

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PPGBSMI – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa

MARCELA KELLY ASTETE GÓMEZ

**Estudo dos Alelos da Região 5'UTR no Gene
FMR1(*Fragile X Mental Retardation 1*) em
Homens da População Geral de
Salvador-BA**

Salvador
2011

MARCELA KELLY ASTETE GÓMEZ

**Estudo dos Alelos da Região 5´UTR no Gene
FMR1(*Fragile X Mental Retardation 1*) em
Homens da População Geral de
Salvador-BA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Angelina Xavier Acosta

Salvador
2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

G633e Gómez, Marcela Kelly Astete
Estudo dos alelos da região 5'UTR no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) em homens da população geral de Salvador-BA [manuscrito]
/ Marcela Kelly Astete Gómez. - 2011.
75 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2011.

Orientador: Prof. Dra. Angelina Xavier Acosta, Laboratório Avançado de
Saúde Pública.

1. Síndrome. 2. Saúde Mental. 3. Alelos. I. Título.

CDU 613.86

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcela Kelly Astete Gómez

Estudo dos Alelos da Região 5'UTR no Gene FMR-1 em Homens da População Geral de Salvador-BA.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Epidemiologia Molecular e Medicina Investigativa.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Profª Drª Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima

Instituição: Universidade Federal da Bahia-UFBA.

Assinatura: _____

Profª. Drª Maria Betânia Pereira Toralles

Instituição: Universidade Federal da Bahia- UFBA.

Assinatura: _____

Profª Drª. Marilda de Souza Gonçalves

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz - BA

Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho ao meu
primeiro mestre prof.
José Alfredo Gómez Patiño*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo incondicional nas situações de desânimo.

Aos meus pais Juan e Viviana, por todo o apoio, suporte, motivação e por terem sido o meu porto de abrigo ao longo desta etapa como de todas as outras da minha vida. Para vocês o meu tudo!

Aos meus amados irmãos Katerine e Juan Gerardo. Apesar da distância guardo um pouco de vocês na minha essência, no meu DNA.

Aos meus pais Luiz, Nicolas Gerardo e Jesus Roberto. Aos meus avôs, tios, tias e primos, uma genealogia que segrega muita união e amor, motivo pelo qual sempre me mantive perseverante. Em especial a dois rapazes que tornaram minha vida mais doce, o “poderoso” Thor e o fofíssimo Tiago.

A minha querida orientadora Angelina Xavier, exemplo de competência e dedicação profissional, expresso aqui todo o meu carinho e admiração. Obrigada por me confortar nos momentos mais difíceis, pela convivência, orientação, aprendizado e, sobretudo, por confiar a mim a tarefa de realizar este trabalho.

As supermeninas, incríveis transformadoras de sorrisos: Manuela (UFBA), Aline, Carol, Taísa, Giselle, Thaís, Taise, Tatiana, Ana Cláudia, Filipe, Thessika e minha querida Gabrielle. Presenças imprescindíveis e inesquecíveis. O prazer de ter convivido e aprendido com vocês, eu carrego comigo. Muito obrigada pelo maravilhoso convívio, pelas colaborações e, sobretudo pela amizade.

A Prof^a. Kiyoko Abe Sandes, obrigada pelos valiosos ensinamentos e pelo apoio.

A Prof^a. Renata Lúcia pelo apoio prontamente cedido em todas às vezes solicitadas, atenção dispensada e pelo carinho ao me receber em seu laboratório.

A meus amigos Josenilda e Adriano Alcântara agradeço por toda a atenção, respeito e partilha de conhecimentos, na vida e na profissão.

A Taise Coutinho da coordenação da pós-graduação, além de me auxiliar por diversas vezes nos problemas burocráticos, também foi minha amiga.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelos projetos aprovados e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo auxílio financeiro.

*Eu não existiria sem meus genes,
tudo em mim depende deles. Mas meus
genes, por si só, são insuficientes. É
unicamente pelos dados simultâneos
dos genes e do meio que atinjo um
certo grau de complexidade, a partir do
qual posso tornar-me coautor de mim
mesmo, possuidor e gerador de uma
liberdade quase ilimitada.*

*O que é factível coletivamente na
ciência pode também ser obtido pelo
indivíduo na fabricação de si.*

Albert Jacquard

RESUMO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a principal causa hereditária de deficiência mental de herança dominante ligada ao cromossomo X. Em 1991, o gene *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation 1*) foi descoberto como responsável pela SXF. De acordo com o número de repetições, os alelos se dividem em: (a) alelo normal compreendendo 6 a 55 repetições (b) pré-mutado: 61 a 200 repetições e (c) mutado: com >200 repetições. Os alelos que apresentam 45 a 60 repetições são considerados como zona intermediária ou *gray-zone*. A base molecular dessa doença é bastante peculiar quando comparada com os padrões típicos observados em outras desordens de etiologia genética. As pré-mutações podem agregar-se de forma silenciosa por muitas gerações de uma família antes de se expandir para a mutação completa, levando aos sinais clínicos da doença. Na Bahia existem poucas pesquisas envolvendo esta doença, conseqüentemente, é desconhecida sua frequência nessa região. Portanto, este trabalho tem como objetivo detectar a frequência das classes alélicas do gene *FMRI* em uma amostra de indivíduos do sexo masculino da população geral de Salvador-BA. Este estudo foi realizado em 511 homens provenientes de outro amplo estudo desenvolvido pelo Instituto de Saúde Coletiva (ISC) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) sendo utilizada a técnica da PCR e posterior classificação dos alelos baseando-se na relação entre o número de repetições CGG e o tamanho do fragmento obtido na PCR. Dos 511 homens analisados no presente estudo observou-se predominância de alelos normais pertencentes à classe 2 (11 a 26 repetições CGG) em 73,70% dos indivíduos analisados, seguido da classe 3 (27 a 40 repetições CGG) em 25,10% dos indivíduos. Apenas 1,20% foram incluídos na classe 1 (<10 repetições CGG) e nenhum alelo foi encontrado nas classes 4 (41 a 60 repetições CGG), classe 5 (>60 repetições CGG) e classe 6 (>200 repetições CGG). Este é o primeiro estudo utilizando a técnica da PCR para detecção dos alelos do gene *FMRI* em uma população geral de Salvador-BA, podendo direcionar futuros trabalhos envolvendo o gene *FMRI* tanto para o estado da Bahia, quanto para a região Nordeste e também minimizar deficiências existentes em termos de diagnóstico da SXF na cidade de Salvador-BA.

Palavras-chave: Síndrome do X-Frágil - Região 5'UTR - FMR1- Deficiência Mental.

ABSTRACT

The Fragile X syndrome (FXS) is the leading cause of inherited mental deficiency (MD) of dominant inheritance linked to X chromosome. In 1991, the FMR1 gene (Fragile X Mental Retardation 1) was discovered as responsible for FXS. According to the number of repetitions, the alleles are divided in: (a) normal stable allele comprising 6 to 55 repetitions; (b) premutation: 61 to 200 repetitions and (c) mutant with > 200 repeats. The molecular basis of this disease is quite unusual when compared with the typical patterns seen in other disorders of genetic etiology. The pre-change can add up so silent for many generations of a family before they expand to full mutation, leading to clinical signs of disease. In Bahia there are few studies involving this disease, therefore, its frequency is unknown in this region. So, this study aims to detect the frequency of allelic classes of FMR1 gene in a sample of males from the general population of Salvador-BA city. This study was conducted on 511 samples using the PCR technique and subsequent classification of alleles based on the number of CGG repeats and the size of the fragments in PCR. Of the 511 individuals examined was found to predominate among the normal alleles the class 2 (11 to 26 repetitions) with 73,70% followed alleles analyzed in Class 3 (27 to 40 repetitions) with 25,10%, and Class 1 (<10 repetitions) with only one 1,20% . No allele was found in class 4 (41 to 60 repetitions), which corresponds to gray zone and class 5 (> 60 repetitions) for the premutation and class 6 (>200 repetitions) the corresponds full mutation. This is the first study using the PCR technique for detection of alleles of the FMR1 gene in a general population of Salvador, Bahia, and may direct future studies involving the FMR1 gene for both the state of Bahia, the Northeast and to also minimize deficiencies existing in the diagnosis of FXS in Salvador, Bahia.

Keywords: Fragile X Syndrome; Region 5'UTR; FMR-1; Mental Deficiency

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Visualização do sítio frágil (círculo) em indivíduos com a síndrome do X-frágil pelo bandeamento GTG (Tripsina) em Xq27.3 (seta).	14
Figura 2. Sítios frágeis no cromossomo X.	15
Figura 3. Representação esquemática do gene <i>FMRI</i> .	16
Quadro 1. Descrição dos tipos de alelos do gene <i>FMRI</i> e sua associação ao número de trinucleotídeos CGG.	17
Figura 4. Representação do gene <i>FMRI</i> com as repetições CGG representando as três categorias de alelos, o normal, a pré-mutação e a mutação completa	18
Figura 5. Alelos sublinhados representando seu crescimento em tamanho	21
Figura 6. Risco de expansão em mulheres portadoras da pré-mutação para a mutação completa no gene <i>FMRI</i>	22
Figura 7. Características clínicas da Síndrome do X-frágil.	24
Figura 8. Fluxograma utilizado na análise laboratorial do estudo de avaliação dos alelos da região 5'UTR no gene <i>FMRI</i>	31
Figura 9. Mapa da cidade de Salvador, demonstrando as bacias onde foram coletadas amostras para o projeto Bahia Azul.	32
Figura 10. Esquema da PCR demonstrando os <i>primers</i> e regiões amplificadas do gene <i>FMRI</i> e os genótipos correspondentes.	34
Figura 11: Foto do gel de poliacrilamida a 6% demonstrando a amplificação do gene <i>FMRI</i> marcador de 50 pares de bases (pb).	35
Quadro 2. Relação entre as classes, o número de repetições CGG e o tamanho do produto da PCR do gene <i>FMRI</i> .	36
Figura 12. Esquema demonstrando a relação entre o tamanho do fragmento (pb) e o número de repetições CGG no gene <i>FMRI</i> .	36
Gráfico 1: Distribuição das frequências das classes. Alelos normais <i>gray-zone</i> , pré-mutados e mutados.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais estudos que utilizaram amostras representativas relacionadas a prevalência da pré-mutação no gene <i>FMRI</i>	28
Tabela 2. Sequências de <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos alelos do gene <i>FMRI</i> segundo Haddad e colaboradores, 1996.	34
Tabela 3. Comparação da frequência alélica da distribuição CGG presentes no gene <i>FMRI</i> com outras regiões Brasileiras.	39
Tabela 4. Estimativas populacionais relacionadas à frequência alélica do gene <i>FMRI</i> em diferentes regiões do mundo.	40

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	13
1.1 A Síndrome do X-Frágil	13
1.2 O Gene <i>FMR1</i> e a Proteína FMRP	15
1.3 Instabilidade das Repetições CGG e Transmissão	19
1.4 Implicações Clínicas	22
1.4.1 Portadores da Pré-mutação	22
1.4.2 Afetados pela SXF	23
1.5 Diagnóstico	24
1.6 Aspectos Epidemiológicos	27
2.0 JUSTIFICATIVA	29
3.0 OBJETIVO	30
3.1.1 Geral	30
3.1.2 Específicos	30
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Desenho de Estudo	31
4.2 Casuística	31
4.3 Análise Laboratorial	33
4.3.1 Extração de DNA	33
4.3.2 Estudo da região 5'UTR do gene <i>FMR1</i>	33
4.3.3 Discriminações das classes alélicas no gene <i>FMR1</i>	35
5.0 RESULTADOS	38
6.0 DISCUSSÃO	39
7.0 CONCLUSÃO	42
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 A Síndrome do X-Frágil

A Síndrome do X-Frágil (SXF) (OMIM 300624) é a principal causa hereditária de deficiência mental (DM), possui herança dominante ligada ao cromossomo X, com penetrância incompleta (80% nos homens e 30% nas mulheres) e expressividade variável, sendo os homens mais afetados que as mulheres (OBERLÉ *et al*, 1991; YU *et al*, 1991). Do ponto de vista da etiologia genética, sua frequência é superada apenas pela Síndrome de Down (SD) (PEMBREY *et al*, 2001). Entretanto, ao contrário da SD com trissomia livre que não tende a se repetir nas famílias, a SXF tem elevado risco de recorrência entre os familiares dos afetados (KEENAN *et al*, 1993; PEMBREY *et al*, 2001).

A primeira documentação científica da SXF foi publicada em 1943 por Martin e Bell, que reportaram uma família composta por 11 indivíduos afetados com DM inespecífica, cujo heredograma era sugestivo de herança ligada ao cromossomo X (MARTIN E BELL, 1943). Este tipo de DM foi chamado de Síndrome de Martin-Bell, por cerca de 30 anos, em homenagem aos pesquisadores que primeiro a descreveram. A etiologia dessa disfunção ainda não tinha sido estabelecida até 1969, quando Lubs observou, em estudos citogenéticos, uma falha (sítio frágil) localizada na extremidade distal do braço longo do cromossomo X dos indivíduos afetados pela síndrome, denominado de cromossomo X marcador. A segunda descrição do cromossomo X marcador foi realizada em uma família brasileira em 1973 por Escalante & Frotta-Pessoa. Com a presença de um marcador cromossômico em alguns casos de DM ligado ao cromossomo X, a natureza sindrômica da doença tornou-se evidente (PEMBREY *et al*, 2001).

Em 1977, Sutherland observou que culturas celulares incubadas em meios deficientes em ácido fólico, facilitavam a expressão do sítio frágil (Figura 1) presente nos indivíduos afetados, sítio este, denominado de FRAXA (sítio frágil, cromossomo X, sítio A) (CARVALHO, 2003).

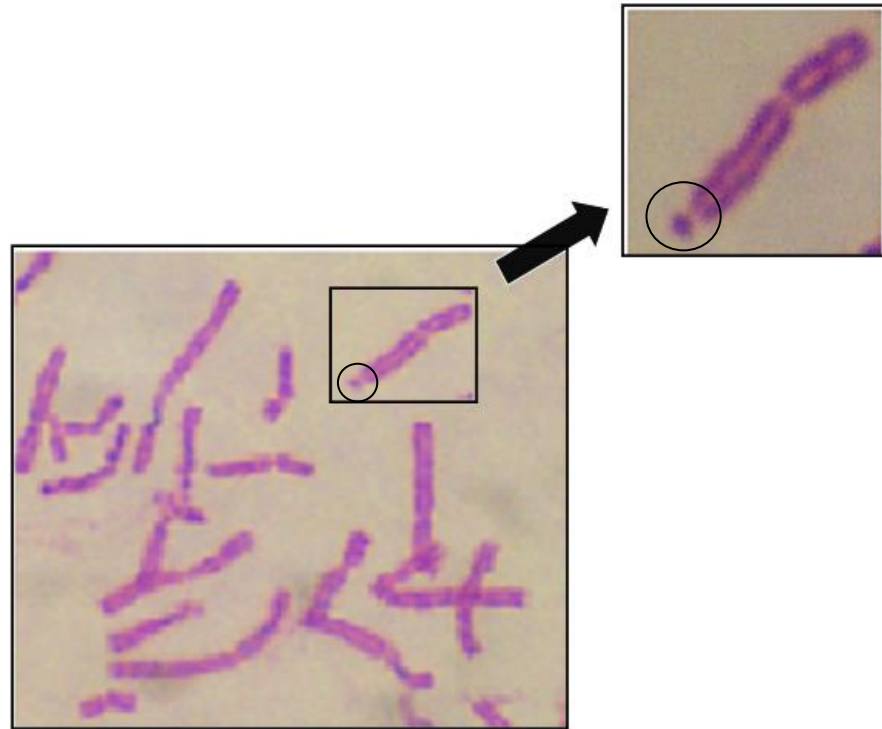


Figura 1. Visualização do sítio frágil (círculo) em indivíduos com a síndrome do X-frágil pelo bandejamento GTG (Tripsina) em Xq27.3 (seta).

MENÉNDEZ, 2006.

Baseada na característica (sítio frágil) observada primeiramente por Lubs, o cromossomo X marcador passou a ser denominado cromossomo X-frágil tornando a citogenética o primeiro método laboratorial no diagnóstico da SXF (SUTHERLAND, 1977). A avaliação citogenética também permitiu identificar três novos sítios frágeis próximos a FRAXA. Um deles é o FRAXD que não está associado a manifestações clínicas. Outros dois, FRAXE e FRAXF, têm sido identificados em famílias onde há ocorrência de DM e erroneamente são classificados como portadores da SXF (Figura 2).

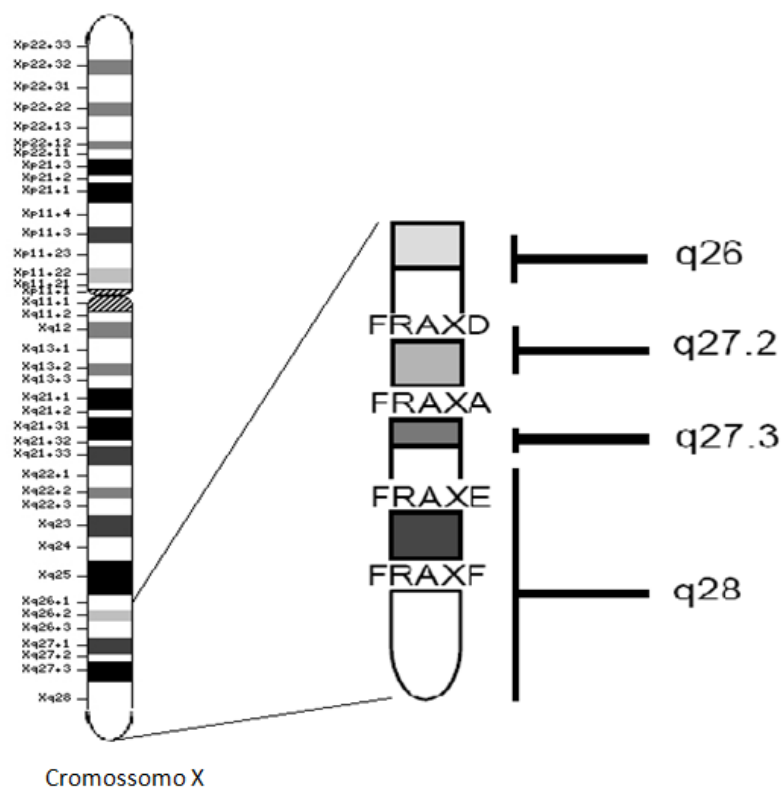


Figura 2. Sítios frágeis localizados na extremidade do braço longo do cromossomo X (Xq.)

Modificado de GARDNER & SUTHERLAND, 2004.

1.2 O Gene *FMRI* e a Proteína FMRP

Em 1991, o gene *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation 1*) (Figura 3), associado a SXF, foi localizado em Xq27.3, tendo como produto a proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation-Protein*). Esse gene é altamente conservado do ponto de vista evolutivo entre as espécies, possui 38 Kb (Kilobases) distribuídos em 17 éxons e 16 íntrons e apresenta em sua região 5' não traduzida (5'UTR) um microssatélite de trinucleotídeos citosina, guanina, guanina (CGG) (VERKERK *et al*, 1993; EICHLER *et al*, 1993). Este microssatélite de trinucleotídeos apresenta polimorfismo de tamanho na população geral, que varia de 6 a 55 repetições CGG, sendo os alelos mais frequentes com 28, 29 e 30 repetições (BROWN *et al*, 1993; CRAWFORD *et al*, 2001; MADDALENA *et al*, 2001).

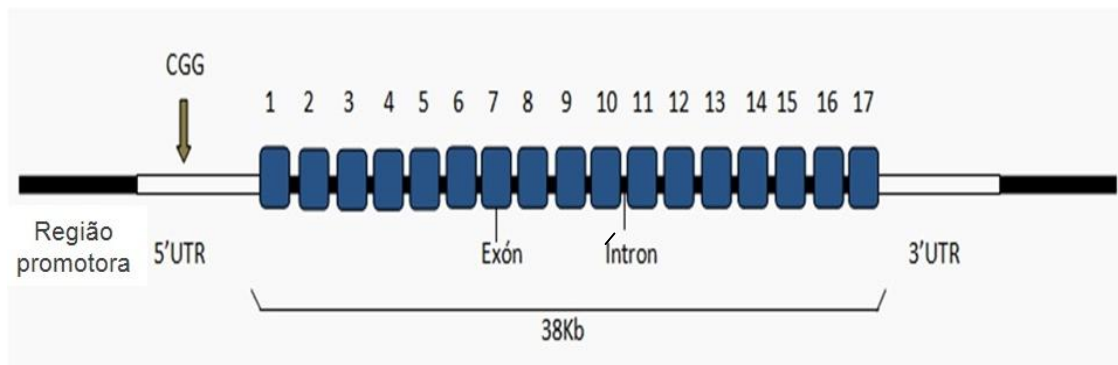


Figura 3. Representação esquemática do gene *FMRI*. Os 17 éxons simbolizados pelos quadrados que aparecem numerados. As regiões em branco representam sequências não traduzidas.

A etiologia da SXF está relacionada ao mecanismo de amplificação instável condicionado pelo aumento do número de cópias de trinucleotídeos CGG (Quadro 1) presente na 5'UTR do gene *FMRI* tendo como consequência a síntese baixa ou nula da proteína FMRP (CRAWFORD *et al*, 2001). Os casos nos quais a doença é decorrente de mutações na região codificadora do gene *FMRI* como deleções grandes e mutação de ponto, que contribuem para a perda de função do gene, ocorrem em menos de 5% dos casos (De BOULLE *et al*, 1993; JIN & WARREN, 2003).

A alteração no gene *FMRI*, causada pela expansão do número de repetições CGG é caracterizada por três grupos de alelos: (a) *Gray zone* no qual os indivíduos apresentam alelos contendo 45 a 60 repetições, sendo considerada à zona intermediária que pode ser estável em alguns casos, mas que em outros pode se expandir durante a transmissão para as gerações seguintes; (b) Pré-mutado, que abrange o intervalo de 61 a 200 repetições e distingue-se pela instabilidade, onde o indivíduo é caracterizado como portador da SXF; (c) Mutado ou mutação completa compreende alelos que apresentam >200 repetições, e que está associada à SXF (FILIPOVIC-SADIC *et al*, 2010).

Alguns autores eliminam de suas classificações os indivíduos *gray zone*, considerando somente os pré-mutados e afetados, além da faixa de normalidade (Figura 4). É importante considerar as características clínicas e o histórico familiar de cada indivíduo, pois pequenas diferenças, quatro ou cinco repetições de CGG, provavelmente não definem isoladamente a classificação (HAGERMAN & HAGERMAN, 2004).

Quadro 1. Descrição dos tipos de alelos do gene *FMRI* e sua associação ao número de trinucleotídeos CGG localizados na região 5'UTR do gene *FMRI*.

Alelos do Gene <i>FMRI</i>	Nº de Trinucleotídeos
Normal	6 a 55 CGG
<i>Gray Zone</i>	45 a 60 CGG
Pré-mutado	61 a 200 CGG
Mutado	> 200 CGG

Os indivíduos que possuem alelos pré-mutados, expressam níveis normais ou baixos de FMRP e possuem níveis elevados de RNAm, sugerindo a expressão alterada do gene *FMRI*, visto que compromete os níveis normais de FMRP (SHERMAN 2000; JACQUEMONT *et al*, 2004). Os homens portadores da pré-mutação que possuem 55 a 100 repetições CGG apresentam níveis 4 vezes maiores de RNAm quando comparados aos indivíduos normais, sendo que esses níveis podem aumentar de 4 para 10 vezes quando os indivíduos possuem 100 a 200 repetições CGG. As mulheres também apresentam níveis aumentados de RNAm, porém mais discretos do que os observados nos homens (PRIMERANO *et al*, 2002). O aumento significativo na produção de RNAm e diminuição de proteína FMRP na condição de pré-mutação parece estar relacionado a mudança de conformação do transcrito provocada pelas repetições de CGG expandidas, que poderia dificultar a ligação à subunidade 40S do ribossomo e o início do quadro de leitura da proteína no códon AUG com diminuição na síntese da proteína FMRP (MOORE *et al*, 1999; GRAY *et al*, 2007).

O gene *FMRI* com mutação completa está associado a um processo epigenético denominado de metilação. Entende-se como epigenética: “o estudo das mudanças na expressão dos genes que são hereditárias em decorrência da mitose e/ou meiose e que não envolvem mudança na sequência do DNA (NOVIK e colaboradores, 2002). A metilação do DNA (adição de um agrupamento metil à citosina) é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento, exerce grande importância no silenciamento e regulação gênica, sendo relevante quando ocorre em regiões ricas em dinucleotídeos CpG (união de citosina e guanina pela ligação fosfodiéster) conhecidas como ilhas CpG. Estas ilhas podem estar localizadas na região promotora dos genes, podendo estender-se até o primeiro éxon (HERMAN *et al*, 1996; TAKAI & JONES,

2002). Alguns genes caracterizados por ausência de expressão são geralmente metilados na região promotora na maior parte dos tecidos e em genes transcricionalmente ativos, essa região normalmente encontra-se não metilada (ESPADA & ESTELLER, 2010). Na SXF ocorre hipermetilação nas ilhas CpG, o que resulta no silenciamento do gene *FMRI*, tendo como consequência a não produção da proteína FMRP, ou seja, a ausência da proteína, leva aos sinais clínicos da doença (ALLIENDE *et al*, 2006). Em indivíduos normais as ilhas CpG não se encontram metiladas, assim o gene *FMRI* é expresso normalmente, produzindo a proteína FMRP.

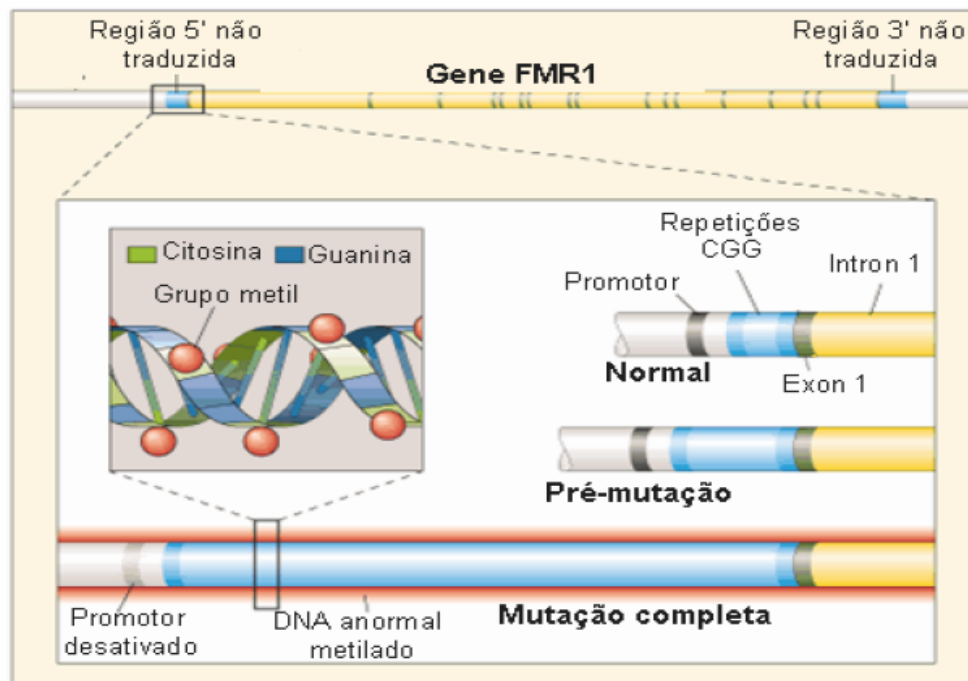


Figura 4. Representação do gene *FMRI* com as repetições CGG representando as três categorias de alelos, o normal, a pré-mutação e a mutação completa, que apresenta o DNA metilado.

http://www.bioquest.org/lifelines/chautauqua_2004/lol_temp_blue.php?project_id=51.

O produto do gene *FMRI*, a proteína FMRP, é altamente sintetizado durante a embriogênese em diferentes tecidos tais como o cérebro, os testículos, os ovários, o epitélio esofágico, o timo, os olhos e o baço (VERHEIJ *et al*, 1995). Essa proteína está envolvida no desenvolvimento e função normais do cérebro, com papel essencial tanto na função sináptica como no crescimento dos dendritos (DARNEL *et al*, 2001; IRWIN *et al*, 2001). Embora a função exata da FMRP ainda não seja totalmente esclarecida, suas atividades podem estar relacionadas ao trânsito nuclear-citoplasmático de RNA;

controle de tradução; transporte de RNA nos dendritos; tradução e regulação dendrito-específico (JIN & WARREN, 2000; POZDNYAKOVA & REGAN, 2005).

1.3 Instabilidade das Repetições CGG e Transmissão

A base molecular da SXF é bastante peculiar quando comparada aos padrões típicos observados em outras desordens de etiologia genética. Essa síndrome representa uma das primeiras alterações neurogenéticas pertencente a um grupo crescente de enfermidades causadas por um tipo particular de mutação denominada “mutação dinâmica”. Ao contrário do que acontece nas mutações clássicas e estáticas, a mutação dinâmica não é um evento único. Este tipo de mutação difere das mutações conhecidas, uma vez que a instabilidade criada no DNA pela expansão das sequências de trinucleotídeos aumenta a probabilidade de uma nova expansão ocorrer na geração seguinte e em sucessivas gerações, em um processo progressivo que evolui passo a passo desde um período variável de pré-mutação até a eclosão da mutação completa (PIMENTEL, 1999).

A partir de um determinado número de repetições as sequências tornam-se instáveis favorecendo as expansões e/ou contrações, sendo que as expansões ocorrem com maior frequência na SXF. Essa instabilidade pode ocorrer tanto em células germinais, quanto somáticas e em determinados indivíduos podem exibir uma heterogeneidade somática, tanto ao nível do número de repetições quanto ao seu estado de metilação sendo que os indivíduos portadores de alelos com graus de metilação e/ou número de repetições CGG diferente nas células somáticas, denominam-se mosaicos (DOBKIN *et al*, 1996; ROUSSEAU *et al*, 1991; WÖHRLE *et al*, 1992).

O mecanismo de instabilidade não está apenas relacionado à extensão do alelo (pré-mutados e com mutação completa), existe uma relação entre a integridade da repetição e sua propensão a se expandir. A instabilidade apresenta relação com características estruturais da sequência CGG, como as inserções de AGG. Essas trincas interrompem as repetições CGG, cuja presença e localização também influenciam a estabilidade do alelo impedindo erros durante a replicação (YU *et al*, 1991; SULLIVAN *et al*, 2002; NOLIN *et al*, 2003). Aproximadamente 70% das grandes expansões têm somente uma unidade AGG, enquanto os alelos normais, são interrompidos por 1 a 3 unidades AGG (MANDEL & BIANCALANA; 2004; VAN ESCH, 2006). Crawford e colaboradores (2000) demonstraram diferentes variações de alelos susceptíveis a

expansão (*gray-zone*), entre caucasianos (41-60 CGG) e africanos-americanos (35-60 CGG) e que apesar da população africano-americana apresentar frequência baixa de alelos *gray-zone*, exibe frequência maior de alelos com repetições CGG “puras” e/ou apenas com uma interrupção AGG.

Os fatores que levam a expansão ainda não são bem conhecidos, os modelos moleculares de expansão de repetições podem explicar a maioria dos dados experimentais, porém nenhum deles foi comprovado. Alguns estudos, relacionados a doenças causadas por expansões, sugerem mecanismos comuns para a origem das repetições expandidas, bem como a identificação de elementos *cis* e *trans*-atuantes que estariam associados à instabilidade genética (BROCK *et al*, 1999; RICHARDS, 2001). A explicação mais simples seria que a própria natureza repetitiva da sequência levaria ao “deslize” durante a replicação do DNA, que não fosse reparado, poderia tornar-se a repetição expandida após o segundo ciclo de replicação (KUNKEL, 1993; STRAND *et al*, 1993). Outra possível explicação seria a ocorrência de estruturas secundárias no segmento de DNA contendo repetições que poderiam levar a expansões e/ou contrações durante a replicação e que a instabilidade poderia ser influenciada pela orientação do segmento de DNA contendo as repetições, incluindo sua relação com a forquilha de replicação e o fragmento de Okazaki (MAURER *et al*, 1996; MIRKIN, 2006).

Os estudos realizados nas famílias dos indivíduos afetados pela SXF (Figura 5) demonstraram o padrão de herança incomum, o que chamou a atenção de alguns pesquisadores, tornando-se peculiar principalmente nos casos de portadores “homens ou mulheres transmissoras normais” que transmitiam a mutação para seus netos através de seus filhos ou filhas, mas que aparentemente não eram afetados (HAGERMAN, 1999). Esse padrão de herança, inexplicável na época, ficou conhecido como “Paradoxo de Sherman”, em referência à pesquisadora que primeiro o descreveu. Mais tarde foi revelado que esses “homens ou mulheres transmissoras normais” correspondiam ao estado de pré-mutação (SHERMAN, 1985).

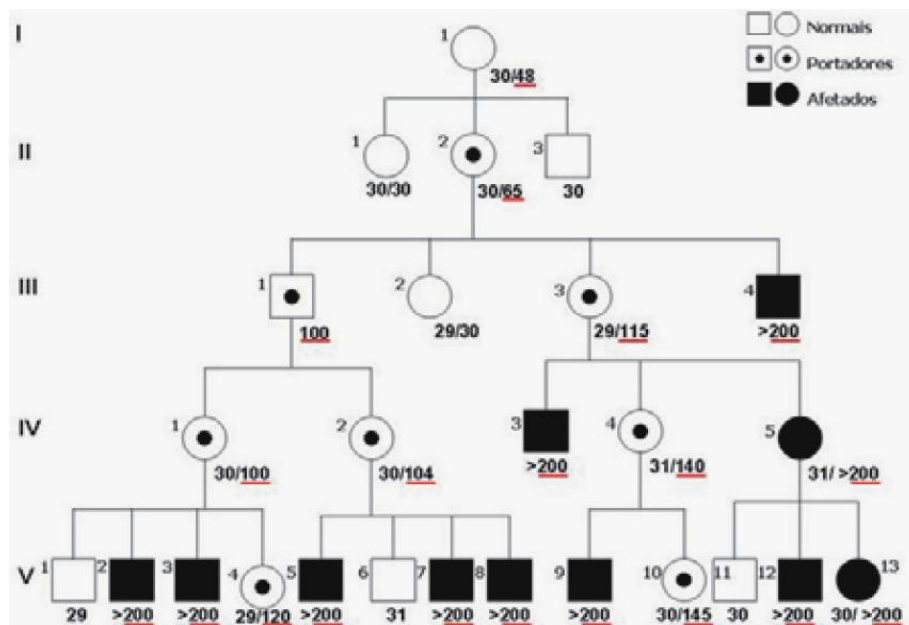


Figura 5. Alelos sublinhados representando seu crescimento em tamanho I-1 (48 CGG) até atingir a mutação completa (>200 CGG). Os cônjuges dos portadores de alterações do gene *FMR1* que transmitiram seus alelos não foram representados, pois são considerados normais quanto ao tamanho de repetições CCG.

NASCIMENTO e colaboradores, 2009.

O risco de expansão da pré-mutação para a mutação completa ocorre geralmente por transmissão materna (YU *et al*, 1991; ROUSSEAU *et al*, 1994) durante a meiose, na oogênese e na fase das mitoses pós-zigóticas (BONTEKOE *et al*, 2001; MCCONKIE-ROSELL *et al*, 2005). Assim, os casos afetados pela SXF, sempre serão herdados, ou seja, não há possibilidade de se passar de alelo normal para mutação completa tendo obrigatoriamente que passar em uma geração, por uma mulher portadora da pré-mutação. Assim, todos os afetados são necessariamente filhos de mãe ou pai com pré-mutação. Quanto maior o número de repetições CGG da pré-mutação, maior o risco de ocorrer à mutação completa na geração seguinte (Figura 6).

A expansão da pré-mutação para a mutação completa por transmissão paterna é rara. Porém, existe um relato de transmissão onde o genitor apresentava mosaicismos em suas células (ZEESMAN *et al*, 2004). Geralmente os homens transmitem para suas filhas apenas pequenas expansões ou contrações, ou seja, o homem apenas transmite a pré-mutação para suas filhas. Nas células germinativas masculinas existe um mecanismo de seleção onde indivíduos com mutação completa apresentam em seus espermatozoides apenas alelos pré-mutados. De algum modo, a mutação completa

regride para pré-mutação, fazendo deste mecanismo uma proteção da linhagem germinativa masculina (REYNIERS *et al*, 1993).

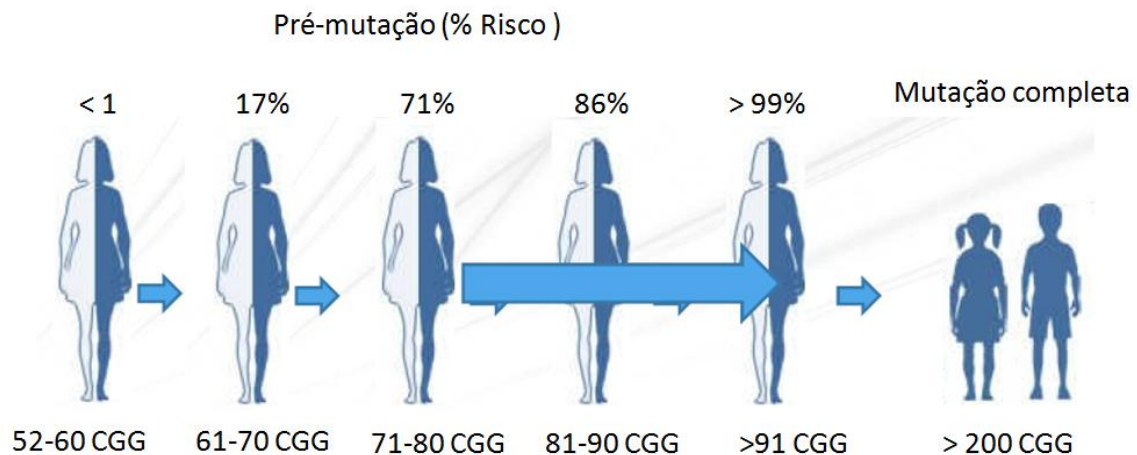


Figura 6. Risco de expansão em mulheres portadoras da pré-mutação para a mutação completa segundo seu número de trinucleotídeos CGG no gene *FMR1*.

Adaptado de MILÀ & MALLOLAS, 2001.

1.4 Implicações Clínicas

1.4.1 Portadores da Pré-mutação

Os portadores da pré-mutação geralmente são considerados “cl clinicamente normais”. Porém estudos recentes têm relacionado esses portadores a alterações clínicas, como menopausa precoce (POF: *Premature Ovarian Failure*) e Síndrome de Tremor Ataxia (FXTAS- *Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome*).

Cerca de 24% das portadoras da pré-mutação têm POF (OMIM 311360), embora exista forte associação, a presença da pré-mutação não é fator determinante para desenvolver a menopausa precoce (SHERMAN, 2000). A ausência da proteína FMRP não aumenta a probabilidade de uma mulher desenvolver essa desordem, por isso, entre as mulheres portadoras da mutação completa, não há risco do desenvolvimento dessa patologia. O fato das mulheres pré-mutadas tenderem a entrar em menopausa mais cedo que as não portadoras, sugere que a menopausa precoce seja o extremo do espectro de defeitos ovarianos da pré-mutação (VIANNA-MORGANTE *et al*, 1999).

Outra característica clínica associada à pré-mutação é a FXTAS (OMIM 300623), sendo uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada por tremor, dificuldade na marcha e no equilíbrio, ansiedade e perda de memória. Ocorre em 30% a 40% dos homens e menos de 5% das mulheres com alelos pré-mutados no gene *FMR1* a partir dos 50 ou 60 anos de idade. A penetrância em homens pré-mutados com a FXTAS aumenta com a idade, passando de 17%, em homens com idade entre 50 a 59 anos, para 74% em homens com mais de 80 anos (ABRAMS, 2007). As mulheres portadoras apresentam sintomas de ataxia e tremor mais brandos devido ao mecanismo de mosaicismo da inativação do cromossomo X característico do processo de “Lyonização”. Cerca de 20% dos homens pré-mutados apresentam sinais de demência, enquanto que nas mulheres pré-mutadas esses sinais não foram observados (HAGERMAN *et al*, 2004; JACQUEMONT *et al*, 2004; VAN ESCH *et al*, 2005).

1.4.2 Afetados pela SXF

Alguns afetados pela SXF apresentam a cabeça grande e peso pouco aumentado ao nascimento. Em geral a pele é aveludada e muito macia, as mãos e pés são gordos, podendo possuir nas mãos prega palmar única em 22% dos casos, face pequena, longa e centralmente inchada, fendas palpebrais estreitas, orelhas proeminentes e displásicas. Essas características são sutis e podem não ser percebidas. Portanto, a maior parte dos pacientes não é diagnosticada durante a infância (HAGERMAN, 2002).

Os portadores da mutação completa da SXF podem desenvolver uma ou mais características clínicas (Figura 7) entre essas estão: face alongada com queixo proeminente (80%), orelhas em abano (66%), macroorquidia (80%), hiperextensibilidade das articulações (73%), palato alto (63%), prolapso da válvula mitral (55%), pés planos, hipotonia muscular, estrabismo e macrocefalia (HAGERMAN, 2002). Além da DM em graus variáveis, apresentam problemas de atenção associados à hiperatividade, dificuldade de aprendizagem, contato ocular pobre, transtornos de linguagem, hábito de morder as mãos, ansiedade social e comportamento autista (MCCONKIE-ROSELL *et al*, 2005). As características das mulheres portadoras de mutação completa se apresentam de forma mais branda presumidamente devido à inativação do cromossomo X (ROUSSEAU *et al*, 1994; MILÀ & MALLOLAS, 2001).

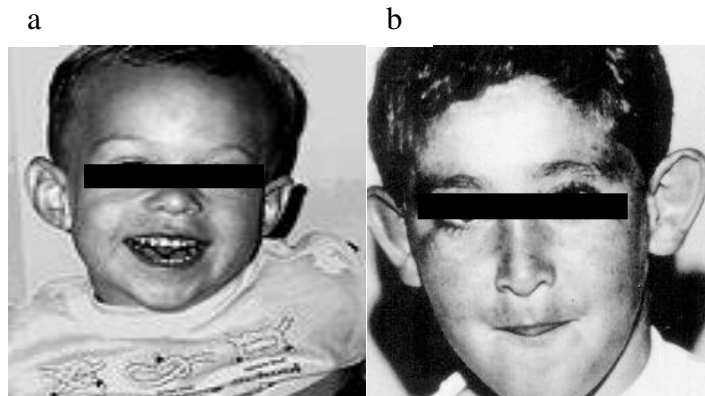


Figura 7. Características clínicas da síndrome do X-frágil: (a) orelhas em abano, (b) orelhas em abano e face alongada.

FÉLIX & PINA-NETO, 1998.

Os portadores da mutação completa são férteis. Entretanto, homens e mulheres com DM grave raramente se reproduzem em decorrência de suas limitações sociais e cognitivas (CARVALHO, 2003).

Não se deve estabelecer relação simples e direta entre o número de repetições CGG de uma classe alélica e o grau de comprometimento do afetado na SXF. Assim, o indivíduo com a mutação completa, com 500 repetições CGG, não terá necessariamente o quadro clínico mais grave do que outro indivíduo com mutação completa que apresenta 300 repetições CGG. O gene *FMRI* estará silenciado nos dois casos, porém os sintomas poderão ser variados (BROWN, 2002).

Há ainda indivíduos designados por *High Functional Males*, que possuem mutação completa não metilada, nestes casos não há manifestação clínica da Síndrome, uma vez que não ocorre a inativação do gene *FMRI* (HAGERMAN, 1996).

1.5 Diagnóstico

Os afetados pela SXF apresentam características clínicas variadas mesmo entre indivíduos da mesma família. Em função da grande variabilidade fenotípica dos pacientes com a SXF, estima-se que 65% dos casos não têm sido diagnosticados (ALLIENDE *et al*, 2006). Crawford e colaboradores (2002) demonstraram que um quarto a um terço das crianças identificadas com a SXF em escolas públicas não são diagnosticados antes dos 10 anos de idade.

O diagnóstico clínico muitas vezes indica o conjunto de sinais e sintomas sugestivos da SXF, apesar da tríade face alongada, orelhas grandes e macroorquidia,

presentes em 90% dos casos, apenas sugerirem, mas, não confirmam o diagnóstico (HAGERMAN, 2002).

Antes da identificação do gene responsável pela SXF, em 1991, seu diagnóstico era realizado por meio da utilização de técnicas citogenéticas. Apesar da possibilidade de identificação de outras alterações cromossômicas numéricas ou estruturais comumente encontradas em indivíduos com DM e outros distúrbios cognitivos, esse método não é recomendado para o diagnóstico da SXF por apresentar sensibilidade e especificidade baixa (PIMENTEL, 1999; MADDALENA *et al*, 2001). A técnica de citogenética pode falhar na detecção da SXF em mulheres e homens afetados pela síndrome, que podem não apresentar a fragilidade no cromossomo X, como também podem não detectar a presença da pré-mutação e *gray zone* (JACKY *et al*, 1991).

As ferramentas moleculares são as mais utilizadas para o diagnóstico da SXF. Dentre os testes de pesquisa de doenças genéticas, o estudo do gene *FMRI* é um dos mais solicitados (MADDALENA *et al*, 2001).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica com custo baixo, versátil, rápida, que utiliza pequenas quantidades de DNA genômico (DNAg), além de apresentar sensibilidade e especificidade elevadas no diagnóstico de indivíduos afetados, em particular do sexo masculino. Dependendo do número de repetições CGG presentes no gene *FMRI* os produtos da reação de PCR apresentam diferentes tamanhos, o que é indicativo do número de repetições CGG presentes no alelo de cada indivíduo analisado (QUEIROZ, 2006).

Entre as diversas técnicas de PCR existentes para detectar a SXF (FU *et al*, 1991; ZHOU *et al*, 2004; SALUTO *et al*, 2005) a mais utilizada atualmente é a técnica descrita por Tassone e colaboradores (2008), a qual utiliza duas reações de PCR. A primeira reação detecta alelos normais e pequenas pré-mutações e a segunda indica a presença de alelos expandidos. A principal característica dessa PCR é a utilização da betaína que auxilia na amplificação de repetições CGG largas e a utilização, apenas na segunda reação de PCR, de um *primer* quimérico o qual pareia na expansão CGG (>50 CGG) de forma aleatória, a cada ciclo da PCR, formando um rastro (*smear*). A visualização do rastro no gel apenas sinaliza a presença de alelos com "pré-mutação grande" ou alelos com mutação completa.

A análise do gene *FMRI* por *Southern blotting* permite identificar alelos em todas as faixas, incluindo os pré-mutados de grande expansão e mutação completa, além de identificar a presença ou ausência da metilação. O teste utiliza combinação de

enzima de restrição para detectar a expansão como a *EcoRI*, com sonda StB12.3 ou sonda equivalente e enzimas para detectar a metilação como a *EagI* ou *NruI*; uma vez detectada a presença de DNA metilado há falha no corte, diferenciando alelos metilados e não metilados. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão enzimática são submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose juntamente com um marcador de peso molecular conhecido. O DNA é transferido para membrana de nylon e hibridizado com a sonda marcada com material radioativo ou quimioluminescente, conforme descrito recentemente por GOLD e colaboradores (2000), fato que evita a manipulação de material radioativo em laboratórios. A técnica de *Southern blotting* é inconveniente como diagnóstico de rotina, apresenta custo alto, é laboriosa, requer quantidade grande de DNAg e em alguns protocolos, exige a manipulação de material radioativo (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2001).

Os laboratórios geralmente utilizam mais de uma técnica molecular para o diagnóstico da SXF, pois nenhuma delas detecta todos os tipos de alterações no gene *FMRI* com a mesma precisão. A utilização dos dois métodos, PCR como triagem e *Southern blotting* os para casos inconclusivos, é confiável, porém também apresentam limitações, com dificuldade em diferenciar alelos normais próximos à *gray zone*, alelos na *gray zone* e alelos pré-mutados de expansão baixa. Essa dificuldade se acentua no diagnóstico de mulheres, onde a visualização do resultado no gel entre dois alelos de tamanho normal pode ser idêntica ao de um alelo normal e outro com mutação completa (QUEIROZ, 2006). Portanto, diagnosticar a SXF nos laboratórios de genética permanece um desafio, com necessidade de atualização em técnicas modernas, visando assegurar resultados mais conclusivos.

O diagnóstico precoce poderá promover oportunidades para intervenção educativa e terapêutica. Além disso, a identificação de indivíduos afetados é importante para o aconselhamento genético familiar com orientação relacionadas ao risco de recorrência, além de possibilitar a identificação de pré-mutados sob risco de terem descendentes afetados pela SXF. É de grande importância a identificação das famílias nas quais os alelos estão se segregando na forma de pré-mutação, devido ao mecanismo de herança característico apresentado pela síndrome, onde os alelos pré-mutados segregam por muitas gerações sem que nenhum membro da família seja afetado (VIANNA-MORGANTE, 1999; PANDEY, 2004). Também é recomendada a análise molecular do gene *FMRI* para avaliar ou reavaliar casos de atraso de seu

desenvolvimento e DM de origem desconhecida, devido ao fato dos sintomas da SXF serem bastante sutis e variáveis, e também nos casos de POF e FXTAS nas famílias com indivíduos afetados pela SXF.

1.6 Aspectos Epidemiológicos

Aparentemente a SXF incide de forma similar em todos os grupos étnicos, sendo responsável por aproximadamente 14% de todas as DM idiopáticas no sexo masculino e por um terço de todas as DM ligadas ao cromossomo X (TURNER *et al*, 1996). Apresenta prevalência na população geral entre homens de origem caucasiana de aproximadamente 1 em 4.000 a 6.000 com variação de 1 em 3.717 a 8.918 e entre as mulheres, na população geral, nenhum estudo foi realizado para determinar a prevalência da SXF. Baseada na prevalência da doença nos homens, estima-se que 1 em 8.000 a 9.000 mulheres podem estar afetadas pela SXF (CRAWFORD *et al*, 2001). Apesar da prevalência da SXF apresentar similaridade na maior parte dos grupos, podem ocorrer variações entre as populações. Falik-zaccai e colaboradores (1997) relatam que judeus tunisianos apresentam valores superiores em comparação à população caucasiana. Outras estimativas realizadas em populações africanas sugerem a prevalência de aproximadamente de 1 em 2500 na população geral, maior do que a observada em populações caucasianas (ELBAZ, 1998; CRAWFORD *et al*, 2002).

Os dados epidemiológicos referentes à pré-mutação na população geral incluem estudo realizado em Quebec, Canadá, no qual Rousseau e colaboradores (1995) detectaram em 10.624 amostras do sexo feminino a prevalência de 1 em 259 mulheres com > 54 repetições CGG. Mais tarde, Dombrowski e colaboradores (2002) investigaram a pré-mutação na mesma população canadense em 10.572 amostras do sexo masculino e descreveram a prevalência de 1 em 813 homens. Outro estudo em Israel identificou em 14.334 mulheres, a prevalência de 1 em 69 portadoras com > 50 repetições CGG, sendo que, 1 em 113 mulheres com >54 repetições CGG eram de diferentes etnias judaicas e encontravam-se em fase pré-conceptiva ou gestacional e sem histórico familiar de DM. Esse estudo evidenciou a prevalência alta na população geral e recomenda a triagem de mulheres portadoras de pré-mutação em larga escala na região estudada (TOLEDANO-ALHADEF *et al*, 2001).

Crawford e colaboradores (2001) acreditam que ainda não existe uma estimativa concreta para prevalência da SXF no mundo. A maior parte das pesquisas que caracterizam frequências alélicas do gene *FMRI* é composta por indivíduos do sexo masculino provenientes de escolas especiais com DM idiopática, sendo os resultados extrapolados para a população geral. Outro fator que influencia diretamente os resultados de prevalência é o subdiagnóstico. A grande maioria dos indivíduos pesquisados com a SXF é oriunda de países desenvolvidos, onde o diagnóstico é realizado de rotina, o que difere dos países subdesenvolvidos onde há escassez de centros para o diagnóstico dessa síndrome (GRASSO *et al*, 2003). Dessa forma são necessários estudos adicionais utilizando amostragem maior, visando estabelecer a prevalência da SXF na população geral (Tabela 1) de maneira a esclarecer a presença de diferenças significativas da sua distribuição entre as populações e gerar dados epidemiológicos mais consistentes. Segundo Tassone e colaboradores (2008) esse fato poderia estar relacionado com a frequência baixa dos alelos com mutação completa e o custo alto para diagnosticar a SXF.

Tabela 1. Principais estudos que utilizaram amostras representativas relacionadas à prevalência da pré-mutação no gene *FMRI*.

País	Referência	N^o	Masculino	Feminino
Canadá	Rousseau e colaboradores, 1995	10.624	—	38,6/10.000
Israel	Pesso e colaboradores, 2000	9.459	—	137/10.000
Israel	Toledano-Alhadeff e colaboradores, 2001	14.334	—	88,4/10.000
Canadá	Dombrowski e colaboradores, 2002	10.572	12,3/10.000	—
Espanha	Rife e colaboradores, 2003	5.000	8,1/10.000	—

2.0 JUSTIFICATIVA

A Síndrome do X-frágil vem merecendo grande nos últimos anos não apenas devido a prevalência e subdiagnóstico, mas também pelas peculiaridades de sua transmissão, grau elevado de recorrência e por distúrbios a ela associados.

A prevalência da SXF na população geral, todavia não está estimada na Bahia ou mesmo no Brasil. Mingroni-Neto e colaboradores (1990) estimaram a frequência da SXF em 8% dos homens e 4% das mulheres com DM; Oliveira e colaboradores (2004) demonstraram a frequência de 4% em 25 indivíduos do sexo masculino com DM. A maior parte dos trabalhos que caracterizam polimorfismos no gene *FMRI* são provenientes das regiões Sul e Sudeste do país onde os serviços de genética médica, apesar da dificuldade na realização das técnicas moleculares, são bem estruturados (HOROVITZ, LLERENA, DE MATTOS, 2005).

Segundo ABE-SANDES e colaboradores (2010) a população de Salvador é bastante miscigenada apresentando contribuição ancestral de diferentes populações (africana 49,2%, européia 36,3% e ameríndia 14,5%). Os dados gerados no presente estudo servirão para distinguir as frequências alélicas do gene *FMRI* em relação ao número de repetições CGG na população geral de Salvador-BA, podendo contribuir para estimar a prevalência da SXF nesta cidade.

É preciso ressaltar a importância da realização de mais estudos na região nordeste, onde existe carência não apenas de atendimento aos pacientes, mas também de informações sobre essa doença. Diversas formas de alteração no gene *FMRI* podem estar presentes em uma mesma família tornando a SXF forte candidata a estudos e rastreamento na população em geral (CRAWFORD *et al*, 2001).

Considerando a falta de um estudo prévio na população geral de Salvador-BA, justifica-se o estudo molecular no gene *FMRI*, visando para caracterizar a distribuição dos seus alelos nesses indivíduos. Uma vez definidas essas frequências, torna-se possível avaliar a situação de cada grupo em relação ao risco populacional para ocorrência da doença, auxiliando a instalação de políticas de saúde específicas.

3.0 OBJETIVO

3.1.1 Geral

Estabelecer a frequência das classes alélicas do gene *FMRI* em indivíduos do sexo masculino da população geral da cidade de Salvador-BA.

3.1.2 Específicos

- Definir a distribuição alélica dos polimorfismos da Região 5'UTR no gene *FMRI* em homens da população geral de Salvador-BA, possibilitando avaliar a ocorrência da doença na região;
- Implementar a técnica molecular para o diagnóstico da SXF em homens com DM idiopática.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho de Estudo

Este é um estudo descritivo de corte transversal, com finalidade de caracterizar os alelos da região 5'UTR no gene *FMRI* em uma amostra de homens da população geral de Salvador-BA. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ-BA) sob parecer nº 96/2006. A estratégia de investigação seguiu o fluxograma abaixo (Figura 8).

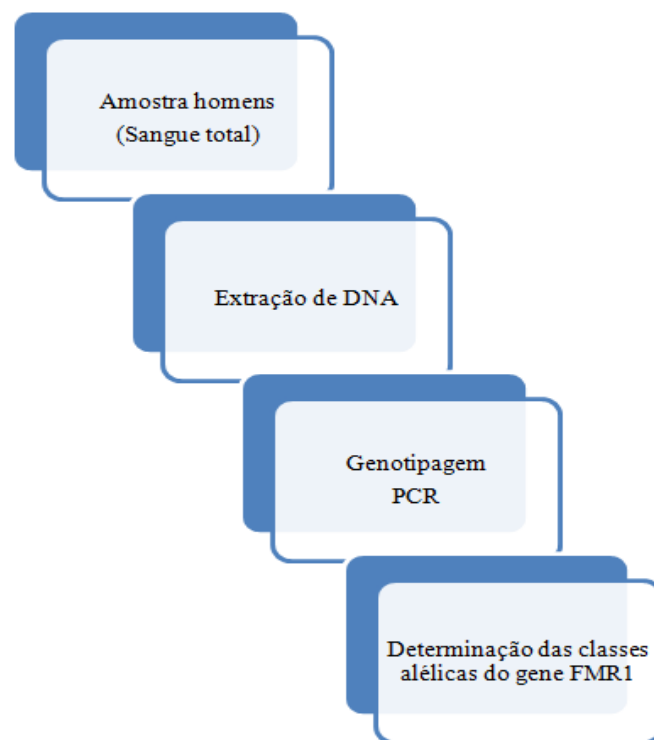


Figura 8. Fluxograma utilizado na análise laboratorial do estudo de avaliação dos alelos da região 5'UTR no gene *FMRI* em homens da população geral de Salvador-BA.

4.2 Casuística

A casuística deste estudo incluiu amostras de DNA provenientes de outro estudo desenvolvido pelo Instituto de Saúde Coletiva (ISC) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), que avaliou as condições sanitárias sobre a saúde da população de

Salvador, visando a implantação de um projeto extenso centrado em esgotamento sanitário, ampliação da rede de abastecimento de água e melhoria do sistema de coleta de lixo denominado de Programa Bahia Azul (ANDRADE, 1997).

A cidade de Salvador, capital do estado da Bahia, possui uma área de 706,799km² sendo composta por uma população miscigenada (ABE-SANDES e colaboradores, 2010) com 2.892.625 habitantes (censo demográfico brasileiro, IBGE 2007 - <http://www.ibge.gov.br>). Em virtude da extensão geográfica e da densidade populacional da cidade, foi utilizado um conjunto de 30 áreas intra-urbanas (Figura 9) denominadas áreas sentinelas (BARRETO e colaboradores, 2006).

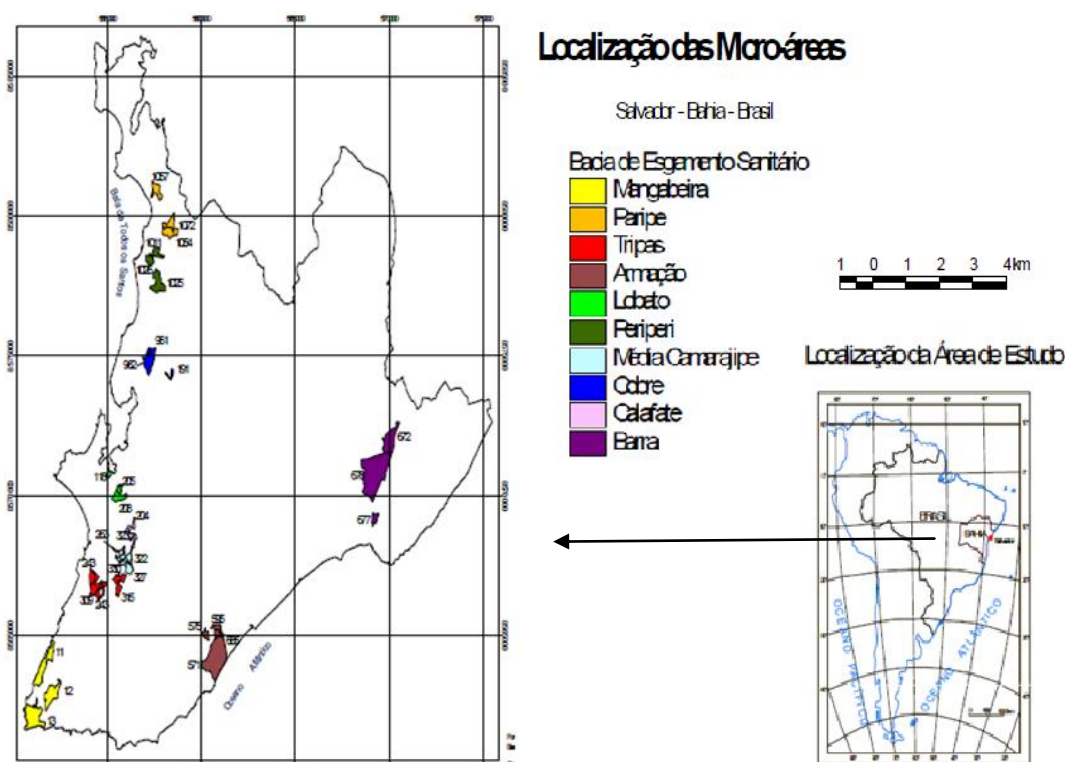


Figura 9. Mapa da cidade de Salvador, demonstrando a as bacias onde foram coletadas amostras para o projeto Bahia Azul.

LIMA, 2009.

As micro-áreas que participaram do estudo foram acompanhadas durante toda a implantação do Programa Bahia Azul, possibilitando comparar episódios diarréicos, prevalência de helmintoses, estado nutricional de crianças e prevalência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos antes e após o programa (BRASIL, 2004). Esse estudo apresenta o total de 1515 amostras, sendo 878 do sexo feminino e 637 do sexo

masculino com idade entre 8 a 74 anos, tendo como fiel depositário o Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) do CPqGM/FIOCRUZ-BA.

Entre as 637 amostras do sexo masculino do projeto Bahia Azul foram genotipadas 511 amostras para o presente estudo sendo que, as demais não foram genotipadas ou por falta de material (DNA) ou dificuldade da técnica.

4.3 Análise Laboratorial

4.3.1 Extração de DNA

O DNAg dos indivíduos foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se a técnica fenol-clorofórmio descrita previamente por Panasci e colaboradores (1977). Em seguida as amostras foram quantificadas no equipamento NanoDrop[®] Spectrophotometer ND-1000 e armazenadas à temperatura de -20°C no LASP/ CPqGM /FIOCRUZ-BA.

4.3.2 Estudo da região 5'UTR do gene *FMRI*

Os alelos da região 5'UTR do gene *FMRI* em indivíduos do sexo masculino foram identificados por PCR, segundo Haddad e colaboradores (1996) e fundamenta-se na amplificação da região polimórfica do gene *FMRI*, onde se encontram as repetições CGG. Este método é composto por três *primers* (Figura 10): *primers* Eag-U e f^c que flanqueiam a região do polimorfismo e onde se localizam as repetições CGG, permitindo a amplificação de fragmentos que variam de 488 a 632pb em indivíduos normais, e de 635 a 1070pb em indivíduos pré-mutados, sendo que na presença da mutação completa ocorre a ausência de fragmento. Os *primers* Eag-U e Eag-L flanqueiam a região não polimórfica do gene *FMRI* referente ao fragmento controle de 223pb. Esse controle tem como finalidade a exclusão de resultados falso-positivos, como nos casos de mutação completa onde não há amplificação da região polimórfica por conta de sua extensão.

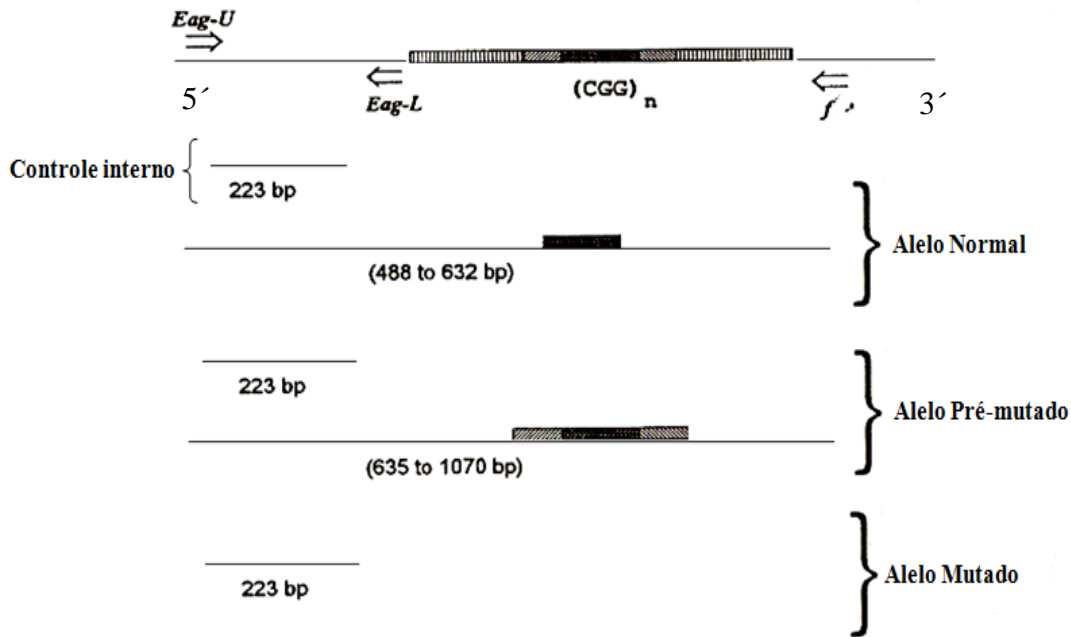


Figura 10. Esquema da PCR demonstrando os *primers* e regiões amplificadas do gene *FMRI* e os genótipos correspondentes.
Adaptado de Haddad e colaboradores, 1996.

As reações da PCR foram realizadas em volume final de 25µl contendo: 2,0µl de DNAg (100ng); 0,32µl de *taq* DNA polimerase (5U/µl); 0,08 µl do *primer* Eag L (2 µM); 0,3 µl do *primer* (7,5 µM); 0,2 µl do *primer* f^c (5µM) (Tabela 2); 0,5µl de cada dATP, dCTP e dTTP (10mM); 0,13µl de dGTP; 0,75µl de 7-deaza dGTP (5mM); 2,5µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl a 20 mM /ph 8.8, 25°C, KCl a 10 mM, (NH₄)₂SO₄ a 10 mM, MgSO₄ a 2 mM e Triton X-100 a 0.1%); 1,25 µl de KCl 0,8 M; 2,0 µl de MgCl₂ 25mM; 2,5µl de DMSO (dimetil sulfóxido) 10% e 11,37µl água de injeção estéril.

Tabela 2. Sequências de *Primers* utilizados para amplificação dos alelos do gene *FMRI* segundo Haddad e colaboradores, 1996.

<i>Primer</i>	Sequência
Eag-L	CGC TGC GGG TGT AAA CAC TGA AAC CAC GTC
Eag-U	CGA CCT GTC ACC GCC CTT CAG CCT TCC
f ^c	AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA

A mistura da reação foi submetida à amplificação em termociclador nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 1,5 minutos a 94°C, 1 minuto a 65°C e 2 minutos a 72°C; 10 minutos a 72°C.

Após a realização da PCR, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% não desnaturante (Figura 11). Em seguida os fragmentos foram visualizados pela coloração com nitrato de prata segundo, Sanguinetti e colaboradores (1994).

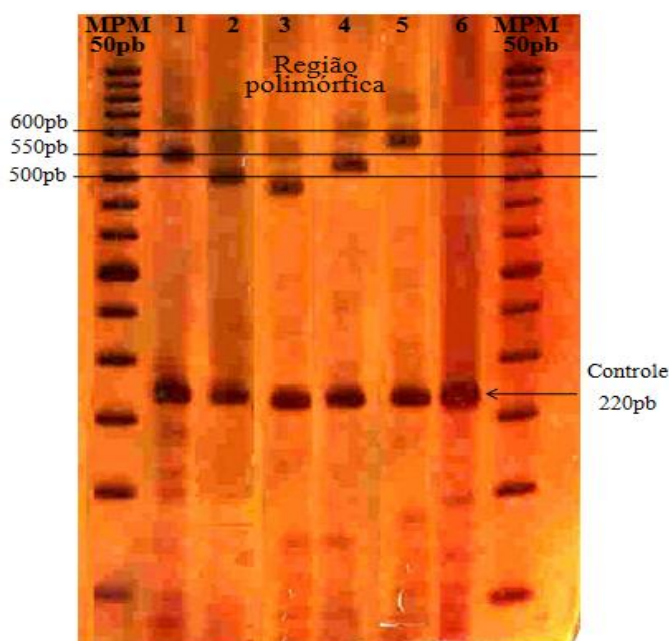


Figura 11: Foto do gel de poliacrilamida a 6% demonstrando a amplificação do gene *FMR1* marcador de 50 pares de bases (pb), alelos normais (1 a 5) e mutação completa (cedido por Alves, 2009) (6).

4.3.3 Discriminações das classes alélicas no gene *FMR1*

O protocolo proposto por Haddad e colaboradores (1996) é utilizado para a amplificação da região 5'UTR do gene *FMR1*, porém não permite determinar exatamente o número de repetições CGG. No entanto, é possível estabelecer categorias alélicas de acordo com o tamanho do fragmento obtido na reação da PCR, tendo como referência um marcador de pares de bases (Quadro 2). Essa categorização em classes já foi utilizada anteriormente por Haddad e colaboradores (1999) para relacionar alelos normais, *gray zone* e pré-mutados.

Quadro 2. Relação entre as classes, o número de repetições CGG e o tamanho do produto da PCR do gene *FMRI*.

Alelo	Classes	Nº repetições CGG	Produto da PCR
Normal	1	< 10 CGG	<500 pb
	2	11 a 26 CGG	503 a 548 pb
	3	27 a 40 CGG	551 a 590 pb
Gray-zone	4	41 a 60 CGG	593 a 650 pb
Pré-mutado	5	>60CGG	>650pb
Mutado	6	>200CGG	Ausência de amplificação

As classes alélicas foram determinadas baseando-se na relação entre o número de repetições CGG e o tamanho do fragmento obtido na PCR. De acordo com a sequência referência, extraída do *GenBank* (L29074) foi possível identificar os pontos de pareamento dos *primers*, as sequências intercalantes e a região de inserção das repetições CGG (Figura 12).

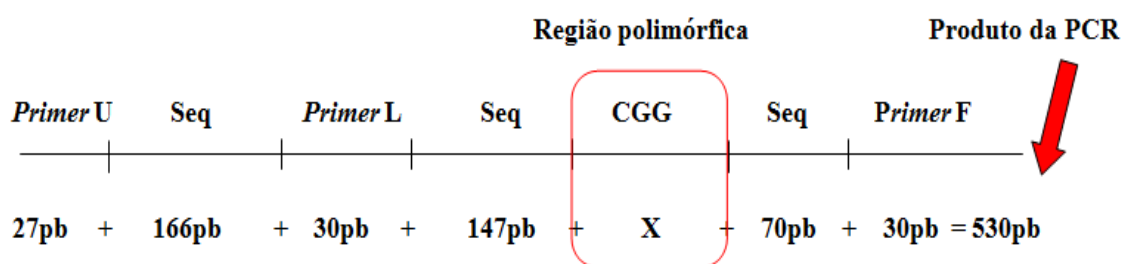


Figura 12. Esquema demonstrando a relação entre o tamanho do fragmento (pb) e o número de repetições CGG no gene *FMRI*. O alelo acima apresenta 20 repetições CGG.

Desta forma, hipoteticamente, um indivíduo com apenas uma repetição CGG na região polimórfica flanqueada pelos *primers* U e F terá um fragmento com tamanho de 473pb (Classe 1/<500pb). Em contrapartida, os alelos com 11 repetições CGG terão inseridos 33 nucleotídeos na região polimórfica, aumentando o fragmento amplificado de 473pb (1 repetição CGG) para 503 nucleotídeos (Classe 2/503pb).

5.0 RESULTADOS

Este é o primeiro estudo determinando a frequência dos alelos do gene *FMRI* na população de Salvador. Dos 511 indivíduos analisados no presente estudo observou-se predominância de alelos normais pertencentes à classe 2 (11 a 26 repetições CGG) em 73,70% dos indivíduos analisados, seguido da classe 3 (27 a 40 repetições CGG) em 25,10% dos indivíduos. Apenas 1,20% foram incluídos na classe 1 (<10 repetições CGG) e nenhum alelo foi encontrado nas classes 4 (41 a 60 repetições CGG), classe 5 (>60 repetições CGG) e classe 6 (>200 repetições CGG) (Gráfico 1).

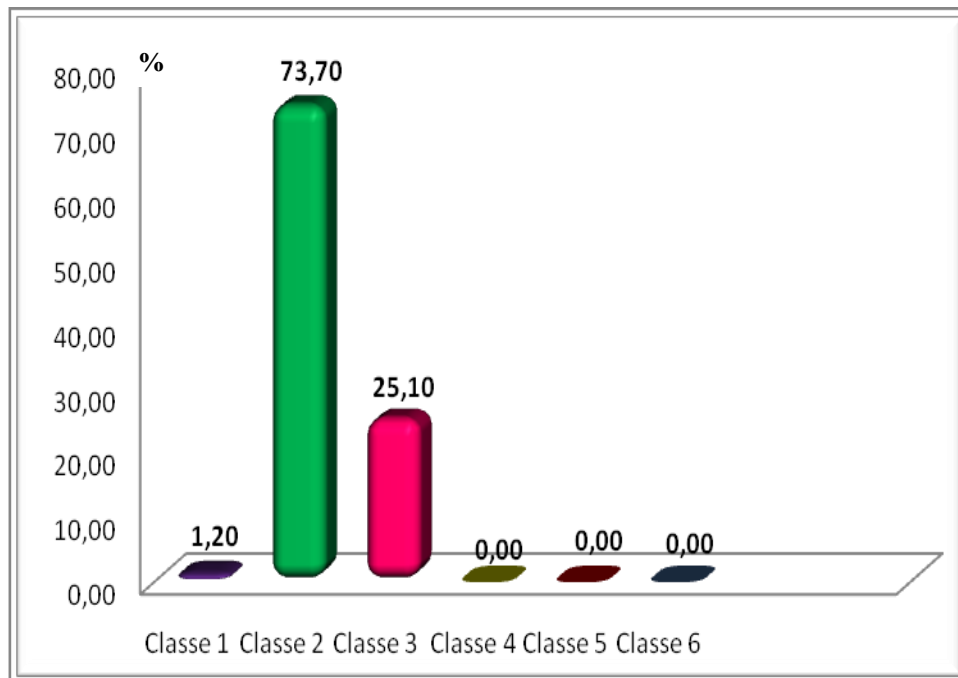


Gráfico 1: Distribuição das frequências das classes. Alelos normais classe de 1 a 3, *gray-zone* classe 4, pré-muados classe 5 e mutados classe 6.

6.0 DISCUSSÃO

Os dados gerados no presente estudo servirão para distinguir as frequências alélicas do gene *FMRI* em relação ao número de repetições CGG na cidade de Salvador-BA, possibilitando avaliar a ocorrência da doença na região.

Nossos resultados podem ser comparados a outro estudo realizado no Brasil, onde Silva e colaboradores (2004) detectaram a frequência alélica de 20 repetições CGG em 442 indivíduos da população pernambucana. Porém, Sucharov e colaboradores (1999) observaram uma moda de 30 repetições CGG em 100 indivíduos do Rio de Janeiro, sendo este o primeiro estudo realizado no Brasil que investigou as repetições CGG no gene *FMRI* na população geral. Queiroz (2006) detectou a frequência bimodal com alelos com 28 e 30 repetições CGG em Santa Catarina. MINGRONI-NETTO e colaboradores (2002) relataram a frequência de 30 repetições CGG na população de São Paulo (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da frequência alélica da distribuição CGG presentes no gene *FMRI* com outras regiões Brasileiras.

Região	Nº repetições CGG	Total	Técnica Laboratorial	Referência
Nordeste	11-26 (73,7%)	511 Homens	PCR	Presente estudo
	20 (90,2%)	386 Homens e Mulheres	PCR e sequenciamento	Silva e colaboradores, 2004
Sudeste	30 (22%)	100 Homens	PCR e sequenciamento	Sucharov e colaboradores, 1999
	30 (27,1%)	59 Homens e Mulheres	PCR e sequenciamento	Mingroni-Netto e colaboradores, 2002
Sul	28 e 30 (60%)	115 Homens e Mulheres	PCR	Queiroz e colaboradores, 2006

As estimativas populacionais relacionadas à frequência alélica do gene *FMRI* têm demonstrado resultados heterogêneos entre as diferentes populações do mundo (Tabela 4). A frequência dos alelos na população caucasiana varia de 28 a 30 repetições CGG (BROWN *et al*, 1993; CHIURAZZI *et al*, 1996; KUNST *et al*, 1996), o que corresponderia no nosso estudo a classe 3. Porém, Mingroni-Netto e colaboradores

(2002) encontraram um segundo pico com 20 repetições CGG na população de São Paulo que possui maior ancestralidade européia.

O alelo que possui aproximadamente 19 ou 20 repetições CGG, é raro entre a população africana ou de ancestralidade africana (CHIURAZZI *et al*, 1996; EICHLER *et al*, 1995; CRAWFORD *et al*, 2000). Segundo, Mingroni-Netto e colaboradores (2002) a alta frequência de alelos com 19 ou 20 repetições CGG poder ser uma peculiaridade da população européia. A população de Salvador possui contribuição ancestral de diferentes populações (africana 49,2%, européia 36,3% e ameríndia 14,5%) (ABE-SANDES *et al*, 2010), essa miscigenação poderia explicar a frequência elevada da classe 2 (11 a 26 repetições CGG) na população de Salvador que difere de relatos encontrados na literatura em estudos realizados em populações de ancestralidade africana.

Tabela 4. Estimativas populacionais relacionadas à frequência alélica do gene *FMRI* em diferentes regiões do mundo (Adaptado de ROSALES-REYNOSO *et al*, 2005).

Repetições CGG	Oriental (China)	Caucasiana (Chipre e Canadá)	Africana (subsaariana)	Brasileira	Chilena	Mexicana	Indonésia
7-28	34 (7,7%)	434 (20,1%)	11 (12,9%)	30 (30,0%)	35 (18,23%)	20 (16,0%)	69 (6,5%)
29	231 (52,0%)	365 (17,6%)	23 (27,0%)	18 (18,0%)	58 (30,20%)	10 (8,0%)	479 (45,2%)
30	71 (15,9%)	745 (35,9%)	23 (27,0%)	22 (22,0%)	80 (41,67%)	29 (23,2%)	292 (27,6%)
31-35	54 (12,2%)	369 (17,8%)	25 (29,5%)	23 (23,0%)	14 (7,29%)	61 (48,8%)	92 (8,6%)
36-57	64 (12,2%)	160 (7,7%)	3 (3,6%)	7 (7,0%)	5 (2,7%)	5 (4,0%)	130 (12,2%)
Total	454	2073	85	100	192	125	1062

A ausência de alelos pré-mutados entre a população estudada de fato pode ser ausente ou pode ser atribuída a técnica empregada. Portanto, para maior definição dos tamanhos dos alelos do gene *FMRI* seria necessário a análise de fragmento, uma vez que a técnica da PCR não determina o número exato das repetições CGG, apenas define a classe alélica. A análise de fragmentos realizada no sequenciador automático apresenta sensibilidade maior na detecção da variação do número de repetições CGG no gene *FMRI*, permitindo observar diferenças entre os alelos em apenas um par de bases, o que não ocorre na eletroforese em gel (FILIPOVIC-SADIC *et al*, 2010). Porém, os

resultados obtidos no presente estudo estão dentro de uma margem segura em que se pode afirmar uma boa estimativa do tamanho dos alelos.

Outro fato que também poderia justificar uma possível ausência de alelos pré-mutados entre a população estudada, é o tamanho amostral. Apesar do número considerável de indivíduos, não foi possível observar a presença de nenhum alelo pré-mutado e estimar a prevalência da SXF por tratar-se de uma amostra de conveniência, que representa uma parte da população de Salvador, Bahia. Para estimar a prevalência em Salvador seriam necessárias 15.166 amostras da população geral, segundo o cálculo amostral realizado no programa estatístico Epi-Info versão 6.04 e no presente estudo foram analisadas 511 amostras. Portanto trata-se de um estudo pioneiro e descritivo que caracteriza uma amostra na população de Salvador e os resultados obtidos inferem apenas para a população estudada.

As repetições CGG, presentes no gene *FMRI*, são regiões que podem dificultar a amplificação de seus alelos, por formar estruturas secundárias, *hairpins*, reconhecidas pela DNA polimerase como sítios de pausa, ocorrendo amplificações incompletas e resultando em bandas múltiplas no produto da PCR (QUEIROZ, 2006). Segundo Filipovic-Sadic e colaboradores (2010) a eficiência da reação de PCR na SXF é inversamente proporcional ao número de repetições CGG. Quanto maior a mutação (expansão do gene) menor a confiabilidade da amplificação pela técnica. No intuito de melhorar a eficácia da técnica na amplificação das regiões ricas em citosina e guanina o presente estudo utilizou 75% de 7-deaza-dGTP e 10% de DMSO, porém outros protocolos utilizam: betaína e polimerases diversas que também garantem o sucesso da amplificação (MCCONLOGUE *et al*, 1988).

A técnica desenvolvida por Haddad e colaboradores (1996) é indicada para análise em amostras do sexo masculino que apresentam apenas um cromossomo X em seu genoma (46, XY), amplificando somente um alelo do gene *FMRI*. Nas amostras do sexo feminino que apresentam dois cromossomos X em seu genoma (46, XX), existe a possibilidade desses alelos do gene *FMRI* serem idênticos (de mesmo tamanho), caracterizando a mulher como homozigota normal. Neste caso não seria possível detectar o número de repetições CGG pela técnica da PCR desenvolvida por Haddad e colaboradores (1996) nos dois alelos e sim apenas em um. A visualização do resultado no gel de poli-acrilamida a 6% indicaria a presença de apenas um dos alelos, pois eles ficariam sobrepostos podendo gerar resultados inconclusivos.

7.0 CONCLUSÃO

Mutações no gene *FMRI* são responsáveis por implicações clínicas que se fazem presentes durante todo o período de vida dos indivíduos: na infância, na vida reprodutiva das mulheres e durante o envelhecimento. Portanto é um tema que interessa, ao indivíduo, a família, a sociedade e a saúde pública.

Este é o primeiro estudo utilizando a técnica da PCR para detecção dos alelos do gene *FMRI* em uma população geral de Salvador-BA, podendo ser utilizada no diagnóstico de triagem na investigação laboratorial da SXF.

A classe mais frequente na população estudada foi a 2 (11 a 26 repetições CGG) e não foram encontrados alelos pré-mutados, podendo ser em virtude do tamanho amostral ou da técnica da PCR empregada segundo Haddad e colaboradores, 1996, não sendo possível avaliar a ocorrência da doença na região.

Estes resultados podem direcionar futuros trabalhos envolvendo o gene *FMRI* tanto para o estado da Bahia, quanto para a região Nordeste e também minimizar deficiências existentes em termos de diagnóstico da SXF na cidade de Salvador-BA.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE-SANDES, K.; BOMFIM, T.F.; MACHADO, T.M.B.; ABE-SANDES, C.; ACOSTA, A.X.; ALVES, C.R.B.; CASTRO FILHO, B.G. Ancestralidade Genômica, nível socioeconômico e vulnerabilidade ao HIV/aids na Bahia, Brasil. *Saúde e Sociedade* (USP. Impresso), 19, 75-84, 2010.

ABRAMS, L. M.S. The ABCs and Xs of FXTAS Genetics. *The National Fragile X Foundation Quarterly*. 26,16, 2007.

ALVES, R.M. Investigação da Síndrome do X-frágil em Indivíduos do Sexo Masculino com Retardo Mental Idiopático. Aspectos Clínicos, Comportamentais e Sociais. 2009. Dissertação de Mestrado- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

ANDRADE, M.R. O Saneamento na Bahia: Situação atual e perspectivas. *Revista Análise & Dados*. 7,5-12, 1997.

ALLIENDE, M.; AVARENA, T.; VALIENTE, A.; CUROTTO, B.; MARIA, L.; CORTÉS, F. Tamizaje clínico y análisis de mutaciones en el gen FMR1 en 99 varones con características clínicas del síndrome de X-frágil. *Rev Chil Pediatr*, 77 (1); 34-42, 2006.

BARRETO, M.L. e colaboradores. Avaliação do Impacto Epidemiológico do Programa de Saneamento Ambiental da Baía de todos os Santos (Bahia Azul). Salvador. UFBA/ISC, 2006.

BONTEKOE CJ, BAKKER CE, NIEUWENHUIZEN IM, VAN DER LINDE H, LANS H, DE LANGE D, HIRST MC, OOSTRA BA. Instability of a (CGG)₉₈ repeat in the Fmr1 promoter. *Hum Mol Genet*. 1;10 (16):1693-9, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Avaliação de impacto na saúde das ações de saneamento: marco conceitual e estratégia metodológica. Organização Pan - Americana da Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 116p, 2004.

BROWN, W. T., G. E. HOUCK, JR., A. JEZIOROWSKA, F. N. LEVINSON, X. DING, C. DOBKIN, N. ZHONG, J. HENDERSON, S. S. BROOKS E E. C. JENKINS. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *Jama*, v.270, n.13, 6, p.1569-75. 1993.

BROWN, W.T. The molecular biology of the fragile x mutation. In HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. (Eds) **Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research**, 3rd. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 110-135, 2002.

BROCK, G.J.R., ANDERON N.H., MONCKTON, D.G. Cis-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Hum Mol Genet.* 8- 1061-1067, 1999.

CARVALHO, M.; **Síndrome do X frágil: guia para famílias e profissionais**. Sociedade Brasileira de Genética, 1^a ed. Ribeirão Preto, 2003.

CHIURAZZI P, GENUARDI M, KOZAK L, GIOVANNUCCI-UZIELLI ML, BUSSANI C, DAGNA-BRICARELLI F, GRASSO M, PERRONI L, SEBASTIO G, SPERANDEO MP, OOSTRA BA, NERI G. Fragile X founder chromosomes in Italy: a few initial events and possible explanation for their heterogeneity. *Am J Med Genet.* 2;64(1):209-15 , 1996.

CRAWFORD, D.C.; ZHANG, F., WILSON, B. STEPHEN, T., WARREN S.T., SHERMAN, S.L. Fragile x CGG repeat structures among African-americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Human Molecular Genetics.* 17- 1759-1769, 2000.

CRAWFORD, D.C.; ACUNA, J.M.; SHERMAN, S.L.; FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med.* v. 3, n.5, Sep-Oct, p.359-371, 2001.

CRAWFORD, D.C.; MEADOWS, K.L.; NEWMAN, J.L., TALF, L.F., SCOTT, E., LESLIE, M., SHUBEK, L., HOLMGREEN, P., YEARGIN-ALLSOPP, M., BOYLE,

C., SHERMAN, S.L. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans: *Am J Med Genet.* 110(3)226-33, 2002.

DARNEL, J.C., JENSEN, K.B., BROWN, V., JIN, P., WARREN, S.T, DARNELL,R.B. Fragile X mental retardation protein mRNA targets harboring intramolecular G-quartets encode proteins related to synaptic function. *Cell.* 107: 489-499, 2001.

DE BOULLE, K.; VERKERK, A.J.; REYNIERS, E.; VITS, L.; HENDRICKX, J.; VAN ROY, B.; VAN DEN BOS, F.; DE GRAAFF, E.; OOSTRA, B.A.; WILLEMS, P. J.; A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* v. 3, n.1, Jan, p.31-35, 1993.

DOBKIN CS, NOLIN SL, COHEN I, SUDHALTER V, BIALER MG, DING XH, JENKINS EC, ZHONG N, BROWN WT. Tissue differences in fragile X mosaics: mosaicism in blood cells may differ greatly from skin. *Am J Med Genet.* 9;64 (2):296-301, 1996.

DOMBROWSKY, C, LEVESQUE, S, MOREL, ML et al. Premutation and intermediate-size FMR1 aleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome aleles. *Hum. Mol. Genet.*, 11: 371-378, 2002.

EICHLER, E.E, RICHARDS, S., GIBBS, R.A., NELSON, D.L. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 1147-1153, 1993.

EICHLER EE, HAMMOND HA, MACPHERSON JN, WARD PA, NELSON DL. Population survey of the human FMR1 CGG repeat substructure suggests biased polarity for the loss of AGG interruptions. *Hum Mol Genet*, 4:2199–2208, 1995.

ELBAZ, A., SUEDOIS, J., DUQUESNOY, M., BELDJORD, C., BERCHEL, C., MERAULT, G. Prevalence of fragile X syndrome and FRAXE among children with

intellectual disability in a Caribbean island, Guadeloupe, French West Indies. *J Intellect Disabil Res.*42: 81–89, 1998.

ESCALANTE, J.A. & FROTA-PESSOA, O. Retardamento Mental. In Beçak, W. e colaboradores (Eds). *Genética Medica*. São Paulo: Sarvier, 300-308, 1973.

ESPADA, J., ESTELLER, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol.* 21(2):238-46, 2010.

FALIK-ZACCAI, T.C., SHACHAK, E., YALON, M., LIS, Z., BOROCHOWITZ, Z., MACPHERSON, J.N., NELSON, D.L., EICHLER, E.E. Predisposition to the fragile X syndrome in Jews of Tunisian descent is due to the absence of AGG interruptions on a rare Mediterranean haplotype. *Am J Hum Genet.*60:103–112, 1997.

FÉLIX T M & PINA-NETO J M. Fragile x syndrome. Clinical and cytogenetic studies. *Arq Neuropsiquiatr* ;56(1):9-17,1998.

FILIPOVIC-SADIC, S., SAH. S., CHEN, L., KROSTING, J., SEKINGER, E., ZHANG, W., HAGERMAN, J.P., STENZEL, T.T., HADD, A.G. LATHAM, G.J., AND TASSONE, F. 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, 2010.

FU, Y. H., D. P. KUHL, A. PIZZUTI, M. PIERETTI, J. S. SUTCLIFFE RICHARDS, A. J. VERKERK, J. J. HOLDEN, R. G. FENWICK, JR., S. T. WARREN e colaboradores. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67, 1047-58. 1991.

GARDNER, RJM & SUTHERLAND, GR. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Third ed. Oxford University Press, Nova Iorque, 218-232, 2004.

GENBANK OVERVIEW Número de acesso L29074. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Consultado em: 7/04/2006.

GOLD, B., D. RADU, A. BALANKO E C. S. CHIANG. Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol. *Mol Diagn*, v.5, n.3, 169-78. 2000.

GRASSO, M., MELIS, M.A., MURGIA, A., NERY, G. POMPONI, M.G. Proposta di linee guida per la diagnosi molecolare della síndrome del X-frágile. *In Società Italiana di genética human*, 2003.

GRAY, S.J.; GERHARDT, J.; DOERFLER, W.; SMALL, L.E.; FANNING, E.; An Origin of DNA Replication in the Promoter Region of the Human Fragile X Mental Retardation (FMR1) Gene. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 27, n. 2, p. 426–437, 2007.

HADDAD L.A, MINGRONI-NETTO R.C, VIANNA-MORGANTE A.M, PENA S.D. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet*, 97(6):808-12,1996.

HOROVITZ, D.D., LLERENA, J.C.JR, DE MATTOS, R.A., Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad. Saúde Pública*. 21:1055-64, 2005.

HADDAD, L.A., AGUIAR, M.J., COSTA, S.S., MINGRONI-NETTO, R.C., VIANNA-MORGANTE, A.M., PENA, S.D. Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet*. 28;84 (3):198-201, 1999.

HAGERMAN, R.J., Physical and behavioral phenotype In, Hagerman, R.J., Cronister, A. (eds). *Fragile X Syndrome, Diagnosis, Treatment and Research*. Johns Hopkins University Press Baltimore/London, 3-87, 1996.

HAGERMAN, RJ, **Fragile X syndrome**. In: HAGERMAN, R.J. Neurodevelopmental disorders: diagnosis and treatment. Oxford University Press, New York, pp 61-132, 1999.

HAGERMAN, R.J. **The physical and behavioral phenotype**. In: HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN,P.J.(Eds.). *Fragile X Syndrome: diagnosis, treatment, and research*. 3rd. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 3-109, 2002.

HAGERMAN, P. J. & HAGERMAN, R. J. The Fragile-X Premutation: A Maturing Perspective. *Am. J. Hum. Genet.*, n.74, p.805–816. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA-**IBGE**. Distribuição da população brasileira por tipo de deficiência. Censo, 2007.

HERMAN, J.G., GRAFF, J.R., MYOHANEN, S., NELKINM, B.D., BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(18):9821-6, 1996.

Investigative Case Based Learning 2004: Emory University. Disponível em http://www.bioquest.org/lifelines/chautauqua_2004/llo1_temp_blue.php?project_id=51
Acessado em: 20/05/2010.

IRWIN, S.A., PATEL, B., IDUPULAPATI, M., HARRIS, J.B., CRISOSTOMO, R.A. e colaboradores. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 98: 161-167, 2001.

JACQUEMONT, S.; HAGERMAN, R.J.; LEEHEY, M.A.; HALL, D.A. e colaboradores. Penetrance of the fragile x-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA.*, 291:460-469, 2004.

JACKY PB, AHUJA YR, ANYANE-YEBOA K, BREG WR, CARPENTER NJ, FROSTER-ISKENIUS UG, FRYNS JP, GLOVER TW, GUSTAVSON KH, HOEGERMAN SF, et al. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. *Am J Med Genet.* 38(2-3):400-3, 1991.

JIN P, WARREN ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 12; 9 (6):901-8, 2000.

JIN, P.; WARREN, S.T.; New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci.* n. 28, p. 152-158, 2003.

KEENAN, E.; KEANE, V.; RAMSEY, L. Fragile X syndrome. *Irish Med J.* n. 86, p. 94-96, 1993.

KUNKEL TA. Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature.* 16; 365(6443):207-8, 1993.

KUNST, C.B., ZERYLNICK, C., KARICKHOFF, L., EICHLER, E., BULLARD, J., CHALIFOUX, M., HOLDEN, J.J., TORRONI, A., NELSON, D.L., WARREN, S.T. FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet.* 58(3):513-22, 1996.

LIMA, A. M. C. **Indicadores Sanitário-Ambientais: Classificação de Bacias de Esgotamento Sanitário e micro-áreas na Cidade de Salvador-Bahia**, 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia-UFBA.

LUBS, H.A.; A marker X chromosome. *Am J Hum Genet.* v. 21, n. 3, 231-244, 1969.

MANDEL JL, BIANCALANA V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res.* 2004.

MADDALENA, A. ; RICHARDS, C.S.; MCGINNISS, M.J.; BROTHMAN, A.; DESNICK, R.J.; GRIER, R.E.; HIRSCH, B.; JACKY, P.; MCDOWELL, GA.; POPOVICH, B.; WATSON, M.; WOLFF, D.J.; Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med.* n. 3, Ed. 3, p. 200-205, 2001.

MARTIN, J.P.; BELL, J.; A pedigree of mental defect showing Sex-linkage. *Journal Neurologyc Psychiatry.* n. 6, p. 151-154, 1943.

MAURER DJ, O'CALLAGHAN BL, LIVINGSTON DM. Orientation dependence of trinucleotide CAG repeat instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 16(12):6617-22, 1996.

MCCONLOGUE L, BROW MA, INNIS MA. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.*, 16 (20):9869, 1988.

MCCONKIE-ROSELL, A.; FINUCANE, B.; CRONISTER, A.; ABRAMS, L.; BENNETT, R.L.; PETTERSEN, B.J.; Genetic counseling for fragile X syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. *Journal of counseling*. n.14, p.249-269, 2005.

MENÉNDEZ, M.P.; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales 2006. Disponível em: www.ege.fcen.uba.ar/citogenetica/descargas/Presentaciones%20Monografias/S%EDndrome%20de%20X%20Fr%E1gil.ppt, Acesso em: 20/09/2007.

MILÁ, M., MALLOLAS, J.; Fragile X syndrome: Premature ovarian failure. Preimplantation and preconception genetic diagnosis. *Rev Neurol.*, n.33 (1), p.21-23, 2001.

MINGRONI-NETO, R.C.; ROSEMBERG, C.; VIANNA-MORGANTE, A.M.; PAVANELLO, R.C.M.; Fragile X frequency in a mentally retarded population in Brazil. *Am.J.Med.Genet.*, n.35, p.22-27, 1990.

MINGRONI-NETTO RC, ANGELI CB, AURICCHIO MT, LEAL-MESQUITA ER, RIBEIRO-DOS-SANTOS AK, FERRARI I, HUTZ MH, SALZANO FM, HILL K, HURTADO AM, VIANNA-MORGANTE AM. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. *Am J Med Genet.* 15; 111 (3):243-52, 2002.

MIRKIN SM. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Curr Opin Struct Biol*; 16(3):351-8, 2006.

MOORE, S.J; STRAIN, L.; COLE, G.F.; MIEDZYPBRODZKA, Z.; KELLY, K.F.; DEAN, J.C.; Fragile X syndrome with FMR1 and FMR2 deletion. *J Med Genet.* n. 36 (7), p. 565-566, 1999.

NASCIMENTO, R.M.P.; VELLOSO, F.J.; CAPELLI, L.P. Queimando a cabeça! Entendendo a síndrome do cromossomo x frágil. *Genética na escola*. 03.03, 37-44 . SBG, 2009.

NOLIN, S. L., W. T. BROWN, A. GLICKSMAN, G. E. HOUCK, JR., A. D. GARGANO, A. SULLIVAN, V. BIANCALANA, K. BRONDUM-NIELSEN, H. HJALGRIM, E. HOLINSKI-FEDER, F. KOOY, J. LONGSHORE, J. MACPHERSON, J. L. MANDEL, G. MATTHIJS, F. ROUSSEAU, P. STEINBACH, M. L. VAISANEN, H. VON KOSKULL E S. L. SHERMAN. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet*, v.72, n.2, 454-64. 2003.

NOVIK, N. L., NIMMIRICH, I., GENC, B., MAIER, S., PIEPENBROCK, C., OLEK, A., E BECK, S. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 4:111-128, 2002.

OBERLÉ, I.; ROSSEAU, F.; HEITZ, D.; KRETZ, C.; DEVYS, D.; HANAUER, A.; BOUE, J.; BERTHEAS, M.F.; MANDEL, J.L.; Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, n.252, p.1097-102, 1991.

OOSTRA, B. A. E WILLEMSSEN, R. Diagnostic tests for fragile X syndrome. *Expert Rev Mol. Diagn*, v.1, n.2, Jul, p.226-32. 2001.

OLIVEIRA, A.B.; GIUNCO, C.T.; CARVALHO, A.B. SALLES, F.; CONTE, A.C.F. Investigação molecular por PCR da Síndrome do Cromossomo X Frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento. *Arq Ciênc Saúde*; 11(1):25-8, 2004.

OMIM (TM). *Online Mendelian Inheritance in man* (TM). Baltimore: Johns Hopkins University – FRAGILE X MENTAL RETARDATION SYNDROME; (SXF). n. #300624. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=300624>. Acesso em: 01/11/2007.

OMIM (TM). *Online Mendelian Inheritance in man* (TM). Baltimore: Johns Hopkins University – FRAGILE X TREMOR/ATAXIA SYNDROME; FXTAS. n. #300623. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=300623>. Acesso em: 01/11/2007.

OMIM (TM). *Online Mendelian Inheritance in man* (TM). Baltimore: Johns Hopkins University – PREMATURE OVARIAN FAILURE 1; POF1. n. #311360. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=311360>. Acesso em: 01/11/2007.

PANDEY UB, PHADKE SR, MITTAL B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. *Neurol India.*; 52 (1):36-42, 2004.

PANASCI, L.C., GREEN, D.C., FOX, P.A., SCHEIN, P.S.; A phenol technique for extraction of alkylated DNA, RNA, and protein from a single tissue sample. *Anal Biochem.* 83(2):677-88 1977.

PEMBREY, M.E.; BARNICOAT, A.J.; CARMICHAEL, B.; BOBROW, M.; TURNER, G.; An assesement of screening strategis for fragile X syndrome in the UK. *Healt Technol Assess*, n.5, p. 1-95, 2001.

PIMENTEL, M.M.G.; Fragile "X" syndrome: molecular diagnosis. *J.Bras.Patol.* n.35, p. 94-98, 1999.

PRIMERANO B, TASSONE F, HAGERMAN RJ, HAGERMAN P, AMALDI F, BAGNI C. Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *RNA.* 12:1482-8, 2002.

POZDNYAKOVA I, REGAN L. New insights into Fragile X syndrome. Relating genotype to phenotype at the molecular level. *FEBS J.* 272(3):872-8, 2005.

QUEIROZ, M. A. Avaliação de Pré-mutação por PCR na Síndrome do X Frágil, 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC.

REYNIERS, E.; VITS, L.; DE BOULLE, K.; VAN ROY, B.; VAN VELZEN, D.; DE GRAAFF, E.; VERKERK, A. J. M. H.; JORENS, H. Z. J.; DARBY, J. K.; OOSTRA, B.; WILLEMS, P. J. : The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nature Genet.* 4:143-148, 1993.

RIFE, M., BADENAS, C., MALLOLAS, J., JIMENEZ, L., CERVERA, R., MAYA, A., GLOVER, G., RIVERA, F., MILA, M. Incidence of fragile X in 5000 consecutive newborn males. *Genet Test.* 4, 339-43, 2003.

ROSALES-REYNOSO, F., MENDOZA-CARRERA, R., TROYO-SANROMÁN, C., MEDINA, BARROS-NÚÑEZ, P. Genetic Diversity at the FMR1 Locus in Mexican Population. *Archives of Medical Research*, 36(4)412 – 417, 2005.

ROUSSEAU, F., D. HEITZ, V. BIANCALANA, S. BLUMENFELD, C. KRETZ, J. BOUE, N. TOMMERUP, C. VAN DER HAGEN, C. DELOZIER-BLANCHET, M. F. Croquette e colaboradores. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med*, v.325, n.24, Dec 12, p.1673-81. 1991.

ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; TARLETON, J.; MACPHRSON, J.; MALMGREN, H, DAHL, N.; BARNICOAT, A. A multicenter study on genotype-phenotype correlation in fragile X syndrome, usind direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. *Am j Hum Genet.* n. 55, p. 225-237, 1994.

ROUSSEAU, F.; ROUILLARD, P.; MOREL, M.L.; KHANDJIAN, E.W.; MORGAN, K.; Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Gene.* n. 57, p. 1006-1018, 1995.

RICHARDS, R.I. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum Mol Genet.* 1;10 (20):2187-94, 2001.

SALUTO, A., A. BRUSSINO, F. TASSONE, C. ARDUINO, C. CAGNOLI, P. PAPPI, P. HAGERMAN, N MIGONE E A. BRUSCO. An enhanced polymerase chain reaction

assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *J Mol Diagn*, 7, 605-12. 2005.

SANGUINETTI, C.J., DIAS, NETO E., SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*.; 17(5):914-21, 1994.

SILVA, R.G., Detecção de expansões CGG na população do estado de Pernambuco e verificação de sua relação com a síndrome do x-frágil. Dissertação de mestrado Universidade de Pernambuco-UFPE, 2004.

STRAND M, PROLLA TA, LISKAY RM, PETES TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 16; 365 (6443):274-6, 1993.

SHERMAN, S. L., P. A. JACOBS, N.E. MORTON, U. FROSTER-ISKENIUS, P. N. HOWARD-PEEBLES, K. B. NIELSEN, M. W. PARTINGTON, G. R. SUTHERLAND, G. TURNER E M. WATSON. Further Segregation Analysis of the Fragile X Syndrome with Special Reference to Transmitting Males. *Hum Genet*, 69, 289-9, 1985.

SHERMAN, S.L.; Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, v.97, n. 3, p.189-194, 2000.

SUTHERLAND, G.R., Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the types of tissue culture medium. *Science*, n. 197, p. 265-266, 1977.

SULLIVAN, A. K., D. C. CRAWFORD, E. H. SCOTT, M. L. LESLIE E S. L. SHERMAN. Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. *Am J Hum Genet*, v.70, n.6,1532-44. 2002.

SUCHAROV CC, SILVA R, RONDINELLI E, MOURA-NETO RS. Fragile X trinucleotide repeats from a normal population in Rio de Janeiro, Brazil. *Hereditas*. 130(2):189-90, 1999.

TASSONE F, PAN R, AMIRI K, TAYLOR AK, HAGERMAN PJ. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn*.10(1):43-9, 2008.

TAKAI, D., JONES, P.A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:3740-5, 2002.

TOLEDANO-ALHADEF, H., L., BASEL-VANAGAITE, N. MAGAL, B. DAVIDOV, S. EHRLICH, V. DRASINOVER, E. TAUB, G. J. HALPERN, N. GINOTT E M. SHOHAT. Fragile-X Carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. *Am J Hum Genet*, v.69, n.2, Aug, p.351-60. 2001.

TURNER, G., WEBB, T., WAKE, S., ROBINSON, H., Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 64: 196-197, 1996.

VAN ESCH, DOM, H.R.; BEX, D.; SALDEN, I.; CAECKEBEKE, J.; WIBAIL, A.; BORGHGRAEF, M.; LEGIUS, E.; FRYNS, J.P.; MATTHIJS, G.; Screening for FMR-1 premutations in 122 older Flemish males presenting with ataxia. *Eur. J. Hum.Genet*. n. 13 (1), p. 121–123, 2005.

VAN ESCH H. The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet.*;49(1):1-8, 2006.

VIANNA-MORGANTE, A.M; COSTA, S.S.; PAVANELO, R.C.M.; OTTO,P.A. & MINGRONI-NETTO, R.C. Premature ovarian failure (POF) in Brazilian fragile x carriers. *Genetics and Molecular Biology*. 22, V4, 471-474, 1999.

VERKERK, A.J.M.H. e colaboradores. Alternative Splicing in the fragile x gene FMR1. *Hum.MolGenet.*, 2: 399-404, 1993.

APÊNDICE

Texto em formato de artigo para posterior submissão.

ESTUDO DOS ALELOS DA REGIÃO 5'UTR NO GENE *FMR1* EM HOMENS DA POPULAÇÃO GERAL DE SALVADOR-BA

Marcela Kelly Astete Gómez¹, Angelina Xavier Acosta²

¹ Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Bahia – Brasil

² Universidade Federal da Bahia (UFBA)- Brasil

RESUMO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a principal causa hereditária de deficiência mental de herança dominante ligada ao cromossomo X. Em 1991, o gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) foi descoberto como responsável pela SXF. De acordo com o número de repetições, os alelos se dividem em: (a) alelo normal compreendendo 6 a 55 repetições (b) pré-mutado: 61 a 200 repetições e (c) mutado: com >200 repetições. Os alelos que apresentam 45 a 60 repetições são considerados como zona intermediária ou *gray-zone*. A base molecular dessa doença é bastante peculiar quando comparada com os padrões típicos observados em outras desordens de etiologia genética. As pré-mutações podem agregar-se de forma silenciosa por muitas gerações de uma família antes de se expandir para a mutação completa, levando aos sinais clínicos da doença. Na Bahia existem poucas pesquisas envolvendo esta doença, conseqüentemente, é desconhecida sua frequência nessa região. Portanto, este trabalho tem como objetivo detectar a frequência das classes alélicas do gene *FMR1* em uma amostra de indivíduos do sexo masculino da população geral de Salvador-BA. Este estudo foi realizado em 511 homens provenientes de outro amplo estudo desenvolvido pelo Instituto de Saúde Coletiva (ISC) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) sendo utilizada a técnica da PCR e posterior classificação dos alelos baseando-se na relação entre o número de repetições CGG e o tamanho do fragmento obtido na PCR. Dos 511 homens analisados no presente estudo observou-se predominância de alelos normais pertencentes à classe 2 (11 a 26 repetições CGG) em 73,70% dos indivíduos analisados, seguido da classe 3 (27 a 40 repetições CGG) em 25,10% dos indivíduos. Apenas 1,20% foram incluídos na classe 1 (<10 repetições CGG) e nenhum alelo foi encontrado nas classes 4 (41 a 60 repetições CGG), classe 5 (>60 repetições CGG) e classe 6 (>200

repetições CGG). Este é o primeiro estudo utilizando a técnica da PCR para detecção dos alelos do gene *FMRI* em uma população geral de Salvador-BA, podendo direcionar futuros trabalhos envolvendo o gene *FMRI* tanto para o estado da Bahia, quanto para a região Nordeste e também minimizar deficiências existentes em termos de diagnóstico da SXF na cidade de Salvador-BA.

Palavras-chave: Síndrome do X-Frágil - Região 5'UTR - FMR1- Deficiência Mental.

INTRODUÇÃO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) (OMIM 300624) é a principal causa hereditária de deficiência mental (DM), possui herança dominante ligada ao cromossomo X, com penetrância incompleta e expressividade variável (OBERLÉ *et al*, 1991; YU *et al*, 1991). O gene *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation 1*) responsável pela SXF, normalmente apresenta em sua região 5' não traduzida (5'UTR) um microssatélite de trinucleotídeos citosina, guanina, guanina (CGG) (VERKERK *et al*, 1993; EICHLER *et al*, 1993). Este microssatélite de trinucleotídeos possui polimorfismo de tamanho na população geral, que varia de 6 a 55 repetições CGG, sendo os alelos mais frequentes com 28, 29 e 30 repetições (BROWN *et al*, 1993; CRAWFORD *et al*, 2001; MADDALENA *et al*, 2001).

A etiologia da SXF está relacionada ao mecanismo de amplificação instável condicionado pelo aumento do número de cópias de trinucleotídeos CGG presente na 5'UTR do gene *FMRI* tendo como consequência a síntese baixa ou nula da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation-Protein*) que está envolvida no desenvolvimento e função normais do cérebro (DARNEL *et al*, 2001; CRAWFORD *et al*, 2001). A alteração no gene *FMRI*, causada pela expansão do número de repetições CGG é caracterizada por três grupos de alelos: (a) *Gray zone* no qual os indivíduos apresentam alelos contendo 45 a 60 repetições, sendo considerada à zona intermediária que pode ser estável em alguns casos, mas que em outros pode se expandir durante a transmissão para as gerações seguintes; (b) Pré-mutado, que abrange o intervalo de 61 a 200 repetições e distingue-se pela instabilidade, onde o indivíduo é caracterizado como portador da SXF; (c) Mutado ou mutação completa compreende alelos que apresentam >200 repetições, e que está associada à SXF (FILIPOVIC-SADIC *et al*, 2010).

A integridade da repetição CGG e sua propensão a se expandir estão associadas as inserções de AGG. Essas trincas interrompem as repetições CGG, cuja presença e localização também influenciam a estabilidade do alelo impedindo erros durante a replicação (YU *et al*, 1991; SULLIVAN *et al*, 2002; NOLIN *et al*, 2003). Aproximadamente 70% das grandes expansões têm somente uma unidade AGG, enquanto os alelos normais, são interrompidos por 1 a 3 unidades AGG (MANDEL & BIANCALANA; 2004; VAN ESCH, 2006). Crawford e colaboradores (2000) demonstraram diferentes variações de alelos susceptíveis a expansão (*gray-zone*), entre caucasianos (41-60 CGG) e africanos-americanos (35-60 CGG) e que apesar da população africano-americana apresentar frequência baixa de alelos *gray-zone*, exibe frequência maior de alelos com repetições CGG “puras” e/ou apenas com uma interrupção AGG.

A SXF transmitidas por mulheres pré-mutadas apresenta risco maior de expansão para a mutação completa (BONTEKOE *et al*, 2001; MCCONKIE-ROSELL *et al*, 2005). Estudos recentes têm relacionado os portadores da pré-mutação a menopausa precoce (POF: *Premature Ovarian Failure*) e Síndrome de Tremor Ataxia (FXTAS-*Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome*) (HAGERMAN *et al*, 2004; JACQUEMONT *et al*, 2004; VAN ESCH *et al*, 2005). Os afetados pela SXF apresentam características clínicas variadas mesmo entre indivíduos da mesma família como face alongada com queixo proeminente, orelhas em abano, macroorquidia, hiperextensibilidade das articulações, prolapso da válvula mitral, hipotonia muscular e estrabismo (HAGERMAN, 2002). Além da DM em graus variáveis, apresentam problemas de atenção associados à hiperatividade, dificuldade de aprendizagem, ocular pobre, ansiedade social e comportamento autista (MCCONKIE-ROSELL *et al*, 2005). Crawford e colaboradores (2002) demonstraram que um quarto a um terço das crianças identificadas com a SXF em escolas públicas não são diagnosticados antes dos 10 anos de idade. As ferramentas moleculares são as mais utilizadas para o diagnóstico da SXF entre elas estão a PCR e *Southern blotting*. Dentre os testes de pesquisa de doenças genéticas, o estudo do gene *FMR1* é um dos mais solicitados (MADDALENA *et al*, 2001).

Aparentemente a SXF incide de forma similar em todos os grupos étnicos, sendo responsável por aproximadamente 14% de todas as DM idiopáticas no sexo masculino e por um terço de todas as DM ligadas ao cromossomo X (TURNER *et al*, 1996). Apresenta prevalência na população geral entre homens de origem caucasiana de

aproximadamente 1 em 4.000 a 6.000 com variação de 1 em 3.717 a 8.918 e entre as mulheres, na população geral, nenhum estudo foi realizado para determinar a prevalência da SXF. Baseada na prevalência da doença nos homens, estima-se que 1 em 8.000 a 9.000 mulheres podem estar afetadas pela SXF (CRAWFORD *et al*, 2001). Apesar da prevalência da SXF apresentar similaridade na maior parte dos grupos, podem ocorrer variações entre as populações. Falik-zaccai e colaboradores (1997) relatam que judeus tunisianos apresentam valores superiores em comparação à população caucasiana. Outras estimativas realizadas em populações africanas sugerem a prevalência de aproximadamente de 1 em 2500 na população geral, maior do que a observada em populações caucasianas (ELBAZ, 1998; CRAWFORD *et al*, 2002).

Os dados epidemiológicos referentes à pré-mutação na população geral incluem estudo realizado em Quebec, Canadá, no qual Rousseau e colaboradores (1995) detectaram em 10.624 amostras do sexo feminino a prevalência de 1 em 259 mulheres com > 54 repetições CGG. Mais tarde, Dombrowski e colaboradores (2002) investigaram a pré-mutação na mesma população canadense em 10.572 amostras do sexo masculino e descreveram a prevalência de 1 em 813 homens. Outro estudo em Israel identificou em 14.334 mulheres, a prevalência de 1 em 69 portadoras com > 50 repetições CGG, sendo que, 1 em 113 mulheres com >54 repetições CGG eram de diferentes etnias judaicas e encontravam-se em fase pré-conceptiva ou gestacional e sem histórico familiar de DM. Esse estudo evidenciou a prevalência alta na população geral e recomenda a triagem de mulheres portadoras de pré-mutação em larga escala na região estudada (TOLEDANO-ALHADEF *et al*, 2001).

Crawford e colaboradores (2001) acreditam que ainda não existe uma estimativa concreta para prevalência da SXF no mundo. A maior parte das pesquisas que caracterizam frequências alélicas do gene *FMRI* é composta por indivíduos do sexo masculino provenientes de escolas especiais com DM idiopática, sendo os resultados extrapolados para a população geral. Outro fator que influencia diretamente os resultados de prevalência é o subdiagnóstico. A grande maioria dos indivíduos pesquisados com a SXF é oriunda de países desenvolvidos, onde o diagnóstico é realizado de rotina, o que difere dos países subdesenvolvidos onde há escassez de centros para o diagnóstico dessa síndrome (GRASSO *et al*, 2003). Dessa forma são necessários estudos adicionais utilizando amostragem maior, visando estabelecer a prevalência da SXF na população geral (Tabela 1) de maneira a esclarecer a presença de

diferenças significativas da sua distribuição entre as populações e gerar dados epidemiológicos mais consistentes. Segundo Tassone e colaboradores (2008) esse fato poderia estar relacionado com a frequência baixa dos alelos com mutação completa e o custo alto para diagnosticar a SXF.

Tabela 1. Principais estudos que utilizaram amostras representativas relacionadas à prevalência da pré-mutação no gene *FMRI*.

País	Referência	N ⁰	Masculino	Feminino
Canadá	Rousseau e colaboradores, 1995	10.624	—	38,6/10.000
Israel	Pesso e colaboradores, 2000	9.459	—	137/10.000
Israel	Toledano-Alhadeif e colaboradores, 2001	14.334	—	88,4/10.000
Canadá	Dombrowski e colaboradores, 2002	10.572	12,3/10.000	—
Espanha	Rife e colaboradores, 2003	5.000	8,1/10.000	—

A Síndrome do X-frágil vem merecendo grande nos últimos anos não apenas devido a prevalência e subdiagnóstico, mas também pelas peculiaridades de sua transmissão, grau elevado de recorrência e por distúrbios a ela associados.

A prevalência da SXF na população geral, todavia não está estimada na Bahia ou mesmo no Brasil. Mingroni-Neto e colaboradores (1990) estimaram a frequência da SXF em 8% dos homens e 4% das mulheres com DM; Oliveira e colaboradores (2004) demonstraram a frequência de 4% em 25 indivíduos do sexo masculino com DM. A maior parte dos trabalhos que caracterizam polimorfismos no gene *FMRI* são provenientes das regiões Sul e Sudeste do país onde os serviços de genética médica, apesar da dificuldade na realização das técnicas moleculares, são bem estruturados (HOROVITZ, LLERENA, DE MATTOS, 2005).

Segundo ABE-SANDES e colaboradores (2010) a população de Salvador é bastante miscigenada apresentando contribuição ancestral de diferentes populações (africana 49,2%, européia 36,3% e ameríndia 14,5%). Os dados gerados no presente estudo servirão para distinguir as frequências alélicas do gene *FMRI* em relação ao número de repetições CGG na população geral de Salvador-BA, podendo contribuir para estimar a prevalência da SXF nesta cidade.

É preciso ressaltar a importância da realização de mais estudos na região nordeste, onde existe carência não apenas de atendimento aos pacientes, mas também de informações sobre essa doença. Diversas formas de alteração no gene *FMRI* podem estar presentes em uma mesma família tornando a SXF forte candidata a estudos e rastreamento na população em geral (CRAWFORD *et al*, 2001).

Considerando a falta de um estudo prévio na população geral de Salvador-BA, justifica-se o estudo molecular no gene *FMRI*, visando para caracterizar a distribuição dos seus alelos nesses indivíduos. Uma vez definidas essas frequências, torna-se possível avaliar a situação de cada grupo em relação ao risco populacional para ocorrência da doença, auxiliando a instalação de políticas de saúde específicas.

Portanto o objetivo deste estudo é estabelecer a frequência das classes alélicas do gene *FMRI* em indivíduos do sexo masculino da população geral da cidade de Salvador-BA.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/FIOCRUZ-BA) sob parecer nº 96/2006.

- Amostras

Foram utilizadas amostras de DNA foram provenientes de outro estudo desenvolvido pelo Instituto de Saúde Coletiva (ISC) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), que avaliou as condições sanitárias sobre a saúde da população de Salvador, visando a implantação de um projeto extenso centrado em esgotamento sanitário, ampliação da rede de abastecimento de água e melhoria do sistema de coleta de lixo denominado de Programa Bahia Azul (ANDRADE, 1997).

A cidade de Salvador, capital do estado da Bahia, possui uma área de 706,799km² sendo composta por uma população miscigenada (ABE-SANDES e colaboradores, 2010) com 2.892.625 habitantes (censo demográfico brasileiro, IBGE 2007 - <http://www.ibge.gov.br>). Em virtude da extensão geográfica e da densidade populacional da cidade, foi utilizado um conjunto de 30 áreas intra-urbanas (Figura 9) denominadas áreas sentinelas (BARRETO e colaboradores, 2006).

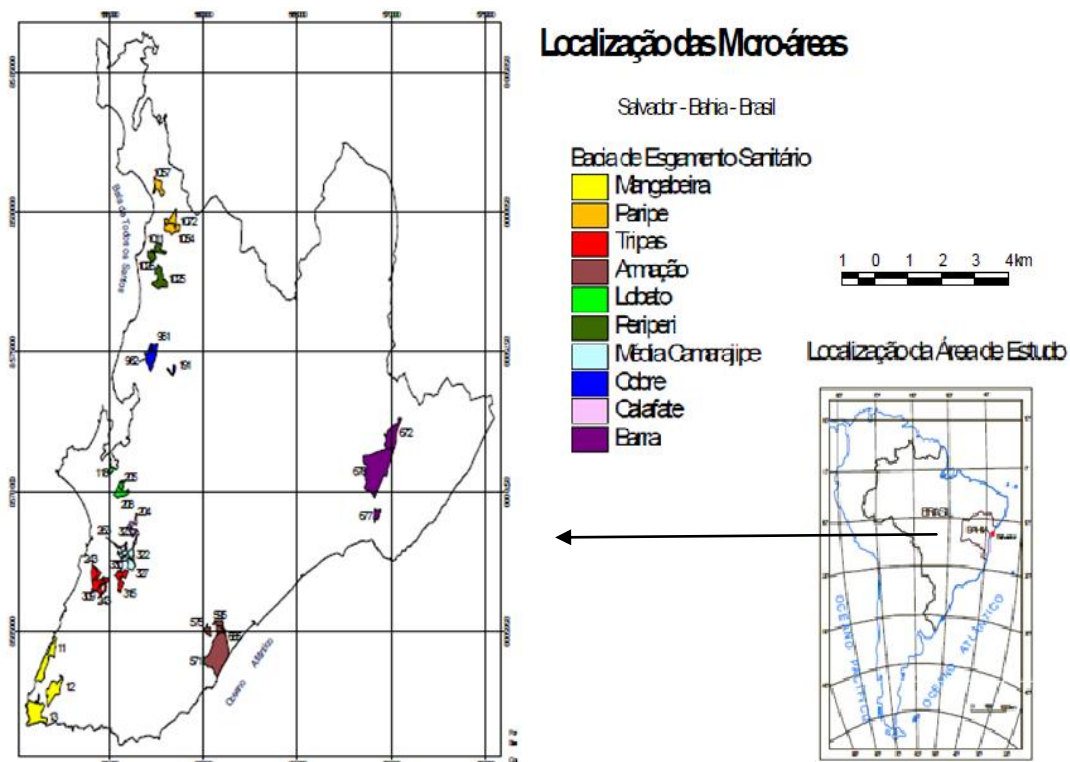


Figura 9. Mapa da cidade de Salvador, demonstrando a as bacias onde foram coletadas amostras para o projeto Bahia Azul.

LIMA, 2009.

As micro-áreas que participaram do estudo foram acompanhadas durante toda a implantação do Programa Bahia Azul, possibilitando comparar episódios diarréicos, prevalência de helmintoses, estado nutricional de crianças e prevalência de marcadores sorológicos para agentes infecciosos antes e após o programa (BRASIL, 2004). Esse estudo apresenta o total de 1515 amostras, sendo 878 do sexo feminino e 637 do sexo masculino com idade entre 8 a 74 anos, tendo como fiel depositário o Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) do CPqGM/FIOCRUZ-BA.

Entre as 637 amostras do sexo masculino do projeto Bahia Azul foram genotipadas 511 amostras para o presente estudo sendo que, as demais não foram genotipadas ou por falta de material (DNA) ou dificuldade da técnica.

- Análise Laboratorial

O DNAg de todas as amostras foi extraído pela técnica fenol-clorofórmio (PANASCI *et al.*, 1977) e armazenadas à temperatura de -20°C no LASP/ CPqGM /FIOCRUZ-BA. Os alelos da região 5'UTR do gene FMR1 foram diferenciados de acordo com a técnica da PCR, segundo Haddad e colaboradores (1996). Os fragmentos gerados foram analisados em gel de poliacrilamida a 6% não desnaturante. Em seguida

os fragmentos foram visualizados pela coloração com nitrato de prata segundo, Sanguinetti e colaboradores (1994).

O protocolo proposto por Haddad e colaboradores (1996) é utilizado para a amplificação da região 5'UTR do gene *FMRI*, porém não permite determinar exatamente o número de repetições CGG. No entanto, é possível estabelecer categorias alélicas de acordo com o tamanho do fragmento obtido na reação da PCR, tendo como referência um marcador de pares de bases (Quadro 2). Essa categorização em classes já foi utilizada anteriormente por Haddad e colaboradores (1999) para relacionar alelos normais, *gray zone* e pré-mutados.

Quadro 2. Relação entre as classes, o número de repetições CGG e o tamanho do produto da PCR do gene *FMRI*.

Alelo	Classes	N ^o repetições CGG	Produto da PCR
Normal	1	< 10 CGG	<500 pb
	2	11 a 26 CGG	503 a 548 pb
	3	27 a 40 CGG	551 a 590 pb
<i>Gray-zone</i>	4	41 a 60 CGG	593 a 650 pb
Pré-mutado	5	>60CGG	>650pb
Mutado	6	>200CGG	Ausência de amplificação

As classes alélicas foram determinadas baseando-se na relação entre o número de repetições CGG e o tamanho do fragmento obtido na PCR. De acordo com a sequência referência, extraída do *GenBank* (L29074) foi possível identificar os pontos de pareamento dos *primers*, as sequências intercalantes e a região de inserção das repetições CGG (Figura 12).

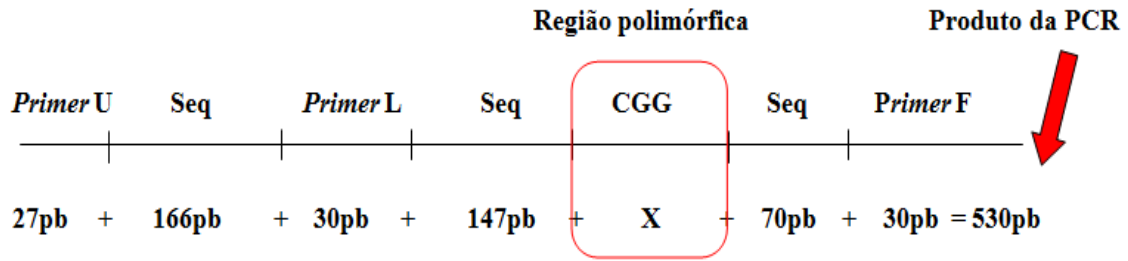


Figura 12. Esquema demonstrando a relação entre o tamanho do fragmento (pb) e o número de repetições CGG no gene *FMRI*. O alelo acima apresenta 20 repetições CGG.

Desta forma, hipoteticamente, um indivíduo com apenas uma repetição CGG na região polimórfica flanqueada pelos *primers* U e F terá um fragmento com tamanho de 473pb (Classe 1/<500pb). Em contrapartida, os alelos com 11 repetições CGG terão inseridos 33 nucleotídeos na região polimórfica, aumentando o fragmento amplificado de 473pb (1 repetição CGG) para 503 nucleotídeos (Classe 2/503pb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo determinando a frequência dos alelos do gene *FMRI* na população de Salvador. Dos 511 indivíduos analisados no presente estudo observou-se predominância de alelos normais pertencentes à classe 2 (11 a 26 repetições CGG) em 73,70% dos indivíduos analisados, seguido da classe 3 (27 a 40 repetições CGG) em 25,10% dos indivíduos. Apenas 1,20% foram incluídos na classe 1 (<10 repetições CGG) e nenhum alelo foi encontrado nas classes 4 (41 a 60 repetições CGG), classe 5 (>60 repetições CGG) e classe 6 (>200 repetições CGG) (Gráfico 1).

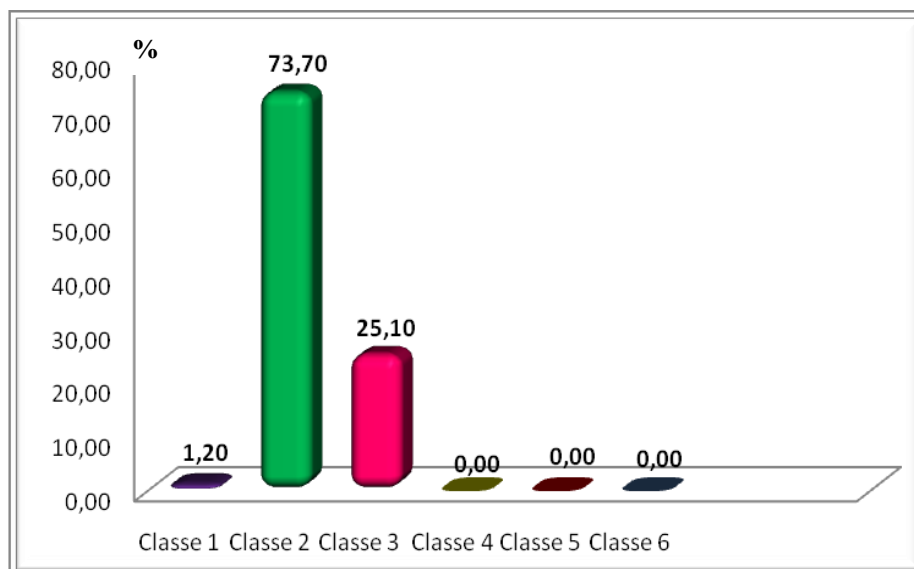


Gráfico 1: Distribuição das frequências das classes. Alelos normais classe de 1 a 3, *gray-zone* classe 4, pré-muados classe 5 e mutados classe 6.

Nossos resultados podem ser comparados a outro estudo realizado no Brasil, onde Silva e colaboradores (2004) detectaram a frequência alélica de 20 repetições CGG em 442 indivíduos da população pernambucana. Porém, Sucharov e colaboradores (1999) observaram uma moda de 30 repetições CGG em 100 indivíduos do Rio de Janeiro, sendo este o primeiro estudo realizado no Brasil que investigou as repetições CGG no gene *FMRI* na população geral. Queiroz (2006) detectou a frequência bimodal com alelos com 28 e 30 repetições CGG em Santa Catarina. MINGRONI-NETTO e colaboradores (2002) relataram a frequência de 30 repetições CGG na população de São Paulo (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da frequência alélica da distribuição CGG presentes no gene *FMRI* com outras regiões Brasileiras.

Região	Nº repetições CGG	Total	Técnica Laboratorial	Referência
Nordeste	11-26 (73,7%)	511 Homens	PCR	Presente estudo
	20 (90,2%)	386 Homens e Mulheres	PCR e sequenciamento	Silva e colaboradores, 2004
Sudeste	30 (22%)	100 Homens	PCR e sequenciamento	Sucharov e colaboradores, 1999
	30 (27,1%)	59 Homens e Mulheres	PCR e sequenciamento	Mingroni-Netto e colaboradores, 2002
Sul	28 e 30 (60%)	115 Homens e Mulheres	PCR	Queiroz e colaboradores, 2006

As estimativas populacionais relacionadas à frequência alélica do gene *FMRI* têm demonstrado resultados heterogêneos entre as diferentes populações do mundo (Tabela 4). A frequência dos alelos na população caucasiana varia de 28 a 30 repetições CGG (BROWN *et al*, 1993; CHIURAZZI *et al*, 1996; KUNST *et al*, 1996), o que corresponderia no nosso estudo a classe 3. Porém, Mingroni-Netto e colaboradores (2002) encontraram um segundo pico com 20 repetições CGG na população de São Paulo que possui maior ancestralidade européia.

O alelo que possui aproximadamente 19 ou 20 repetições CGG, é raro entre a população africana ou de ancestralidade africana (CHIURAZZI *et al*, 1996; EICHLER *et al*, 1995; CRAWFORD *et al*, 2000). Segundo, Mingroni-Netto e colaboradores (2002) a alta frequência de alelos com 19 ou 20 repetições CGG poder ser uma

peculiaridade da população européia. A população de Salvador possui contribuição ancestral de diferentes populações (africana 49,2%, européia 36,3% e ameríndia 14,5%) (ABE-SANDES *et al*, 2010), essa miscigenação poderia explicar a frequência elevada da classe 2 (11 a 26 repetições CGG) na população de Salvador que difere de relatos encontrados na literatura em estudos realizados em populações de ancestralidade africana.

Tabela 4. Estimativas populacionais relacionadas à frequência alélica do gene *FMRI* em diferentes regiões do mundo (Adaptado de ROSALES-REYNOSO *et al*, 2005).

Repetições CGG	Oriental (China)	Caucasiana (Chipre e Canadá)	Africana (subsaariana)	Brasileira	Chilena	Mexicana	Indonésia
7-28	34 (7,7%)	434 (20,1%)	11 (12,9%)	30 (30,0%)	35 (18,23%)	20 (16,0%)	69 (6,5%)
29	231 (52,0%)	365 (17,6%)	23 (27,0%)	18 (18,0%)	58 (30,20%)	10 (8,0%)	479 (45,2%)
30	71 (15,9%)	745 (35,9%)	23 (27,0%)	22 (22,0%)	80 (41,67%)	29 (23,2%)	292 (27,6%)
31-35	54 (12,2%)	369 (17,8%)	25 (29,5%)	23 (23,0%)	14 (7,29%)	61 (48,8%)	92 (8,6%)
36-57	64 (12,2%)	160 (7,7%)	3 (3,6%)	7 (7,0%)	5 (2,7%)	5 (4,0%)	130 (12,2%)
Total	454	2073	85	100	192	125	1062

A ausência de alelos pré-mutados entre a população estudada de fato pode ser ausente ou pode ser atribuída a técnica empregada. Portanto, para maior definição dos tamanhos dos alelos do gene *FMRI* seria necessário a análise de fragmento, uma vez que a técnica da PCR não determina o número exato das repetições CGG, apenas define a classe alélica. A análise de fragmentos realizada no sequenciador automático apresenta sensibilidade maior na detecção da variação do número de repetições CGG no gene *FMRI*, permitindo observar diferenças entre os alelos em apenas um par de bases, o que não ocorre na eletroforese em gel (FILIPOVIC-SADIC *et al*, 2010). Porém, os resultados obtidos no presente estudo estão dentro de uma margem segura em que se pode afirmar uma boa estimativa do tamanho dos alelos.

Outro fato que também poderia justificar uma possível ausência de alelos pré-mutados entre a população estudada, é o tamanho amostral. Apesar do número considerável de indivíduos, não foi possível observar a presença de nenhum alelo pré-mutado e estimar a prevalência da SXF por tratar-se de uma amostra de conveniência, que representa uma parte da população de Salvador, Bahia. Para estimar a prevalência em Salvador seriam necessárias 15.166 amostras da população geral, segundo o cálculo

amostral realizado no programa estatístico Epi-Info versão 6.04 e no presente estudo foram analisadas 511 amostras. Portanto trata-se de um estudo pioneiro e descritivo que caracteriza uma amostra na população de Salvador e os resultados obtidos inferem apenas para a população estudada.

As repetições CGG, presentes no gene *FMRI*, são regiões que podem dificultar a amplificação de seus alelos, por formar estruturas secundárias, *hairpins*, reconhecidas pela DNA polimerase como sítios de pausa, ocorrendo amplificações incompletas e resultando em bandas múltiplas no produto da PCR (QUEIROZ, 2006). Segundo Filipovic-Sadic e colaboradores (2010) a eficiência da reação de PCR na SXF é inversamente proporcional ao número de repetições CGG. Quanto maior a mutação (expansão do gene) menor a confiabilidade da amplificação pela técnica. No intuito de melhorar a eficácia da técnica na amplificação das regiões ricas em citosina e guanina o presente estudo utilizou 75% de 7-deaza-dGTP e 10% de DMSO, porém outros protocolos utilizam: betaína e polimerases diversas que também garantem o sucesso da amplificação (MCCONLOGUE *et al*, 1988).

A técnica desenvolvida por Haddad e colaboradores (1996) é indicada para análise em amostras do sexo masculino que apresentam apenas um cromossomo X em seu genoma (46, XY), amplificando somente um alelo do gene *FMRI*. Nas amostras do sexo feminino que apresentam dois cromossomos X em seu genoma (46, XX), existe a possibilidade desses alelos do gene *FMRI* serem idênticos (de mesmo tamanho), caracterizando a mulher como homozigota normal. Neste caso não seria possível detectar o número de repetições CGG pela técnica da PCR desenvolvida por Haddad e colaboradores (1996) nos dois alelos e sim apenas em um. A visualização do resultado no gel de poliacrilamida a 6% indicaria a presença de apenas um dos alelos, pois eles ficariam sobrepostos podendo gerar resultados inconclusivos.

CONCLUSÃO

Mutações no gene *FMRI* são responsáveis por implicações clínicas que se fazem presentes durante todo o período de vida dos indivíduos: na infância, na vida reprodutiva das mulheres e durante o envelhecimento. Portanto é um tema que interessa, ao indivíduo, a família, a sociedade e a saúde pública.

Este é o primeiro estudo utilizando a técnica da PCR para detecção dos alelos do gene *FMRI* em uma população geral de Salvador-BA, podendo ser utilizada no diagnóstico de triagem na investigação laboratorial da SXF.

A classe mais frequente na população estudada foi a 2 (11 a 26 repetições CGG) e não foram encontrados alelos pré-mutados, podendo ser em virtude do tamanho amostral ou da técnica da PCR empregada segundo Haddad e colaboradores, 1996, não sendo possível avaliar a ocorrência da doença na região.

Estes resultados podem direcionar futuros trabalhos envolvendo o gene *FMR1* tanto para o estado da Bahia, quanto para a região Nordeste e também minimizar deficiências existentes em termos de diagnóstico da SXF na cidade de Salvador-BA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE-SANDES, K.; BOMFIM, T.F.; MACHADO, T.M.B.; ABE-SANDES, C.; ACOSTA, A.X.; ALVES, C.R.B.; CASTRO FILHO, B.G. Ancestralidade Genômica, nível socioeconômico e vulnerabilidade ao HIV/aids na Bahia, Brasil. *Saúde e Sociedade* (USP. Impresso), 19, 75-84, 2010.

ALVES, R.M. Investigação da Síndrome do X-frágil em Indivíduos do Sexo Masculino com Retardo Mental Idiopático. Aspectos Clínicos, Comportamentais e Sociais. 2009. Dissertação de Mestrado- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

ANDRADE, M.R. O Saneamento na Bahia: Situação atual e perspectivas. *Revista Análise & Dados*. 7,5-12, 1997.

ALLIENDE, M.; AVARENA, T.; VALIENTE, A.; CUROTTO, B.; MARIA, L.; CORTÉS, F. Tamizaje clínico y análisis de mutaciones en el gen *FMR1* en 99 varones con características clínicas del síndrome de X-frágil. *Rev Chil Pediatr*, 77 (1); 34-42, 2006.

BROWN, W. T., G. E. HOUCK, JR., A. JEZIOROWSKA, F. N. LEVINSON, X. DING, C. DOBKIN, N. ZHONG, J. HENDERSON, S. S. BROOKS E E. C. JENKINS. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *Jama*, v.270, n.13, 6, p.1569-75. 1993.

CHIURAZZI P, GENUARDI M, KOZAK L, GIOVANNUCCI-UZIELLI ML, BUSSANI C, DAGNA-BRICARELLI F, GRASSO M, PERRONI L, SEBASTIO G, SPERANDEO MP, OOSTRA BA, NERI G. Fragile X founder chromosomes in Italy: a

few initial events and possible explanation for their heterogeneity. *Am J Med Genet.* 2;64(1):209-15 , 1996.

CRAWFORD, D.C.; ZHANG, F., WILSON, B. STEPHEN, T., WARREN S.T., SHERMAN, S.L. Fragile x CGG repeat structures among African-americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Human Molecular Genetics.* 17- 1759-1769, 2000.

CRAWFORD, D.C.; ACUNA, J.M.; SHERMAN, S.L.; FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med.* v. 3, n.5, Sep-Oct, p.359-371, 2001.

CRAWFORD, D.C.; MEADOWS, K.L.; NEWMAN, J.L., TALF, L.F., SCOTT, E., LESLIE, M., SHUBEK, L., HOLMGREEN, P., YEARGIN-ALLSOPP, M., BOYLE, C., SHERMAN, S.L. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans: *Am J Med Genet.* 110(3)226-33, 2002.

DARNEL, J.C., JENSEN, K.B., BROWN, V., JIN, P., WARREN, S.T, DARNELL,R.B. Fragile X mental retardation protein mRNA targets harboring intramolecular G-quartets encode proteins related to synaptic function. *Cell.* 107: 489-499, 2001.

DOMBROWSKY, C, LEVESQUE, S, MOREL, ML et al. Premutation and intermediate-size FMR1 aleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome aleles. *Hum. Mol. Genet.*, 11: 371-378, 2002.

EICHLER, E.E, RICHARDS, S., GIBBS, R.A., NELSON, D.L. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 1147-1153, 1993.

EICHLER EE, HAMMOND HA, MACPHERSON JN, WARD PA, NELSON DL. Population survey of the human FMR1 CGG repeat substructure suggests biased polarity for the loss of AGG interruptions. *Hum Mol Genet*, 4:2199–2208, 1995.

ELBAZ, A., SUEDOIS, J., DUQUESNOY, M., BELDJORD, C., BERCHEL, C., MERAULT, G. Prevalence of fragile X syndrome and FRAXE among children with intellectual disability in a Caribbean island, Guadeloupe, French West Indies. *J Intellect Disabil Res.*42: 81–89, 1998.

FALIK-ZACCAI, T.C., SHACHAK, E., YALON, M., LIS, Z., BOROCHOWITZ, Z., MACPHERSON, J.N., NELSON, D.L., EICHLER, E.E. Predisposition to the fragile X syndrome in Jews of Tunisian descent is due to the absence of AGG interruptions on a rare Mediterranean haplotype. *Am J Hum Genet.* 60:103–112, 1997.

FILIPOVIC-SADIC, S., SAH. S., CHEN, L., KROSTING, J., SEKINGER, E., ZHANG, W., HAGERMAN, J.P., STENZEL, T.T., HADD, A.G. LATHAM, G.J., AND TASSONE, F. 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, 2010.

GENBANK OVERVIEW Número de acesso L29074. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Consultado em: 7/04/2006.

GRASSO, M., MELIS, M.A., MURGIA, A., NERY, G. POMPONI, M.G. Proposta di linee guida per la diagnosi molecolare della síndrome del X-frágile. *In Società Italiana di genética human*, 2003.

HADDAD L.A, MINGRONI-NETTO R.C, VIANNA-MORGANTE A.M, PENA S.D. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet*, 97(6):808-12,1996.

HOROVITZ, D.D., LLERENA, J.C.JR, DE MATTOS, R.A., Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad. Saúde Pública.* 21:1055-64, 2005.

HADDAD, L.A., AGUIAR, M.J., COSTA, S.S., MINGRONI-NETTO, R.C., VIANNA-MORGANTE, A.M., PENA, S.D. Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet.* 28;84 (3):198-201, 1999.

HAGERMAN,R.J. **The physical and behavioral phenotype.** In: HAGERMAN,R.J.; HAGERMAN,P.J.(Eds.). *Fragile X Syndrome: diagnosis, treatment, and research.* 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 3-109, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA-**IBGE.** Distribuição da população brasileira por tipo de deficiência. Censo, 2007.

IRWIN, S.A., PATEL, B., IDUPULAPATI, M., HARRIS, J.B., CRISOSTOMO, R.A. e colaboradores. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 98: 161-167, 2001.

JACQUEMONT, S.; HAGERMAN, R.J.; LEEHEY, M.A.; HALL, D.A. e colaboradores. Penetrance of the fragile x-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA.*, 291:460-469, 2004.

KUNST CB, ZERYLNICK C, KARICKHOFF L, EICHLER E, BULLARD J, CHALIFOUX M, HOLDEN JJ, TORRONI A, NELSON DL, WARREN ST. FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet.* 58(3):513-22, 1996.

MANDEL JL, BIANCALANA V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res.* 2004.

MADDALENA, A. ; RICHARDS, C.S.; MCGINNISS, M.J.; BROTHMAN, A.; DESNICK, R.J.; GRIER, R.E.; HIRSCH, B.; JACKY, P.; MCDOWELL, GA.; POPOVICH, B.; WATSON, M.; WOLFF, D.J.; Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med.* n. 3, Ed. 3, p. 200-205, 2001.

MCCONLOGUE L, BROW MA, INNIS MA. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.*, 16 (20):9869, 1988.

MILÁ, M., MALLOLAS, J.; Fragile X syndrome: Premature ovarian failure. Preimplantation and preconception genetic diagnosis. *Rev Neurol.*, n.33 (1), p.21-23, 2001.

MINGRONI-NETO, R.C.; ROSEMBERG, C.; VIANNA-MORGANTE, A.M.; PAVANELLO, R.C.M.; Fragile X frequency in a mentally retarded population in Brazil. *Am.J.Med.Genet.*, n.35, p.22-27, 1990.

MINGRONI-NETTO, R., ANGELI, C., AURICCHIO, M., LEAL-MESQUITA, E., RIBEIRODOS- SANTOS, A., FERRARI, I., HUTZ, M., SALZANO, F., HILL, K., HURTADO, M., VIANNA-MORGANTE, A. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. *Am J Med Genet.* 111:243–252, 2002.

OBERLÉ, I.; ROSSEAU, F.; HEITZ, D.; KRETZ, C.; DEVYS, D.; HANAUER, A.; BOUE, J.; BERTHEAS, M.F.; MANDEL, J.L.; Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, n.252, p.1097-102, 1991.

OLIVEIRA, A.B.; GIUNCO, C.T.; CARVALHO, A.B. SALLES, F.; CONTE, A.C.F. Investigação molecular por PCR da Síndrome do Cromossomo X Frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento. *Arq Ciênc Saúde*; 11(1):25-8, 2004.

OMIM (TM). *Online Mendelian Inheritance in man* (TM). Baltimore: Johns Hopkins University – FRAGILE X MENTAL RETARDATION SYNDROME; (SXF). n. #300624. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=300624>. Acesso em: 01/11/2007.

PANDEY UB, PHADKE SR, MITTAL B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. *Neurol India.*; 52 (1):36-42, 2004.

PANASCI, L.C., GREEN, D.C., FOX, P.A., SCHEIN, P.S.; A phenol technique for extraction of alkylated DNA, RNA, and protein from a single tissue sample. *Anal Biochem.* 83(2):677-88 1977.

PIMENTEL, M.M.G.; Fragile "X" syndrome: molecular diagnosis. *J.Bras.Patol.* n.35, p. 94-98, 1999.

QUEIROZ, M. A. Avaliação de Pré-mutação por PCR na Síndrome do X Frágil, 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC.

ROSALES-REYNOSO, F., MENDOZA-CARRERA, R., TROYO-SANROMÁN, C., MEDINA, BARROS-NÚÑEZ, P. Genetic Diversity at the FMR1 Locus in Mexican Population. *Archives of Medical Research*, 36(4)412 – 417, 2005.

ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; TARLETON, J.; MACPHRSON, J.; MALMGREN, H, DAHL, N.; BARNICOAT, A. A multicenter study on genotype-phenotype correlation in fragile X syndrome, usind direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. *Am j Hum Genet.* n. 55, p. 225-237, 1994.

ROUSSEAU, F.; ROUILLARD, P.; MOREL, M.L.; KHANDJIAN, E.W.; MORGAN, K.; Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Gene.* n. 57, p. 1006-1018, 1995.

SANGUINETTI, C.J., DIAS, NETO E., SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.*; 17(5):914-21, 1994.

SILVA, R.G., Detecção de expansões CGG na população do estado de Pernambuco e verificação de sua relação com a síndrome do x-frágil. Dissertação de mestrado Universidade de Pernambuco-UFPE, 2004.

SHERMAN, S.L.; Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, v.97, n. 3, p.189-194, 2000.

SUCHAROV CC, SILVA R, RONDINELLI E, MOURA-NETO RS. Fragile X trinucleotide repeats from a normal population in Rio de Janeiro, Brazil. *Hereditas*. 130(2):189-90, 1999.

TASSONE F, PAN R, AMIRI K, TAYLOR AK, HAGERMAN PJ. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn*.10(1):43-9, 2008.

TOLEDANO-ALHADEF, H., L., BASEL-VANAGAITE, N. MAGAL, B. DAVIDOV, S. EHRLICH, V. DRASINOVER, E. TAUB, G. J. HALPERN, N. GINOTT E M. SHOHAT. Fragile-X Carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. *Am J Hum Genet*, v.69, n.2, Aug, p.351-60. 2001.

TURNER, G., WEBB, T., WAKE, S., ROBINSON, H., Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 64: 196-197, 1996.

VIANNA-MORGANTE, A.M; COSTA, S.S.; PAVANELO, R.C.M.; OTTO,P.A. & MINGRONI-NETTO, R.C. Premature ovarian failure (POF) in Brazilian fragile x carriers. *Genetics and Molecular Biology*. 22, V4, 471-474, 1999.

VERKERK, A.J.M.H. e colaboradores. Alternative Splicing in the fragile x gene FMR1. *Hum.MolGenet.*, 2: 399-404, 1993.

VERHEIJ C, DE GRAAFF E, BAKKER CE, WILLEMSSEN R, WILLEMS PJ, MEIJER N, GALJAARD H, REUSER AJ, OOSTRA BA, HOOGEVEEN AT. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet*. 4(5):895-901, 1995.

YU, S.; PRITCHARD, E.; KREMER, E.; LYNCH, M.; NANCARROW, J.; BAKER, E.; Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*, n.252, 1179-1181, 1991.

VERHEIJ C, DE GRAAFF E, BAKKER CE, WILLEMSSEN R, WILLEMS PJ, MEIJER N, GALJAARD H, REUSER AJ, OOSTRA BA, HOOGEVEEN AT. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet.* 4(5):895-901, 1995.

WÖHRLE, D., HIRST, M.C., KENNERKNECHT, I., DAVIES, K.E., STEINBACH, P. Genotype mosaicism in fragile X fetal tissues. *Hum Genet.*; 89(1):114-6, 1992.

YU, S.; PRITCHARD, E.; KREMER, E.; LYNCH, M.; NANCARROW, J.; BAKER, E.; Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*, n.252, 1179-1181, 1991.

ZEESMAN, S.; ZWAIGENBAUM, L.; WHELAN, D.T.; HAGERMAN, R.J.; TASSONE, F.; TAYLOR, S.A.; Paternal transmission of fragile X syndrome. *Am J Med Genet A*, v. 129, n.2, Aug 30, 184-189, 2004.

ZHOU Y., H. Y. LAW, C.D. BOEHM, C. S. YOON, G. R. CUTTING, I. S. NG E S. S. CHONG. Robust fragile X (CGG)_n genotype classification using a methylation specific triple. PCR assay. *J Med Genet*, 41, 45. 20, 2004.