 11(2), 79-89.

Hunter, J., Rivero-Arias, O., Angelov, A., Kim, E., Fotheringham, I., & Leal, J. (2014). Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(7), 1648-1658.

Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., ... & Kendall, J. (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*, 74(2), 285-299.

Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M. A., Hall, D. A., Levine, R. A., Brunberg, J. A., ... & Herman, K. (2004). Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *Jama*, 291(4), 460-469.

Jacquemont, M. L., Sanlaville, D., Redon, R., Raoul, O., Cormier-Daire, V., Lyonnet, S., ... & Prieur, M. (2006). Array-based comparative genomic hybridization identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *Journal of medical genetics*, 43(11), 843-849.

Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Hagerman, P. J., & Leehey, M. A. (2007). Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *The Lancet Neurology*, 6(1), 45-55.

Jones, K. B., Cottle, K., Bakian, A., Farley, M., Bilder, D., Coon, H., & McMahon, W. M. (2016). A description of medical conditions in adults with autism spectrum disorder: A follow-up of the 1980s Utah/UCLA Autism Epidemiologic Study. *Autism*, 20(5), 551-561.

Klei, L., Sanders, S. J., Murtha, M. T., Hus, V., Lowe, J. K., Willsey, A. J., ... & Grice, D. E. (2012). Common genetic variants, acting additively, are a major source of risk for autism. *Molecular autism*, 3(1), 9.

Kleijer, K. T., Huguet, G., Tastet, J., Bourgeron, T., & Burbach, J. P. H. (2017). Anatomy and Cell Biology of Autism Spectrum Disorder: Lessons from Human Genetics. In *Translational Anatomy and Cell Biology of Autism Spectrum Disorder* (pp. 1-25). Springer International Publishing.

Krishnan, A., Zhang, R., Yao, V., Theesfeld, C. L., Wong, A. K., Tadych, A., ... & Troyanskaya, O. G. (2016). Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nature neuroscience*, 19(11), 1454-1462.

Iliff, A. J., Renoux, A. J., Krans, A., Usdin, K., Sutton, M. A., & Todd, P. K. (2012). Impaired activity-dependent FMRP translation and enhanced mGluR-dependent LTD in Fragile X premutation mice. *Human molecular genetics*, 22(6), 1180-1192.

Liu, J., Kościelska, K. A., Cao, Z., Hulsizer, S., Grace, N., Mitchell, G., ... & Hagerman, R. J. (2012). Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Human molecular genetics*, dds207.

LOESCH, Danuta Z. et al. Linking the FMR1 alleles with small CGG expansions with neurodevelopmental disorders: preliminary data suggest an involvement of epigenetic mechanisms. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 149, n. 10, p. 2306-2310, 2009.

Loesch, D. Z., Bui, M. Q., Hammersley, E., Schneider, A., Storey, E., Stimpson, P., ... & Hagerman, R. J. (2015). Psychological status in female carriers of premutation FMR1 allele showing a complex relationship with the size of CGG expansion. *Clinical genetics*, 87(2), 173-178.

López-Mourelo, O., Mur, E., Madrigal, I., Alvarez-Mora, M. I., Gómez-Ansón, B., Pagonabarraga, J. & Milà, M. (2017). Social anxiety and autism spectrum traits among adult FMR1 premutation carriers. *Clinical genetics*, 91(1), 111-114.

Losh, M., Childress, D., Lam, K., & Piven, J. (2008). Defining key features of the broad autism phenotype: A comparison across parents of multiple-and single-incidence autism families. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147(4), 424-433.

Lozano, R., Hagerman, R. J., Duyzend, M., Budimirovic, D. B., Eichler, E. E., & Tassone, F. (2014). Genomic studies in fragile X premutation carriers. *Journal of neurodevelopmental disorders*, 6(1), 1.

Lozano, R.; Rosero, C. A.; Hagerman, R. J. Fragile X spectrum disorders. *Intractable & rare diseases research*, v. 3, n. 4, p. 134-146, 2014.

Maas, N. M. C., Van Buggenhout, G., Hannes, F., Thienpont, B., Sanlaville, D., Kok, K., ... & Hordijk, R. (2008). Genotype–phenotype correlation in 21 patients with Wolf–Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridization (CGH). *Journal of medical genetics*, 45(2), 71-80.

Masi, A., DeMayo, M. M., Glozier, N., & Guastella, A. J. (2017). An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options. *Neuroscience Bulletin*, 1-11.

Macpherson, J. N., & Murray, A. (2016). Development of genetic testing for Fragile X syndrome and associated disorders, and estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations. *Genes*, 7(12), 110.

McDuffie, A., Thurman, A. J., Hagerman, R. J., & Abbeduto, L. (2015). Symptoms of autism in males with fragile X syndrome: A comparison to nonsyndromic ASD using current ADI-R scores. *Journal of autism and developmental disorders*, 45(7), 1925-1937.

Mila, M., Alvarez-Mora, M. I., & Rodriguez-Revenga, L. (2017). Fragile X syndrome: an overview and update of the FMR1 gene. *Clinical Genetics*.

Mingroni-Netto, R. C. (1995) A síndrome do cromossomo X frágil. Sociedade brasileira de genética Série monografias n. 2, 47-109

Mingroni-Netto, R. C., Angeli, C. B., Auricchio, M. T., Leal-Mesquita, E. R., Ribeiro-dos-Santos, Â. K., Ferrari, I., ... & Vianna-Morgante, A. M. (2002). Distribution

of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 111(3), 243-252.

Mirzaa, G. M., Enyedi, L., Parsons, G., Collins, S., Medne, L., Adams, C. & Toriello, H. (2014). Congenital microcephaly and chorioretinopathy due to de novo heterozygous KIF11 mutations: five novel mutations and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(11), 2879-2886.

Moreira, D de P.(2012) Estudos de comorbidades e dos aspectos genéticos de pacientes com transtorno do espectro autista. *Dissertação de mestrado* . Instituto de Biociências. 93 p

Monaghan, K. G., Lyon, E., & Spector, E. B. (2013). ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 15(7), 575-586.

Mraz, K. D., Green, J., Dumont-Mathieu, T., Makin, S., & Fein, D. (2007). Correlates of head circumference growth in infants later diagnosed with autism spectrum disorders. *Journal of Child Neurology*, 22(6), 700-713.
Nolin, S. L. et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *The American Journal of Human Genetics*, v. 72, n. 2, p. 454-464, 2003.

Ostergaard, P., Simpson, M. A., Mendola, A., Vasudevan, P., Connell, F. C., van Impel, A., ... & Martinez-Corral, I. (2012). Mutations in KIF11 cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 90(2), 356-362.

Ozonoff, S., Young, G. S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L. & Hutman, T. (2011). Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*, 128(3), e488-e495.

Paula, C. S., Ribeiro, S. H., Fombonne, E., & Mercadante, M. T. (2011). Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41(12), 1738-1742.

Persico, A. M., & Bourgeron, T. (2006). Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends in neurosciences*, 29(7), 349-358.

Persico, A. M., & Napolioni, V. (2013). Autism genetics. *Behavioural brain research*, 251, 95-112.

Reddy, K. S. (2005). Cytogenetic abnormalities and fragile-X syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC medical genetics*, 6(1), 3.

Ross-Inta, C., Omanska-Klusek, A., Wong, S., Barrow, C., Garcia-Arocena, D., Iwahashi, C. & Giulivi, C. (2010). Evidence of mitochondrial dysfunction in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Biochemical Journal*, 429(3), 545-552.

Risch, N., Hoffmann, T. J., Anderson, M., Croen, L. A., Grether, J. K., & Windham, G. C. (2014). Familial recurrence of autism spectrum disorder: evaluating genetic and environmental contributions. *American Journal of Psychiatry*, 171(11), 1206-1213.

Roesser, J. (2011). Diagnostic yield of genetic testing in children diagnosed with autism spectrum disorders at a regional referral center. *Clinical pediatrics*, 50(9), 834-843.

Saffen, D. (2015). The genetic architecture of autism spectrum disorders (ASDs) and the potential importance of common regulatory genetic variants. *Science China Life Sciences*, 58(10), 968-975.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *Jama*, 311(17), 1770-1777.

Sato, A. (2016). mTOR, a potential target to treat autism spectrum disorder. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 15(5), 533-543.

Schopler, E., Reichler, R. J., & Renner, B. R. (2002). *The childhood autism rating scale (CARS)*. Los Angeles, CA: Western Psychological Services.

Schwartz, C. E., Dean, J., Howard-Peebles, P. N., Bugge, M., Mikkelsen, M., Tommerup, N.; Stevenson, R. E. (1994). Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. *American journal of medical genetics*, 51(4), 400-402.

Seltzer, M. M., Baker, M. W., Hong, J., Maenner, M., Greenberg, J., & Mandel, D. (2012). Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 159(5), 589-597.

Shen, Y., Dies, K. A., Holm, I. A., Bridgemohan, C., Sobeih, M. M., Caronna, E. B., ... & Weissman, L. (2010). Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 125(4), e727-e735.

Sidorov, M. S., Auerbach, B. D., & Bear, M. F. (2013). Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Molecular brain*, 6(1), 15.

Silva, F., Rodriguez-Revenga, L., Madrigal, I., Alvarez-Mora, M. I., Oliva, R., & Milà, M. (2013). High apolipoprotein E4 allele frequency in FXTAS patients. *Genetics in Medicine*, 15(8), 639-642.

Sparrow, S. S., Balla, D. A., Cicchetti, D. V., Harrison, P. L., & Doll, E. A. (1984). Vineland adaptive behavior scales.

Song, F. J., Barton, P., Sleightholme, V., Yao, G. L., & Fry-Smith, A. (2003). Screening for fragile X syndrome: a literature review and modelling study.

de Souza Reis, V. N., Kitajima, J. P., Tahira, A. C., Feio-dos-Santos, A. C., Fock, R. A., Lisboa, B. C. G. & Passos-Bueno, M. R. (2017). Integrative Variation Analysis Reveals that a Complex Genotype May Specify Phenotype in Siblings with Syndromic Autism Spectrum Disorder. *PloS one*, 12(1), e0170386.

Sullivan, A. K., Marcus, M., Epstein, M. P., Allen, E. G., Anido, A. E., Paquin, J. J., ... & Sherman, S. L. (2005). Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Human Reproduction*, 20(2), 402-412.

Tassone, F., Hagerman, R. J., Taylor, A. K., Gane, L. W., Godfrey, T. E., & Hagerman, P. J. (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 66(1), 6-15.

Tassone, F., Hagerman, R. J., Taylor, A. K., Mills, J. B., Harris, S. W., Gane, L. W., & Hagerman, P. J. (2000). Clinical involvement and protein expression in individuals with the FMR1 premutation. *American journal of medical genetics*, 91(2), 144-152.

Tassone, F., Iwahashi, C., & Hagerman, P. J. (2004). FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA biology*, 1(2), 103-105.

Tassone, F., Long, K. P., Tong, T. H., Lo, J., Gane, L. W., Berry-Kravis, E. & Hagerman, R. J. (2012). FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome medicine*, 4(12), 100.

de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L., & Geschwind, D. H. (2016). Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature medicine*, 22(4), 345-361.

Turner, T. N., Coe, B. P., Dickel, D. E., Hoekzema, K., Nelson, B. J., Zody, M. C. & Darnell, R. B. (2017). Genomic Patterns of De Novo Mutation in Simplex Autism. *Cell*, 171(3), 710-722.

Vianna-Morgante, A. M., Costa, S. S., Pares, A. S., & Verreschi, I. T. (1996). FRAXA premutation associated with premature ovarian failure. *American journal of medical genetics*, 64(2), 373-375.

Volkmar, F., Siegel, M., Woodbury-Smith, M., King, B., McCracken, J., & State, M. (2014). Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 53(2), 237-257.

Yrigollen, C. M., Martorell, L., Durbin-Johnson, B., Naudó, M., Genoves, J., Murgia, A., Finucane, B. (2014). AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *Journal of neurodevelopmental disorders*, 6(1), 24.

Zollino, M., Murdolo, M., Marangi, G., Pecile, V., Galasso, C., Mazzanti, L., & Neri, G. (2008). On the nosology and pathogenesis of Wolf–Hirschhorn syndrome: Genotype–phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 148, No. 4, pp. 257-269). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

ANEXO A – Protocolos para teste da síndrome do X frágil

Protocolos de Procedimentos do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB – USP

Título: Protocolo Geral para Diagnóstico da Síndrome do X Frágil por PCR

Código: XFRA-01

Versão: 02

Responsável pelo protocolo: Vanessa Naomi van Opstal Takahashi

Versão vigente desde: Nov/2009

Versão verificada e autorizada por:

Nome	Função	Data	Assinatura
Vanessa Naomi van Opstal Takahashi	Técnica responsável pelo exame e 1ª Conferente		
Martha Alessandra Beltrame de Oliveira Lima Cozzo	2ª Conferente		
Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno	Coordenadora do Setor de Prestação de Serviços do CEGH		

Localização da impressão original e das cópias autorizadas:

Local	Status da Impressão
Pasta 1 de Exame de X Frágil (cinza) – Armário do Escritório de Prestação de Serviços	Original
	Cópia Autorizada

1. Indicação do Exame

Este exame deverá ser realizado quando solicitado que se realize “Diagnóstico de Síndrome do X Frágil por PCR” e somente se a amostra for de um indivíduo do “sexo masculino”. Não deve ser feito esse tipo de exame caso o técnico receba solicitação de “Diagnóstico de Síndrome do X Frágil por *Southern Blotting*” ou se a amostra for de um indivíduo do “sexo feminino”

2. Atribuições

O técnico responsável pelo exame deve preparar a reação de PCR e analisar o resultado. Esse resultado deverá ser checado

paralelamente pelo técnico que fez o exame e também por um segundo conferente. Uma vez que o resultado tenha sido checado pelo segundo conferente e que esteja em concordância com a análise do técnico responsável, esse resultado deverá ser registrado.

Para pacientes particulares, o resultado deve ser enviado por e-mail para o líder do grupo de pesquisa em X Frágil (no caso, a Prof.a Dra. Angela Maria Vianna Morgante). Enviar a imagem do cromatograma juntamente com o resultado para que estes sejam analisados por ela. Se o resultado for normal para X Frágil, o relatório deverá ser confeccionado pelo próprio técnico responsável pelo exame no CEGH e assinado por este e pela Dra. Angela. O relatório deve ser deixado na secretaria já assinado para que a Dra. Angela possa assiná-lo também. Caso o resultado seja indicativo de mutação, ou seja, se a reação não apresentar o pico da região de repetições, então essa amostra deverá ser testada por *Southern Blotting* pela equipe da Dra. Angela. Nesse caso, a confecção do relatório será feita por eles sendo que o técnico responsável pela execução da PCR no CEGH não confeccionará nem assinará nenhum relatório. Em ambos os casos, a entrega do relatório ficará a cargo da Secretária do CEGH.

Para pacientes não particulares, como por exemplo, os pacientes do estudo de Autismo, o resultado deverá ser enviado por e-mail para os membros da equipe de pesquisa em Autismo e também para a técnica Lilian Calabro para que ela confeccione os relatórios dos pacientes cujo resultado for normal. Os relatórios deverão ser assinados pelo técnico responsável pelo exame, pelo segundo conferente e também pelo geneticista responsável pela equipe de pesquisa em Autismo. A entrega do relatório ficará a cargo da equipe de pesquisa. Caso o resultado seja indicativo de mutação, então essa amostra deverá ser testada por *Southern Blotting* pela equipe da Dra. Angela. Nesse caso, a confecção do relatório será feita por eles sendo que o técnico responsável pela execução da PCR e a equipe de Autismo não assinarão esse relatório. A entrega do relatório ficará a cargo da equipe da Dra. Angela.

3. Considerações Gerais

3.1. Gene *FMR-1* (Fragile X Mental Retardation 1)

A Síndrome do X Frágil é devida à expansão de uma sequência instável de trinucleotídeos (CGG)_n localizada na região 5' não traduzida do Gene *FMR-1*, mapeado em Xq27.3. O número de repetições varia normalmente de 6 a 54 em indivíduos normais. Indivíduos que possuem entre 54 e 200 repetições são considerados como portadores de pré-mutação e acima de 200 repetições, portadores de mutação completa. Essa síndrome é a forma mais comum de retardo mental familiar herdado. A prevalência estimada é de 4.4×10^{-4} dentre meninos e 4.1×10^{-4} dentre meninas [1].

3.2. Características Clínicas e Comportamentais

Disfunção cognitiva em síndrome do X Frágil inclui deficiências no trabalho e memória de curto prazo, função executiva, habilidades matemática e visual-espacial. Além da disfunção cognitiva, os pacientes de X Frágil mostram várias anormalidades físicas, tais como testículos grandes (macroorquidismo), displasia do tecido conjuntivo, aparência característica de um rosto comprido e estreito, orelhas grandes, distância interocular pequena, pés planos e, às vezes, juntas hiperextensíveis, calosidades nas mãos e estrabismo. Além disso, as habilidades de fala e linguagem são severamente afetadas nos indivíduos com síndrome do X Frágil, que muitas vezes exibem um comportamento autista, incluindo o contato visual pobre, discurso e comportamento persistente, rejeição ao contato, timidez, ansiedade social, agitação das mãos, bem como convulsões e eletroencefalograma consistente com epilepsia. Ansiedade e transtornos de humor, hiperatividade, impulsividade e comportamento agressivo também podem estar presentes [2].

3.3. Princípio do Método

O método utilizado foi retirado do artigo: Haddad, L. A.; Mingroni-Netto, R. C.; Vianna-Morgante, A. M. & Pena, S. D. J. (1996). A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet*, 97:808-812.

Esse método se baseia principalmente na dificuldade existente em amplificar produtos de PCR grandes. Os autores decidiram explorar essa dificuldade, estabelecendo condições de amplificação nas quais alelos com mutação completa têm a sua presença revelada exatamente pela falha na amplificação. Foi então desenvolvida uma PCR multiplex utilizando três *primers* de modo a amplificar a região polimórfica e também uma região de 223bp utilizada como controle da reação. Segundo os autores o teste é mais indicado para um

screening populacional da Síndrome do X Frágil em indivíduo do sexo masculino, e não para uma análise individual.

No artigo original, as amostras são analisadas em gel de acrilamida, como descrito no protocolo XFRA-03. Uma alternativa à análise em gel de acrilamida é correr as amostras amplificadas com um *primer* fluorescente num aparelho de análise de DNA, como um sequenciador de DNA, por exemplo, como descrito no protocolo XFRA-02. Dezoito amostras, dentre elas duas positivas para X Frágil, foram testadas por ambos os métodos e os resultados foram idênticos.

4. Controles utilizados

As reações devem ser sempre feitas acompanhadas de um controle branco (utilizando água ultrapura no lugar do DNA) e um controle normal (que deverá ser o DNA de um indivíduo do sexo masculino normal para X Frágil). A análise em gel de acrilamida deve ser feita acompanhada de um marcador de peso molecular de 50bp. A análise por fluorescência deve ser feita utilizando-se também um marcador de peso molecular fluorescente.

5. Fluxograma de trabalho

O fluxograma da página 6 indica os passos que devem ser seguidos para a análise das amostras.

- O DNA extraído deve ser testado rotineiramente pela PCR descrita no protocolo XFRA-02 utilizando *primer* marcado com fluorescência. Caso por algum motivo não seja possível analisar as amostras num aparelho que faça a leitura desses produtos fluorescentes, então se deve utilizar o protocolo XFRA-03 e analisar as reações em gel de acrilamida.
- Realizar o exame somente na alíquota 1 do robô. A alíquota 2 somente será utilizada caso a qualidade da alíquota 1 seja ruim.
- Após fazer as PCRs, analisar os resultados e verificar se o controle branco (com água) se apresenta limpo (sem sinais de amplificação). O controle normal deve apresentar a banda da região de repetições. Caso haja amplificação do controle branco

ou caso o controle normal não amplifique, todas as reações deverão ser repetidas. Diluir novamente os DNAs e fazer todas as preparações novamente.

- Para os pacientes cujo resultado foi normal, ou seja, para aqueles que apresentaram a banda da região de repetições, o resultado poderá ser liberado para que o relatório seja confeccionado. A confecção dos relatórios será feita como descrito no item 2 desse protocolo.
- Para os pacientes cujo resultado não for normal, ou seja, para aqueles que não apresentaram a banda da região de repetições, deverá ser feito o teste de *Southern Blotting* para determinar se o paciente ainda se apresenta dentro da zona de normalidade, se apresenta pré-mutação ou mutação completa. Deverá ser solicitado aos técnicos Roberto Rivelino ou Lilian Calabro que os tubos de DNA originais do paciente sejam separados (extrações I e II) para que sejam feitas alíquotas de 100uL de DNA. Essas alíquotas do DNA do paciente deverão ser entregues para a equipe de pesquisa em X Frágil para que o exame seja realizado. A confecção dos relatórios também será feita como descrito no item 2 desse protocolo.

6. Referências

- [1] Haddad, L. A.; Mingroni-Netto, R. C.; Vianna-Morgante, A. M. & Pena, S. D. J. (1996). A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet*, 97:808-812.
- [2] D'Hulst, C. & Kooy, R. F. (2009). Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy. *J Med Genet*, 46:577-584 .

Protocolos de Procedimentos do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB – USP

Título: Protocolo para Diagnóstico da Síndrome do X Frágil por PCR Utilizando *Primers* Fluorescentes

Código: XFRA-02

Versão: 02

Responsável pelo protocolo: Vanessa Naomi van Opstal Takahashi

Versão vigente desde: Nov/2009

Versão verificada e autorizada por:

Nome	Função	Data	Assinatura
Vanessa Naomi van Opstal Takahashi	Técnica responsável pelo exame e 1ª Conferente		
Martha Alessandra Beltrame de Oliveira Lima Cozzo	2ª Conferente		
Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno	Coordenadora do Setor de Prestação de Serviços do CEGH		

Localização da impressão original e das cópias autorizadas:

Local	Status da Impressão
Pasta 1 de Exame de X Frágil (cinza) – Armário do Escritório de Prestação de Serviços	Original
	Cópia Autorizada

7. Considerações Gerais

Para a realização deste exame, ler previamente o protocolo XFRA-01 que contém as informações gerais sobre o exame. O técnico responsável pelo diagnóstico de X Frágil por PCR é responsável por executar os procedimentos de acordo com o descrito neste protocolo.

8. Relação de Equipamentos

- Freezer -20°C Consul, modelo compacto 100

- Freezer -80°C Thermo Forma, modelo -86C ULT
- Geladeira Electrolux DFF44 Premium
- Máquina de gelo picado Scotsman
- Autoclave vertical Phoenix, modelo AV-30
- Micropipetas monocal Eppendorf P2,5-P10-P20-P100-P200-P1000
- Micropipetas multicanal Eppendorf P10-P100
- Sistema de ultrafiltração de água Millipore, modelo Elix 5
- Sistema de ultrafiltração de água Millipore, modelo MilliQ Académic
- Espectrofotômetro Nanodrop ND-1000
- Termociclador MJ Research, modelo PTC-200
- *No-break* APC Back UPS CS 500
- Microcentrífugas Eppendorf, modelos MiniSpin-5452 e 5415D
- Sistema de Análise de DNA ABI3730, Applied Biosystems

Obs: equivalentes poderão ser utilizados

9. Relação de Reagentes, Consumíveis e Demais Aparatos

- Microtubos Axygen 0,2mL-0,5mL-1,5mL
- Recipiente de isopor para gelo picado
- Estantes para acomodar tubos de 0,2mL-0,5mL-1,5mL
- Ponteiros Axygen 10uL-200uL-1000uL
- Taq Polimerase (5U/uL), Tampão de PCR 10X e $MgCl_2$ 50mM, Invitrogen
- dATP- dTTP- dCTP- dGTP 100mM, GE Healthcare
- 7deaza dGTP 5mM, GE Healthcare
- DMSO, dimetilsulfóxido, Sigma
- *Size Standard* GS-500, Applied Biosystems
- Formamida Hi-Di, Applied Biosystems

Obs: equivalentes poderão ser utilizados

10. Relação de Soluções

- **dNTP (1,25mM - 75% 7deaza dGTP):**
Num microtubo, homogeneizar: **5uL** dATP (100mM), **5uL** dTTP (100mM), **5uL** dCTP (100mM), **1,25uL** dGTP (100mM), **75uL** 7-deaza dGTP (5mM) e **308,75uL** H₂O MilliQ (Total: **400uL**)
Estocar em *freezer* -20°C.

- **Work Solution de 2 primers (7,5uM Eag-U-6FAM / 7,5uM f):**
Num microtubo, homogeneizar: **7,5uL primer Eag-U** (100uM), **7,5uL primer f** (100uM) e **85uL H₂O MilliQ** (Total: **100uL**)
Estocar em freezer -20°C.
- **Work Solution de 3 primers (7,5uM Eag-U-6FAM / 5uM f / 2uM Eag-L):**
Num microtubo, homogeneizar: **7,5uL primer Eag-U** (100uM), **2uL primer Eag-L** (100uM), **5uL primer f** (100uM) e **85,5uL H₂O MilliQ** (Total: **100uL**)
Estocar em freezer -20°C.

11. Primers e Sequência Referência

Sequência referência: gi|1668818|gb|L29074.1|HUMFMR1S Homo sapiens fragile X mental retardation syndrome protein (FMR1) gene, alternative splice products, complete cds; and pseudogene, complete sequence

⇒ *Primers* utilizados (em cinza):

Primer Fwd - **Eag-U** – 5' **6FAM**-cgacctgtcaccgcccttcagccttcc 3'

Primer Rev-1 - **Eag-L** – 5' cgctgcgggtgtaaacactgaaaccacgctc 3'

Primer Rev-2 - **f** – 5' agccccgcacttccaccaccagctcctcca 3'

⇒ região em itálico e sublinhada: primeiro exon

```

13021 ggcgagtagc tgggtcaaag ctgggtctga ggaaaggctc acattttgag atcccgactc
13081 aatccatgtc ccttaaaggg cacagggtgt ctccacaggg cgcaccaaaa tctggtgaga
13141 gagggcgtag acgcctcacc ttctgcctct acgggtcaca aaagcctggg tcaccctggt
13201 tgccactgtt ctagttcaa agtctcttc tgtctaattc ttaccacctc ttctgcctt
13261 ccaactccacc tcccgctcag tcagactgcg ctactttgaa ccggaccaaa ccaaaccaaa
13321 ccaaaccaaa ccaaaccaga ccagacacc cctcccggg aatcccagag aggccgaact
13381 gggataaccg gatgcatttg atttccacg ccaactgagt cacctctgca gaaatgggag
13441 ttctggccct cgcgaggcag tgcgacctgt caccgccctt cagccttccc gccctccacc
13501 aagcccgcgc acgcccggcc cgcgcgtctg tctttcgacc cggcaccggc gccggttccc
13561 agcagcgcg atgcgcgcgc tccaggcca ctgaagaga gagggcggg cgcaggggct
13621 gagcccgcg ggggagggaa cagcgtgat cagtgacgt ggtttcagtg ttacaccgg
13681 cagcgggccc ggggttcggc ctacgtcagg cgctcagtc cgttcggtt tcaattccg
13741 tggagggccc cctctgagcg ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcggtgacg
13801 gaggcggcgc tgccaggggg cgtgcggcag cgcggcgggc ggcggcgggc cgcggcgggc
13861 ggaggcgggc ggcggcgggc cgcggcgggc ggctgggct cgcggcgggc cagccacct
13921 ctggggggcg ggtcccggc gctagcaggg ctgaagagaa gatggaggag ctggtggtg
13981 aagtgccggg ctccaatggc gcttttaca aggtactgg cttagggc ggccccatc
14041 tgccttcc ttccctccc ttctcttg gtgcggcg gaggcaggcc cggggccctc
14101 ttcccgagca cgcgcctgg gtccagggc acgctcggc ggatgtgtt gggagggag
14161 gactggactt ggggcctgtt ggaagccct ctccgactcc gagaggcct agcgcctatc

```

14221 gaaatgagag accagcgagg agaggggtct ctttcggcgc cgagccccgc cgggggtgagc
14281 tggggatggg cgagggccgg cggcaggtac tagagccggg cggaagggc cgaaatcggc

⇒ Tamanho esperado dos produtos:

- Indivíduo com alelos normais: 223bp (Eag-U e Eag-L)
488 a 632bp (Eag-U e f)
- Indivíduo com pré-mutação: 223bp (Eag-U e Eag-L)
635 a 1070bp (Eag-U e f)
- Indivíduo com mutação completa: 223bp (Eag-U e Eag-L)
ausência de banda (Eag-U e f)

A reação de PCR gera produtos que poderão se enquadrar em um dos três grupos descritos acima. Porém, a análise de produtos fluorescentes no ABI3730 só é possível para produtos com até 600bp. Com isso, a análise no ABI3730 servirá para identificar somente os pacientes normais que possuem o pico da região de repetições de até 600bp. Pacientes normais com picos entre 600bp e 632bp não poderão ser identificados durante a análise. O perfil observado para esses casos é de ausência do pico da região de repetições. Essa ausência, a princípio, poderia dar a falsa ideia de uma pré-mutação ou mutação completa, mas na verdade se trata de um paciente com um produto de tamanho ainda dentro dos limites de normalidade.

12. Estoque de Materiais

- **Reagentes para PCR** - A concentração da solução estoque dos *primers* é de 100uM e se encontram armazenados no *freezer* - 80°C vertical da sala de *freezers* do Centro de Estudos do Genoma Humano numa caixa plástica branca onde está escrito V-1 Primers. A caixa está localizada no segundo rack da segunda prateleira do *freezer*. Temos os três *primers* não marcados (Gibco BRL) e também os *primers* f e Eag-U (Invitrogen) marcados com 6-FAM (o *primer* f foi marcado por engano). Nessa mesma sala encontra-se a máquina de gelo picado. Os reagentes de uso para PCR encontram-se numa caixa plástica branca no *freezer* -20°C do Pré-PCR do CEGH onde está escrito Vanessa. Nessa caixa encontram-se: 7-deasa dGTP (5mM), dNTP (1,25mM - 75% 7deaza dGTP), alíquota de Taq Polimerase (5U/uL), alíquota de PCR *Buffer* 10X, alíquota de MgCl₂ 50mM,

Work Solution de 2 primers e *Work Solution* de 3 primers. O DMSO encontra-se na gaveta “M” da sala de Pré-PCR.

Materiais para análise dos produtos de PCR no ABI3730 – A formamida Hi-Di encontra-se aliqüotada no *freezer* -20°C da sala de Pós-PCR. O *Size Standard* se encontra na geladeira da sala do ABI3730.

13. Controles utilizados

- Controle Normal - utilizar o DNA número 32-C que pertence a um indivíduo do sexo masculino normal para X Frágil. Uma alíquota desse DNA se encontra na geladeira do Pré-PCR numa caixa de papelão branca nomeada como “DNAs para X Frágil”.
- Controle Branco - utilizar água ultrapura no lugar do DNA

14. Procedimentos para Diagnóstico de X Frágil

Recebimento da alíquota de DNA

Ao receber as alíquotas de DNA para teste, acessar a rede interna (Trinity) e entrar nas pastas “exames_prestacao_servicos” e abrir o arquivo “Planilha de informações outras doenças.xls”. Neste arquivo, registrar os DNAs recebidos (registro, nome, exame requerido, data de extração e data do recebimento do DNA). Na mesma pasta “exames_prestacao_servicos” entrar na pasta “Leituras concentração Nanodrop” e abrir o arquivo nomeado com a data de recebimento da alíquota. Nesse arquivo estão depositadas as leituras das concentrações dos DNAs. Os DNAs recebidos devem ser guardados na geladeira do Pré-PCR numa caixa de papelão branca nomeada como “DNAs para X Frágil”.

Preparo da planilha de reação

Na pasta “exames_prestacao_servicos” do Trinity entrar em “Síndrome do X Frágil (FMR1)”, em “Protocolos de Bancada e PDFs Genotipagem” e abrir o arquivo “modelo protocolo de bancada X-Fragil - fluorescente.xls”. Preencher o arquivo conforme as indicações do próprio modelo. Esse arquivo excel deve ser nomeado como

“aaaa-mm-dd X-Fragil.xls”. Imprimir essa planilha já com todos os dados das reações e levar ao laboratório de Pré-PCR para preparar as reações. No dia em que a reação começar a ser feita, entrar na “Planilha de informações outras doenças.xls” e preencher a data de Início do Exame.

Preparo da reação

Como descrito no protocolo XFRA-01, deve-se realizar o exame na alíquota 1 de DNA (fazer tanto a reação utilizando os três *primers* Eag-U, f e Eag-L quanto a reação somente com dois *primers* Eag-U e f).

- No ao laboratório de Pré-PCR, identificar tubos de 0,2mL onde serão feitas as diluições dos DNAs. Diluir os DNAs para 50ng/uL utilizando água MilliQ e seguindo os cálculos de diluição da planilha excel.
- Numerar os tubos de 0,2mL onde serão feitas as reações.
- Em gelo, em microtubos de 0,5mL ou de 1,5mL, preparar os dois mixes de PCR: um com os *primers* Eag-U, f e Eag-L e outro com os *primers* Eag-U e f, conforme descrito respectivamente nas tabelas 01 e 02.
- Distribuir 21uL de cada mix nos tubos de 0,2mL onde serão feitas as reações. Adicionar, com uma multicanal, 2uL de DNA diluído aos tubos contendo o mix de PCR.
- Incubar os tubos em termociclador segundo o programa HOT-XFRA descrito na tabela 03.
- Enquanto corre o programa HOT-XFRA, preparar em gelo e num microtubo de 0,2mL, o Mix da Taq conforme descrito na tabela 04. Deve ser preparado somente um mix para todos os tubos.

Tabela 01 – Mix para PCR contendo os três *primers* Eag-U, f e Eag-L

	1 reação
Tampão 10x Invitrogen	2,3uL
dNTP 1,25mM - 75% 7deaza dGTP	4uL
MgCl ₂ 50mM Invitrogen	1uL
Work solution de <i>primers</i> (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2uM Eag-L)	1uL
DMSO	2,5uL
H ₂ O MilliQ	10,2uL
TOTAL	21uL (+ 2uL DNA 50ng/ul)

Tabela 02 – *Mix* para PCR contendo os dois *primers* Eag-U e f

	1 reação
Tampão 10x Invitrogen	2,3uL
dNTP 1,25mM - 75% 7deaza dGTP	4uL
MgCl ₂ 50mM Invitrogen	1uL
<i>Work solution</i> de <i>primers</i> (7,5uM Eag-U / 7,5uM f)	1uL
DMSO	2,5uL
H ₂ O MilliQ	10,2uL
TOTAL	21uL (+ 2uL DNA 50ng/uL)

Tabela 03 – Programa HOT-XFRA

Temperatura	Tempo
98°C	10 minutos
72°C	∞

Tabela 04 – *Mix* da Taq

	1 reação
Tampão 10x Invitrogen	0,2uL
Taq (5U/uL) Invitrogen	0,32uL
H ₂ O MilliQ	1,48uL
TOTAL	2uL

- Após os tubos permanecerem no termociclador de 3 a 5 minutos a 72°C, acrescentar 2uL do *mix* da Taq em cada tubo sem tirar os tubos da máquina (abrir o tubo, adicionar o *mix*, fechar o tubo). Fechar a tampa do termociclador, cancelar o programa HOT-XFRA e iniciar imediatamente o programa XFRA, descrito na tabela 05.

Tabela 05 – Programa XFRA

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	2 min	1
65°C	1 min	35
72°C	2 min	35
94°C	1 min e 30 seg	35
72°C	10 minutos	1
10°C	∞	1

Análise dos Produtos de PCR no ABI3730

Diluir as PCRs a 1:15 em H₂O MilliQ (2uL de PCR mais 28uL de água) em tubos de 0,2mL. Num tubo de 0,5mL, preparar a mistura de Formamida Hi-Di com *Size Standard* GS-500 (para cada amostra misturar 0,075uL de *Size Standard* com 7,925uL de Formamida Hi-Di e homogeneizar). Misturar 2uL da PCR diluída a 1:15 com 8uL da mistura de Formamida Hi-Di com *Size Standard*. As amostras já prontas para serem corridas devem ser entregues ao técnico responsável pelas corridas no ABI3730. No arquivo “aaaa-mm-dd X-Fragil.xls” existe uma tabela que deve ser preenchida com os nomes das amostras e enviada por e-mail ao técnico responsável pelo ABI3730 (e-mail: megabace@ib.usp.br).

Após a corrida, a pasta com os arquivos de dado cru (não analisados) será enviada por e-mail ao técnico responsável pelo exame. Essa pasta deve ser baixada em “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X Frágil (FMR1)” e em “Resultados Genotipagem - Corridas”. A análise é feita utilizando-se o software *Gene Marker v1.85 Demo*.

Para montar o projeto de análise, abrir o programa *Gene Marker v1.85*, clicar Ok nas três primeiras janelas de mensagens que vão aparecer. Fechar a janela “Start Your Project”. Clicar em *Open Data*, *Add Folder*, *Meus Locais de Rede*, *Exames Prestação Serviço*, *Síndrome do X Frágil*, *Resultados Genotipagem – Corridas*. Selecionar a corrida, clicar OK e OK novamente.

Na janela que se abrirá, com o botão direito clicar sobre *Raw Data*, clicar *Select Max* e depois na seta verde (*Run Project*). Selecionar o template *XFRA*, clicar *Next*, *Next*, OK e OK. Para visualizar todos os cromatogramas juntos, clicar com o botão direito sobre *Allele Call* e *Select Max*. Para marcar os alelos, selecionar em *Marker* a opção

XFRA. Restringir a janela de visualização de modo a aparecer somente a região entre 200bp e 600bp. Com o botão direito sobre o pico, clicar em *Insert Allele* e *OK*. Arrumar todos os alelos presentes e depois, além da cor azul já selecionada, selecionar também a cor vermelha. Arrumar a janela novamente de modo a aparecer somente a região entre 200bp e 600bp. Clicar *Print Report* e *Preview*. Por se tratar de uma versão Demo, não é possível imprimir os cromatogramas em PDF. Para salvar as imagens, clicar *Print Screen* e colar a imagem numa janela de Paint Brush. Selecionar o cromatograma e colar num arquivo de Word. Após colar todos os cromatogramas, salvar o arquivo como PDF dentro do Trinity na pasta “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X Frágil (FMR1)”, em “Protocolos de Bancada e PDFs Genotipagem”

Análise dos Resultados

A figura 01 ilustra dois perfis diferentes que podem ser observados para a PCR feita com os três *primers*. O perfil A corresponde a um paciente normal para X Frágil. Pacientes normais que apresentem o pico da região de repetições menor ou igual a 600bp, apresentarão o perfil A, ou seja, apresentarão os dois picos. O perfil B é o perfil esperado para pacientes pré-mutados ou com mutação completa, mas também é o perfil observado em pacientes normais que possuam o pico da região de repetições maior que 600bp. Deve-se tomar esse cuidado, pois a ausência de pico da região de repetições não significa que o paciente seja mesmo pré-mutado ou mutado. É necessário que essa amostra seja testada por *Southern Blotting* para checar se a amostra pertence a um paciente ainda dentro da zona de normalidade.

Sample 6: X-FRA- PacienteTeste-3primers.fsa

Sample 7: X-FRA- PacienteTeste-3primers.fsa

Figura 01 – PCR com 3 *primers*: A) Perfil referente a um paciente normal onde observa-se o pico do controle interno da reação e o pico referente à região de repetições; B) Perfil de um paciente provavelmente mutado ou pré-mutado, pois não apresenta o pico referente à região de repetições.

Para as reações feitas somente com dois *primers*, o perfil esperado é semelhante aos apresentados na figura 01, porém não se observa o pico de 218bp (controle interno da reação), como ilustrado na figura 02.

Sample 5: X-FRA- PacienteTeste-2primers.fsa

Sample 1: X-FRA- PacienteTeste-2primers.fsa

Figura 02 – PCR com 2 *primers*: A) Perfil referente a um paciente normal onde observa-se somente o pico referente à região de repetições; B) Perfil de um paciente provavelmente mutado ou pré-mutado, pois não apresenta o pico referente à região de repetições.

O controle branco não deve apresentar pico algum, pois a presença de picos indicaria contaminação da PCR.

O segundo conferente deverá checar os resultados junto com o técnico responsável pelo exame para verificar se os resultados estão corretos e se são coerentes. Os resultados devem ser registrados na planilha de excel “aaaa-mm-dd X-Fragil.xls” (a mesma que contém os cálculos para o preparo das reações) e também numa outra planilha excel onde os resultados gerais são registrados (acessar a rede interna Trinity e entrar nas pastas “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X-Frágil (FMR1)”, “Resultados Finais” e abrir o arquivo “resultados finais x-frágil.xls”).

A planilha de excel “aaaa-mm-dd X-Fragil.xls” já contendo os resultados deverá então ser impressa e assinada por ambos os conferentes. Essa planilha deverá ser armazenada na Pasta de Exame de X Frágil (cinza) localizada no armário do Escritório de Prestação de Serviços.

Os resultados também deverão ser enviados por e-mail para os grupos responsáveis pelas amostras (resultados de pacientes particulares devem ser enviados para o grupo de pesquisa em X Frágil e resultados de pacientes do estudo de Autismo devem ser enviados para o grupo de pesquisa em Autismo). A confecção dos relatórios e entrega dos mesmos seguirá o descrito no Item 2 do Protocolo XFRA-01.

Após o envio dos resultados por e-mail, selecionar o texto do e-mail enviado, copiar e colar num arquivo de Word. Este arquivo deve ser salvo em rede interna Trinity, “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X-Frágil (FMR1)”, “Resultados Finais Enviados por E-mail”. Nomear esse arquivo como “aaaa-mm-dd.doc”. Imprimir o e-mail enviado e colocar na mesma pasta cinza de X Frágil.

Dentro dessa mesma pasta “exames_prestacao_servicos”, abrir a “Planilha de informações outras doenças.xls” e preencher a data do Envio do Resultado Final. Ao assinar o relatório final, nessa mesma planilha preencher a data de assinatura do relatório.

Protocolos de Procedimentos do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB – USP

Título: Protocolo para Diagnóstico da Síndrome do X Frágil por PCR com Análise em gel de Acrilamida

Código: XFRA-03

Versão: 02

Responsável pelo protocolo: Vanessa Naomi van Opstal Takahashi

Versão vigente desde: Nov/2009

Versão verificada e autorizada por:

Nome	Função	Data	Assinatura
Vanessa Naomi van Opstal Takahashi	Técnica responsável pelo exame e 1ª Conferente		
Martha Alessandra Beltrame de Oliveira Lima Cozzo	2ª Conferente		
Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno	Coordenadora do Setor de Prestação de Serviços do CEGH		

Localização da impressão original e das cópias autorizadas:

Local	Status da Impressão
Pasta 1 de Exame de X Frágil (cinza) – Armário do Escritório de Prestação de Serviços	Original
	Cópia Autorizada

15. Considerações Gerais

Para a realização deste exame, ler previamente o protocolo XFRA-01 que contém as informações gerais sobre o exame. O técnico responsável pelo diagnóstico de X Frágil por PCR é responsável por executar os procedimentos de acordo com o descrito neste protocolo.

16. Relação de Equipamentos

- Freezer -20°C Consul, modelo compacto 100
- Freezer -80°C Thermo Forma, modelo -86C ULT
- Geladeira Electrolux DFF44 Premium
- Máquina de gelo picado Scotsman
- Autoclave vertical Phoenix, modelo AV-30
- Micropipetas monocal Eppendorf P2,5-P10-P20-P100-P200-P1000
- Micropipetas multicanal Eppendorf P10-P100
- Sistema de ultrafiltração de água Millipore, modelo Elix 5
- Sistema de ultrafiltração de água Millipore, modelo MilliQ Académic
- Espectrofotômetro Nanodrop ND-1000
- Termociclador MJ Research, modelo PTC-200
- No-break APC Back UPS CS 500
- Microcentrífugas Eppendorf, modelos MiniSpin-5452 e 5415D
- Sistema de eletroforese vertical (placas de aproximadamente 16cm x 20cm x 3mm e 19cm x 20cm x 3mm) da BRL - Bethesda Research Laboratories, modelo V16-2
- Fonte para Eletroforese, BioRad Power Pack 300
- Shaker Thermolyne, modelo Slow Speed Roto Mix

Obs: equivalentes poderão ser utilizados

17. Relação de Reagentes, Consumíveis e Demais Aparatos

- Microtubos Axygen 0,2mL-0,5mL-1,5mL
- Recipiente de isopor para gelo picado
- Estantes para acomodar tubos de 0,2mL-0,5mL-1,5mL
- Ponteiros Axygen 10uL-200uL-1000uL
- Papel de filtro (20cm x 20cm)
- Recipiente para coloração do gel de acrilamida (25cm x 25cm x 5cm)
- Seringa descartável de 20mL
- Folhas de celofane de molhar (35cm x 35cm)
- Placa de vidro (25cm x 25cm x 0,5cm) para secar o gel
- Taq Polimerase (5U/uL), Tampão de PCR 10X e MgCl₂ 50mM, Invitrogen
- dATP- dTTP- dCTP- dGTP 100mM, GE Healthcare
- Padrão de Peso Molecular 50bp, GE Healthcare

- 7-deasa dGTP 5mM, GE Healthcare
- DMSO, dimetilsulfóxido, Sigma
- TEMED, tetrametiletilenodiamino, GE Healthcare
- Persulfato de Amônio, GE Healthcare
- AgNO₃, Sigma
- EDTA ultrapuro, Invitrogen
- Tris, Invitrogen
- Ácido Bórico, Invitrogen
- Acrilamida, Invitrogen
- Bis-acrilamida, Invitrogen
- Azul de Bromofenol, Sigma
- Xileno Cianol, Sigma
- Ficol, Sigma
- Etanol Absoluto, Synth
- Ácido Acético, Merck
- NaOH, Synth
- Formaldeído 37%, Sigma

Obs: equivalentes poderão ser utilizados

18. Relação de Soluções

- **dNTP (1,25mM - 75% 7deaza dGTP):**
Num microtubo, homogeneizar: **5uL** dATP (100mM), **5uL** dTTP (100mM), **5uL** dCTP (100mM), **1,25uL** dGTP (100mM), **75uL** 7-deasa dGTP (5mM) e **308,75uL** H₂O MilliQ (Total: **400uL**)
Estocar em *freezer* -20°C.
- **Work Solution de 2 primers (7,5uM Eag-U / 7,5uM f):**
Num microtubo, homogeneizar: **7,5uL** *primer* Eag-U (100uM), **7,5uL** *primer* f (100uM) e **85uL** H₂O MilliQ (Total: **100uL**)
Estocar em *freezer* -20°C.
- **Work Solution de 3 primers (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2uM Eag-L):**
Num microtubo, homogeneizar: **7,5uL** *primer* Eag-U (100uM), **2uL** *primer* Eag-L (100uM), **5uL** *primer* f (100uM) e **85,5uL** H₂O MilliQ (Total: **100uL**)
Estocar em *freezer* -20°C.

Para as soluções abaixo, verificar o modo de preparo no protocolo GERAL-4 (Protocolo Geral de Preparo de Soluções e Alíquotas):

- Tampão TBE 10x
- Acrilamida 30% (29% Acrilamida – 1% Bisacrilamida)
- ‘Sopa’ de Acrilamida 6%
- Persulfato de Amônio 10%
- **Loading Buffer** BFB-XC-Ficol 6x (0,25% Azul de Bromofenol – 0,25% Xileno Cianol – 15% de Ficol)
- Solução Fixadora (0,5% Ácido Acético / 10% Etanol)
- Solução Estoque de Nitrato de Prata 10% (AgNO₃)
- Solução de Nitrato de Prata 0,2% (AgNO₃)
- Solução Reveladora (3% NaOH / 0,075% Formaldeído)

19. Primers e Sequência Referência

Sequência referência: [gi|1668818|gb|L29074.1|HUMFMR1S](#) Homo sapiens fragile X mental retardation syndrome protein (FMR1) gene, alternative splice products, complete cds; and pseudogene, complete sequence

⇒ *Primers* utilizados (em cinza):

Primer Fwd - **Eag-U** – 5' cgacctgtcaccgcccttcagccttcc 3'

Primer Rev-1 - **Eag-L** – 5' cgctgcgggtgtaaactgaaaccacgctc 3'

Primer Rev-2 - **f** – 5' agccccgcacttccaccaccagctcctcca 3'

⇒ região em *italico e sublinhada*: primeiro exon

```

13021 ggcgagtacg tgggtcaaag ctgggtctga ggaaaggctc acattttgag atcccgactc
13081 aatccatgtc ccttaaaggg cacaggggtg ctccacaggg cgcgccaaaa tctgggtgaga
13141 gaggggcgtag acgcctcacc ttctgcctct acgggtcaca aaagcctggg tcaccctggt
13201 tgccactgtt cctagttaa agtcttctc tgtctaatec taccacctta ttctgcctt
13261 ccaatccacc tccgctcag tcagactgag ctacttgaa cggaccaaa ccaaaccaaa
13321 ccaaaccaaa ccaaaccaga ccagacacc cctcccgagg aatccagag aggccgaact
13381 gggataaccg gatgcattg atttccacg cactgagtg cactctgca gaaatggcg
13441 ttctggccct cgcgaggcag tgcgacctg caccgccctt cagccttccc gccctcacc
13501 aagcccgcg cgcgggggg cgcggtctg tcttcgacc cggcaccgg ggcggttccc
13561 agcagcgcg atgcgcgcg tccaggcca ctgaagaga gaggcgggg ccgaggggct
13621 gaggccggg ggggaggaa cagcgtgat cactgacgt ggttcagtg ttacaccgg
13681 cagcggggc ggggttcgc ctacgacag cgctcagtc cgttcggtt tcacttcgg
13741 tggaggggg cctctgagc ggcggcggg cgacggcgag cgcggggcg ggcggtgacg
13801 gaggcgccg tgccagggg cgtgcggcg cgcggcgcg ggcggcgcg cggcgggcg
13861 ggaggcgcg ggcggcgcg cgcggcgcg ggtggggct cagcggccc cagccacct
13921 ctggggggg ggtcccgcg gctagcagg ctgaagaga gatggaggag ctggtggtg
13981 aagtgcggg ctccaatgg ccttctaca aggtacttg cttagggca ggcccatct
14041 tgcctctcc tccctcct ttctcttg gtgcggcg gaggcaggc cggggccctc
14101 ttccgagca cgcgcctg gtccaggcg acgctcgcg ggatgtgtt gggagggag
14161 gactggactt ggggctgtt ggaagccct ctccgactc gagaggcct agcgcctatc
14221 gaaatgagag accagcgagg agaggggtt ctctcgcg cgagccccg cggggtgagc

```

14281 tggggatggg cgagggccgg cggcaggtac tagagccggg cggaagggc cgaaatcggc

⇒ Tamanho esperado dos produtos:

- Indivíduo com alelos normais: 223bp (Eag-U e Eag-L)
488 a 632bp (Eag-U e f)
- Indivíduo com pré-mutação: 223bp (Eag-U e Eag-L)
635 a 1070bp (Eag-U e f)
- Indivíduo com mutação completa: 223bp (Eag-U e Eag-L)
ausência de banda (Eag-U e f)

20. Estoque de Materiais

- **Reagentes para PCR** - A concentração da solução estoque dos *primers* é de 100uM e se encontram armazenados no *freezer* -80°C vertical da sala de *freezers* do Centro de Estudos do Genoma Humano numa caixa plástica branca onde está escrito V-1 Primers. A caixa está localizada no segundo rack da segunda prateleira do *freezer*. Temos os três *primers* não marcados (Gibco BRL) e também os *primers* f e Eag-U (Invitrogen) marcados com 6-FAM (o *primer* f foi marcado por engano). Nessa mesma sala encontra-se a máquina de gelo picado.
Os reagentes de uso para PCR encontram-se numa caixa plástica branca no *freezer* -20°C do Pré-PCR do CEGH onde está escrito Vanessa. Nessa caixa encontram-se: 7-deasa dGTP (5mM), dNTP (1,25mM - 75% 7deaza dGTP), alíquota de Taq Polimerase (5U/uL), alíquota de PCR *Buffer* 10X, alíquota de MgCl₂ 50mM, *Work Solution* de 2 *primers* e *Work Solution* de 3 *primers*. O DMSO encontra-se na gaveta “M” da sala de Pré-PCR.
- **Materiais para eletroforese em gel de acrilamida e coloração com nitrato de prata** - Todos os materiais se encontram na sala de Pós-PCR. A cuba de eletroforese vertical e os grampos para segurar os vidros encontram-se no armário “H”. As placas para preparação do gel, os espaçadores, o pente e a seringa descartável ficam nas gavetas “Z” e “AB”.
A solução estoque 10% de AgNO₃ encontra-se no armário “S”, bem como o recipiente para coloração do gel. O estoque de reagentes para preparar as soluções de coloração (AgNO₃, Persulfato de Amônio, Etanol Absoluto, Ácido Acético e NaOH) encontram-se no armário “A”. Na geladeira do Pós-PCR

encontram-se a “sopa de acrilamida 6%”, TEMED, TBE 10x e *Loading Buffer* BFB-XC-Ficol. As folhas de celofane e o vidro para secar o gel encontram-se na gaveta “X”.

21. Controles utilizados

- Controle Normal - utilizar o DNA número 32-C que pertence a um indivíduo do sexo masculino normal para X Frágil. Uma alíquota desse DNA se encontra na geladeira do Pré-PCR numa caixa de papelão branca nomeada como “DNAs para X Frágil”.
- Controle Branco - utilizar água ultrapura no lugar do DNA

22. Procedimentos para Diagnóstico de X Frágil

Recebimento da alíquota de DNA

Ao receber as alíquotas de DNA para teste, acessar a rede interna (Trinity) e entrar nas pastas “exames_prestacao_servicos” e abrir o arquivo “Planilha de informações outras doenças.xls”. Neste arquivo, registrar os DNAs recebidos (registro, nome, exame requerido, data de extração e data do recebimento do DNA). Na mesma pasta “exames_prestacao_servicos”, entrar na pasta “Leituras concentração Nanodrop” e abrir o arquivo nomeado com a data de recebimento da alíquota. Nesse arquivo estão depositadas as leituras das concentrações dos DNAs. Os DNAs recebidos devem ser guardados na geladeira do Pré-PCR numa caixa de papelão branca nomeada como “DNAs para X Frágil”.

Preparo da planilha de reação

Na pasta “exames_prestacao_servicos”, entrar na pasta “Síndrome do X Frágil (FMR1)”, em “Protocolos de Bancada e PDFs Genotipagem” e abrir o arquivo “modelo protocolo de bancada X-Fragil - acrilamida.xls”. Preencher o arquivo conforme as indicações do próprio modelo. Esse arquivo excel deve ser nomeado como “aaaa-mm-dd X-Fragil.xls”. Imprimir essa planilha já com todos os dados das reações e levar ao laboratório de Pré-PCR para preparar as reações. No dia em que a reação começar a ser feita, entrar na “Planilha de informações outras doenças.xls” e preencher a data de Início do Exame.

Preparo da reação

Como descrito no protocolo XFRA-01, deve-se realizar o exame na alíquota 1 de DNA (fazer tanto a reação utilizando os três *primers* Eag-U, f e Eag-L quanto a reação somente com dois *primers* Eag-U e f).

- No ao laboratório de Pré-PCR, identificar tubos de 0,2mL onde serão feitas as diluições dos DNAs. Diluir os DNAs para 50ng/uL utilizando água MilliQ e seguindo os cálculos de diluição da planilha excel.
- Numerar os tubos de 0,2mL onde serão feitas as reações.
- Em gelo, em microtubos de 0,5mL ou de 1,5mL, preparar os dois mixes de PCR: um com os *primers* Eag-U, f e Eag-L e outro com os *primers* Eag-U e f, conforme descrito respectivamente nas tabelas 01 e 02.
- Distribuir 21uL de cada mix nos tubos de 0,2mL onde serão feitas as reações. Adicionar, com uma multicanal, 2uL de DNA diluído aos tubos contendo o mix de PCR.
- Incubar os tubos em termociclador segundo o programa HOT-XFRA descrito na tabela 03.
- Enquanto corre o programa HOT-XFRA, preparar em gelo e num microtubo de 0,2mL, o Mix da Taq conforme descrito na tabela 04. Deve ser preparado somente um mix para todos os tubos.

Tabela 01 – Mix para PCR contendo os três *primers* Eag-U, f e Eag-L

	1 reação
Tampão 10x Invitrogen	2,3uL
dNTP 1,25mM - 75% 7deaza dGTP	4uL
MgCl ₂ 50mM Invitrogen	1uL
Work solution de <i>primers</i> (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2uM Eag-L)	1uL
DMSO	2,5uL
H ₂ O MilliQ	10,2uL
TOTAL	21uL (+ 2uL DNA 50ng/uL)

Tabela 02 – Mix para PCR contendo os dois *primers* Eag-U e f

	1 reação
Tampão 10x Invitrogen	2,3uL
dNTP 1,25mM - 75% 7deaza dGTP	4uL
MgCl ₂ 50mM Invitrogen	1uL

Work solution de primers (7,5uM Eag-U / 7,5uM f)	1uL
DMSO	2,5uL
H ₂ O MilliQ	10,2uL
TOTAL	21uL (+ 2uL DNA 50ng/uL)

Tabela 03 – Programa HOT-XFRA

Temperatura	Tempo
98°C	10 minutos
72°C	∞

Tabela 04 – Mix da Taq

	1 reação
Tampão 10x Invitrogen	0,2uL
Taq (5U/uL) Invitrogen	0,32uL
H ₂ O MilliQ	1,48uL
TOTAL	2uL

- Após os tubos permanecerem no termociclador de 3 a 5 minutos a 72°C, acrescentar 2uL do *mix* da Taq em cada tubo sem tirar os tubos da máquina (abrir o tubo, adicionar o *mix*, fechar o tubo). Fechar a tampa do termociclador, cancelar o programa HOT-XFRA e iniciar imediatamente o programa XFRA, descrito na tabela 05.

Tabela 05 – Programa XFRA

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	2 min	1
65°C	1 min	35
72°C	2 min	35
94°C	1 min e 30 seg	35
72°C	10 minutos	1
10°C	∞	1

Análise dos Produtos de PCR em gel de acrilamida

- *Antes de montar o sistema de eletroforese, retirar a “sopa de acrilamida 6%” e o TEMED da geladeira para estabilizarem em temperatura ambiente.*
- *Limpar as placas de vidro do sistema de eletroforese com o auxílio de papel absorvente e etanol 70%. Limpar também os espaçadores e o*

penete. Montar as placas colocando os espaçadores entre os vidros e prendendo com os grampos nas laterais. Apoiar as placas sobre um suporte de modo a deixá-las um pouco elevadas acima da bancada.

- Num Becker de vidro de 50mL, misturar 25mL de “sopa de acrilamida 6%”, 250uL de Persulfato de Amônio 10% e 25uL de TEMED. Com o auxílio de uma seringa descartável, aplicar a mistura entre as placas de vidro. Colocar o pente e apoiar um peso sobre o meio da placa. Deixar o gel polimerizando em temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora).
- Preparar 1,5L de TBE 1x para a eletroforese. Após a polimerização do gel, montar as placas na cuba de eletroforese com o auxílio dos grampos. Se for usar somente um gel, vedar o outro lado da cuba com uma placa própria para essa finalidade. Colocar TBE 1x na parte superior e verificar se há vazamento do TBE para a parte de baixo da cuba. Se não houver vazamento, colocar o restante do TBE na parte inferior.
- Limpar os orifícios do gel com o auxílio de uma micropipeta, injetando TBE nos orifícios.
- Num microtubo de 0,2mL ou numa placa de PCR, misturar 10uL do produto de PCR mais 2,5uL de *loading buffer* BFB-XC-Ficol e aplicar toda a mistura no orifício. Aplicar também 2uL do PM 50pb mais 1uL de *loading buffer* BFB-XC-Ficol em um dos orifícios. Correr a 180V constantes até o Azul de Bromofenol atingir o final da placa (aproximadamente 2 horas e 30 minutos).
- Desligar a fonte, soltar as placas de gel, apoiá-las sobre folhas de papel absorvente e com o auxílio do próprio espaçador, separar as placas.
- Colocar 200mL de Fixador na vasilha de coloração. Retirar o gel da placa com um papel de filtro e soltá-lo no Fixador. Manter em agitação por 5 minutos. Reservar o papel de filtro, pois será usado no final da coloração (lavar o papel em água corrente). Enquanto o gel está sendo fixado, lavar as placas com detergente e esponja macia e deixá-las secando na bancada, sobre papel absorvente e apoiadas na parede.
- Segurar o gel delicadamente com os dedos e descartar o Fixador. Colocar 200mL de Nitrato de Prata 0,2% e manter em agitação por 5 minutos cobrindo a vasilha com papel alumínio para não expor a solução à luz. Cuidar para que o gel fique bem mergulhado na solução. Enquanto isso, preparar o revelador misturando 400uL de Formaldeído 37% a 200mL de NaOH 3%.
- Segurar o gel delicadamente com os dedos e descartar a solução de Nitrato de Prata. Lavar o gel ligeiramente com água ultrapura,

descartar a água e colocar o revelador na vasilha com o gel. Manter em agitação coberto com papel alumínio até as bandas se tornarem bem nítidas (cerca de 8-10 minutos).

- Descartar o revelador e colocar 200mL de Fixador. Manter em agitação por 5 minutos. Enquanto isso, preparar o vidro onde o gel será desidratado. Molhar o vidro, molhar bem uma folha de celofane e encapar o vidro. Reservar.
- Descartar o Fixador, colocar bastante água na vasilha (cerca de 500mL), ‘pescar’ o gel com a ajuda do papel de filtro e colocá-lo sobre o vidro com celofane. Molhar bem a outra folha de celofane e encapar o gel. Retirar as bolhas delicadamente. Deixar secando sobre um apoio por cerca de dois dias. Após seco, recortar o excesso de celofane, numerar os poços com caneta própria para tubos, escanear o gel e colar a imagem na planilha Excel de X-Frágil. A foto do gel deve ser arquivada também em Trinity, “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X-Frágil (FMR1)”, “Fotos de Géis”. Prender o gel seco com fita adesiva no verso de uma das folhas impressas do arquivo excel.

Análise dos Resultados

A figura 01 ilustra os perfis esperados para pacientes normais e pacientes positivos para X Frágil. Os orifícios 2 a 9 correspondem à PCR feita com três *primers* e os orifícios 10 a 17 correspondem à PCR feita com dois *primers*.

Figura 01 – Imagem do gel de acrilamida - **orifício 1:** Padrão de peso molecular de 50bp; **orifícios 2-3-4-5-7-8:** PCR com três *primers* - pacientes normais apresentam a banda controle de 223bp e a banda da região de repetições; **orifícios 10-11-12-13-15-16:** PCR com dois *primers* - pacientes normais apresentam somente a banda da região de repetições; **orifício 6:** PCR com três *primers* - paciente positivo apresenta a banda controle de 223bp mas não apresenta a banda da região de repetições; **orifício 14:** PCR com dois *primers* - paciente positivo não apresenta a banda da região de repetições; **orifícios 9 e 17:** controle branco

Para a PCR feita com os três *primers*, a banda controle de 223bp deve aparecer em todas as amostras de DNA (orifícios 2 a 8) enquanto que na PCR com dois *primers* essa banda está ausente (orifícios 10 a 16). Pacientes normais apresentam a banda da região de repetições (orifícios 2-3-4-5-7-8-10-11-12-13-15-16) enquanto que para pacientes com mutação completa o que se observa é a ausência dessa banda (orifícios 6 e 14). Indivíduos com pré-mutação apresentam a banda da região de repetições fraca e com tamanho aumentado. Em alguns casos, não é possível observar a banda por estar muito fraca. O orifício do controle branco não deve apresentar banda alguma, pois a presença de bandas indicaria contaminação da PCR (orifícios 9 e 17).

O segundo conferente deverá checar os resultados junto com o técnico responsável pelo exame para verificar se os resultados estão corretos e se são coerentes.

Os resultados devem ser registrados na planilha de excel “aaaa-mm-dd X-Fragil.xls” (a mesma que contém os cálculos para o preparo das reações) e também numa outra planilha excel onde os resultados gerais são registrados (acessar a rede interna Trinity e entrar nas pastas “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X-Frágil (FMR1)”, “Resultados Finais” e abrir o arquivo “resultados finais X-Frágil.xls”).

A planilha de excel “aaaa-mm-dd X-Fragil.xls” já contendo a foto do gel e os resultados deverá então ser impressa e assinada por ambos os conferentes. Essa planilha deverá ser armazenada na Pasta de Exame de X Frágil (cinza) localizada no armário do Escritório de Prestação de Serviços.

Os resultados também deverão ser enviados por e-mail para os grupos responsáveis pelas amostras (resultados de pacientes particulares devem ser enviados para o grupo de pesquisa em X Frágil e resultados de pacientes do estudo de Autismo devem ser enviados para o grupo de pesquisa em Autismo). A confecção dos relatórios e entrega dos mesmos seguirá o descrito no Item 2 do Protocolo XFRA-01.

Após o envio dos resultados por e-mail, selecionar o texto do e-mail enviado, copiar e colar num arquivo de Word. Este arquivo deve ser salvo em rede interna Trinity, “exames_prestacao_servicos”, “Síndrome do X-Frágil (FMR1)”, “Resultados Finais Enviados por E-mail”. Nomear esse arquivo como “aaaa-mm-dd.doc”. Dentro dessa mesma pasta “exames_prestacao_servicos”, abrir a “Planilha de informações outras doenças.xls” e preencher a data do Envio do Resultado Final.

Ao assinar o relatório final, nessa mesma planilha preencher a data de assinatura do relatório.

Fluxograma dos trabalhos: