

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

MIRELE RAÍSSA SILVA SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO GENE *FMRI* ASSOCIADO
À SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ/AL

MACEIÓ- AL

2022

MIRELE RAÍSSA SILVA SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO GENE *FMRI* ASSOCIADO
À SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ/AL

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao corpo docente do
Instituto de Ciências Biológicas e
da Saúde como requisito parcial
para a obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Thalita
Cristina Figueiredo Cunha.

MACEIÓ- AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237p Santos, Mirele Raíssa Silva.
Padronização da investigação molecular do gene FMR1 associado à síndrome do X-frágil em hospital universitário de Maceió/AL / Mirele Raíssa Silva Santos. – Maceió, 2022.
41 f. : il.

Orientadora: Thalita Cristina Figueiredo Cunha.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 38-41.

1. Síndrome do cromossomo X frágil. 2. Deficiência intelectual. 3. Patologia molecular. I. Título.

CDU: 575.113:616.899

FOLHA DE APROVAÇÃO

MIRELE RAÍSSA SILVA SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO GENE *FMRI* ASSOCIADO À SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ/AL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao corpo docente do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Thalita Cristina Figueiredo Cunha.



Documento assinado digitalmente
THALITA CRISTINA FIGUEIREDO CUNHA
Data: 20/12/2022 17:34:19-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientadora: Prof^a Dr^a Thalita Cristina Figueiredo Cunha (FAMED-UFAL)



Documento assinado digitalmente
DEBORA DE PAULA MICHELATTO
Data: 20/12/2022 13:20:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinadora: Prof^a Dr^a Débora de Paula Michelatto (FAMED-UFAL)



Documento assinado digitalmente
DALMO ALMEIDA DE AZEVEDO
Data: 20/12/2022 12:50:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador: Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo (ICBS-UFAL)

Aos meus pais, Maria Helena e Marcos Antônio,
por sempre apoiarem meu foco nos estudos, desde
a infância; e por proverem uma vida boa e feliz
para mim e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, Marcos e Helena, por serem parceiros e incentivadores dos meus sonhos, e por serem os melhores pais que eu poderia ter; e meu irmão, Mikael, por acreditar no meu potencial, me incentivar nos momentos que eu mais precisei.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Thalita Figueiredo, por toda ajuda, incentivo e dedicação à minha formação; por acreditar no meu potencial e investir em mim tão confiantemente; e por ser uma inspiração na minha caminhada acadêmica.

À minha grande amiga Mônica, por todo apoio, palavras de conforto e incentivo, por ser o refúgio para o meu desabafo em todos os momentos; e à minha afilhada Paloma, cujo nascimento me trouxe imensa felicidade e a convivência traz alegria e tranquilidade.

À Ríllary, minha grande amiga, que desde a adolescência me apoia e torce por mim, por fazer minha alegria nos dias mais tristes, e por me acompanhar em todos os momentos, bons e ruins. E às minhas amigas queridas Aline, Victória, Lilli e Raissa pela amizade e fé em mim, por me dizerem que eu sou capaz, quando precisei.

À Everlaine e Matheus, por toda a amizade, ajuda e palavras de incentivo e conforto; por vibrarem com minhas vitórias e estarem presentes nos momentos mais nebulosos da minha vida e formação acadêmica.

Às minhas amigas e colegas de trabalho no Laboratório de Genética Molecular Humana, Rayssa, Gabi, Rayane, Thays, Clara e Grazi, por tornarem o ambiente trabalho um lugar leve, descontraído e feliz todos os dias; e por me dizerem palavras de incentivo nos momentos em que duvidei do meu potencial e das minhas habilidades.

Às minhas amigas de graduação, Juliana, Lavínea, Jennifer, Rose, Alexia, Adrícia, Andreia, Duda e Mirelly, por todos os momentos compartilhados, felizes ou apreensivos; e por torcerem por mim em todos os momentos. E a todos os colegas de classe que iniciaram essa jornada comigo.

Aos integrantes do Laboratório de Genética Molecular Humana; docentes, Prof^a Dr^a Débora Michelatto, Prof^a Dr^a Isabella Monlleó, Prof. Dr. Reginaldo Petroli, Dr. Marshall Fontes; à Chrys, enfermeira do setor de genética clínica, por todas as conversas e trocas maravilhosas; à colaboradora Pomy Kim, por ter sido uma colega de trabalho maravilhosa e ter

me proporcionado momentos de diversão em várias ocasiões; e aos discentes, em especial Virgílio, Mari, Alice e Martha pela parceria.

Ao biomédico colaborador do laboratório, Diogo, por toda ajuda durante este último ano, e por sempre se preocupar não só com nosso desempenho na pesquisa, mas com nosso bem-estar.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Celular da UFAL na época em que eu fazia parte do grupo, Beatriz, Rafael, Návylla, Polli, Fernanda, Juliane, Profª Drª Salete Smaniotto, Prof. Dr. Emiliano Barreto, e todos os outros docentes e discentes, por todos os bons momentos vividos, em especial à Profª Drª Maria Danielma Reis, pela primeira grande oportunidade rumo à realização de um grande sonho e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos pacientes, que, de bom grado, contribuem com o avanço científico para o conhecimento das causas de suas condições.

A todos os professores do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL que contribuíram com minha formação, que tanto me ensinaram e inspiraram.

Às agências de fomento à pesquisa FAPEAL, CNPq e CAPES, em especial ao Programa de Pesquisa para o SUS-AL - Edital 2020 (Processo: 60030.0000000215/2021), pelo suporte financeiro que permite que a ciência seja feita com toda dedicação em nosso país.

E por fim, a Deus, no qual eu tenho desmedida fé, e me deu resposta às orações que me permitiram seguir na carreira científica que hoje tanto almejo.

The flower that blooms in adversity is the most rare and beautiful of all.

(Mulan)

RESUMO

A síndrome do X-frágil (SXF) é uma condição genética de herança dominante ligada ao X e é a principal causa herdável de Deficiência Intelectual (DI), com maior prevalência em indivíduos do sexo masculino. É causada por uma mutação instável que consiste em uma expansão de uma região de repetição da trinca de trinucleotídeos CGG na região 5' não traduzida do primeiro exon do gene *FMRI* (Do inglês, *FMRP translational regulator 1*), causando hipermetilação no promotor do gene, tendo como consequência seu silenciamento e perda ou redução na expressão da proteína FMRP (Do inglês, *Fragile X mental retardation protein*), que é essencial para a regulação de mecanismos moleculares relacionados com o desenvolvimento neural, a conexão de sinapses e a manutenção de circuitos nervosos. Essa alteração pode ocorrer em pré-mutação ou mutação completa, a depender do número de repetições de CGG, e além da SXF como condição em pacientes do sexo masculino com mutação completa, outras condições existem e estão associadas à pré-mutação no gene *FMRI* em homens e mulheres, como a síndrome de tremor/ataxia associada ao X-frágil e a insuficiência ovariana primária (exclusiva para mulheres). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma técnica para a investigação molecular da SXF através da triagem do gene *FMRI*, no Laboratório de Genética Molecular Humana, localizado no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, da Universidade Federal de Alagoas (LGMH/HUPAA-UFAL) a fim de ofertar como um teste diagnóstico a pacientes com clínica sugestiva, história familiar positiva ou com algum grau de DI. Para isso, foi selecionada uma família com história familiar positiva e clínica sugestiva para a SXF, e após coleta de material biológico, foram feitas, em laboratório, a extração do DNA genômico, e as reações de PCR convencional e multiplex, com posterior análise por eletroforese capilar (ABI 3500®), e os eletroferogramas gerados foram analisados em softwares específicos para a análise de fragmentos. A partir disso, foi possível confirmar que os pacientes do sexo masculino dessa família investigada são portadores da SXF, com mutação completa no gene *FMRI*. Diante disso, a padronização da técnica no LGMH foi realizada com sucesso e o teste vem sendo ofertado no Serviço de Genética Clínica (SGC) do HUPAA-UFAL, no âmbito do SUS, bem como para pacientes com DI selecionados por busca ativa na capital e em outros municípios de Alagoas.

Palavras-chave: Síndrome do X-frágil; deficiência intelectual; diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Fragile-X syndrome (FXS) is an X-linked dominant genetic condition and is the main heritable cause of Intellectual Disability (ID), with major prevalence in males. It is caused by an unstable mutation consisting of an expansion of a repeat region of the CGG trinucleotide triplet in the 5' untranslated region of the first exon of the *FMR1* gene (*FMRP translational regulator 1*), causing hypermethylation in the gene promoter, resulting in its silencing and loss or reduction in the expression of the FMRP protein (Fragile X mental retardation protein), which is essential for the regulation of molecular mechanisms related to neural development, the connection of synapses and the maintenance of nervous circuits. This change can occur in premutation or full mutation, depending on the number of CGG repeats, and in addition to SXF as a condition in male patients with full mutation, other conditions exist and are associated with premutation in the *FMR1* gene in men and women, such as Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and primary ovarian insufficiency (women only). Therefore, the objective of this study was to standardize a technique for the molecular investigation of FXS through the screening of the *FMR1* gene, at the Laboratory of Human Molecular Genetics, located at the University Hospital Professor Alberto Antunes, of the Federal University of Alagoas (LGMH/HUPAA-UFAL) to offer it as a diagnostic test to patients with suggestive clinical features, positive family history or with some degree of ID. For this, a family with a positive family history and a clinical history suggestive of FXS was selected, and after collecting biological material, extraction of genomic DNA was carried out in the laboratory, and conventional and multiplex PCR reactions were performed, with subsequent analysis by capillary electrophoresis (ABI 3500[®]), and the generated electropherograms were analyzed in specific software for the analysis of fragments. From this, it was possible to confirm that the male patients of this investigated family are carriers of SXF, with full mutation in the *FMR1* gene. In view of this, the standardization of the technique at the LGMH was successfully carried out and the test has been offered at the Clinical Genetics Service of the HUPAA-UFAL, within the scope of the Unified Health System, as well for patients with ID selected by active search in the capital and in other municipalities of Alagoas.

Keywords: Fragile X syndrome; intellectual disability; molecular diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura do gene <i>FMRI</i> e os três grupos de alelos associados ao número de expansão de CGG (alelo normal, pré-mutação e mutação completa).	19
FIGURA 2- Interações do gene <i>FMRI</i> com outros genes.....	22
FIGURA 3- Diagrama da técnica de amplificação para a identificação da mutação no gene <i>FMRI</i>	28
FIGURA 4- Genealogia de família com quatro irmãos afetados por Síndrome do X-frágil atendidos na APAE Maceió.....	30
FIGURA 5- Eletroferogramas com os perfis dos pacientes do sexo masculino.....	32
FIGURA 6- Genealogia de família com indicação de investigação molecular para a Síndrome do X-frágil.....	33
FIGURA 7- Genealogia de família com indicação de neurologista para investigação molecular da Síndrome do X-frágil.....	34
FIGURA 8- Eletroferogramas com os perfis das pacientes do sexo feminino.....	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1- Fenótipo típico da mutação no gene <i>FMRI</i>	20
QUADRO 2- Pacientes do sexo masculino triados para mutação no gene <i>FMRI</i>	35
TABELA 1- Mix para PCR contendo três primers.....	26
TABELA 2- Mix para PCR contendo dois primers.....	26
TABELA 3- Programa HOT XFRA.....	26
TABELA 4- Mix da Taq Polimerase.....	27
TABELA 5- Programa XFRA.....	27
TABELA 6- Mix de reagentes para análise de fragmento em analisador de DNA.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DI	Deficiência Intelectual
RI	Reabilitação Intelectual
SXF	Síndrome do X-Frágil
<i>FMR1</i>	Do inglês, <i>FMRP translational regulator 1</i>
CGG	Citosina Guanina Guanina
mRNA	RNA mensageiro
FMRP	Do inglês, Fragile X mental retardation protein
FXPOI	Insuficiência Ovariana Primária associada ao X-Frágil
FXTAS	Síndrome de Tremor/Ataxia associada ao X-Frágil
FXR1P	Proteína 1 Relacionada ao X-Frágil
FXR2P	Proteína 2 Relacionada ao X-Frágil
PCR	Do inglês, Polymerase Chain Reaction
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DMSO	Dimetilsulfóxido
Pb	Pares de Base
MC	Mutação Completa
PM	Pré-Mutação
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
SGC	Serviço de Genética Clínica
SUS	Sistema Único de Saúde
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana

LISTA DE SÍMBOLOS

♂	Indivíduo do sexo masculino
♀	Indivíduo do sexo feminino
∞	Infinito
μ	Micro
°C	Graus Celsius
©	Do inglês, <i>Copyright</i>
®	Marca Registrada
™	Do inglês, <i>Trademark</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Deficiência intelectual.....	16
2.2	Síndrome do X-frágil	17
2.3	O gene <i>FMR1</i> e a proteína FMRP.....	20
2.4	Diagnóstico Molecular da SXF.....	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Geral.....	23
3.2	Específicos.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Amostra.....	24
4.2	Extração de DNA e quantificação.....	24
4.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	24
4.4	Eletroforese capilar.....	28
4.5	Análise dos resultados.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Família da APAE: Caso índice.....	29
5.2	Famílias com DI e indicação para teste genético da SXF.....	33
5.3	Diagnóstico molecular para mulheres.....	35
6	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI) é uma condição que afeta as capacidades intelectuais e adaptativas de um indivíduo, afetando atividades sociais e cotidianas (D'ÁVILA, 2022). Tem prevalência entre 1-3% na população mundial, e cerca de 1,2% da população brasileira é afetada pela condição, com 35% dos casos sendo assistidos por centros de reabilitação intelectual (RI), de acordo com o censo do IBGE revisado em 2019 (TOPPER *et al*, 2011; PNS/IBGE, 2019). Entretanto, especialmente no Nordeste, a caracterização da DI, fatores de risco associados e a determinação das diferentes causas genéticas são pouco conhecidos, devido a inúmeros fatores; como a ausência ou limitação de médicos especializados e laboratórios de diagnóstico molecular, concentrados no Sudeste e a subnotificação das informações, que carecem de dados quantitativos e qualitativos de forma integrada, sobre deficiência. Alagoas é, portanto, um estado de grande vulnerabilidade, apesar de haver centros de assistência à pessoa com deficiência, por exemplo, Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) e a Associação Pestalozzi, que realizam um atendimento multidisciplinar para a rede de atenção à saúde da pessoa com deficiência, na capital e em diversos municípios do interior e região metropolitana do estado. Entretanto, a reabilitação intelectual (RI) é a área com maior demanda reprimida nessas instituições, cobrindo um número limitado de usuários acometidos pela DI.

A DI é uma desordem crônica e extremamente heterogênea quanto a causa, podendo apresentar etiologia genética, ambiental ou multifatorial. O estudo das causas genéticas dessa condição é essencial, pois alterações cromossômicas, ou mutações gênicas de herança autossômica recessiva, dominante ou ligadas ao X, correspondem a grande parte dos casos graves de DI no mundo; ainda assim, a investigação dessas causas segue insuficiente, sobretudo em Alagoas, e estima-se que cerca de 60% dos casos de DI não possuem diagnóstico etiológico definido (TOPPER *et al*, 2011; HAN *et al*, 2018). Além disso, clinicamente, a condição pode ser caracterizada como: não sindrômica, quando ocorre isolada, ou sindrômica, possuindo outras características além da DI, como dismorfias corporais e outras alterações neurológicas e/ou sistêmicas (D'ÁVILA, 2022). Para compreender o prognóstico, estimar a recorrência familiar e trazer um diagnóstico completo e diferencial, a elucidação dos fatores responsáveis pela ocorrência da condição é imprescindível (TOPPER *et al*, 2011).

Dentre as condições genéticas ligadas ao X, a síndrome do X-frágil (SXF) representa grande parte dos casos de DI, pois consiste na principal causa herdável da condição, sobretudo em indivíduos do sexo biológico masculino. Diante disso, o diagnóstico da SXF é essencial, visto que sua prevalência é grande dentre as causas genéticas de DI e as chances de recorrência

poderá ser comunicada à família por meio do aconselhamento genético. Existem diversas técnicas que possibilitam a identificação da mutação no gene *FMRI* (Do inglês, *FMRP translational regulator 1*), responsável pelo fenótipo da SXF (CIACCIO *et al*, 2017). Ao diagnosticar positivamente essa condição como causa de DI, pode-se descartar o investimento em outras metodologias para investigação etiológica, evitando o gasto desnecessário de recursos e minimizando a odisseia diagnóstica que muitos pacientes são submetidos.

O Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC/HUPAA-UFAL) é o único serviço de atendimento vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) que oferece acompanhamento genético especializado para pacientes de Alagoas. Além do ambulatório de genética clínica, o serviço conta com o Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), localizado no HUPAA-UFAL, mantido com financiamentos de pesquisa. Esta pesquisa, desenvolvida no LGMH, está inserida no Grupo-CNPq *Prevenção e atenção à saúde de pessoas com defeitos congênitos e doenças raras no SUS* com a inserção da deficiência intelectual como nova linha de pesquisa, desde 2021, a partir do financiamento PPSUS-AL-2020. Ambos os serviços disponíveis no HUPAA-UFAL consistem numa importante ferramenta para auxiliar na elucidação da etiologia da DI no estado. Diante disso, foi desenvolvido um método para a triagem do gene *FMRI* associado à mutação responsável pela síndrome do X-frágil, principal causa herdável de DI. A oferta desta triagem no LGMH, no âmbito do SUS, tem possibilitado o esclarecimento de casos com clínica para SXF, bem como, auxiliado na elucidação de casos de DI com distúrbios associados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Deficiência intelectual

A deficiência intelectual (DI) é uma condição caracterizada por limitações nas capacidades intelectuais e adaptativas de um indivíduo, tendo como consequência a dificuldade de realização de práticas cotidianas e interferindo significativamente em atividades sociais. Tem prevalência entre 1 e 3% na população mundial, e pode ocorrer de maneira isolada, o que configura uma DI não síndrômica, ou em associação com outros quadros clínicos, o que caracteriza uma síndrome (CABALLERO PÉREZ *et al*, 2017; TOPPER *et al*, 2011). A DI síndrômica está associada com outras manifestações clínicas além da deficiência intelectual, como comprometimento de órgãos e funções fisiológicas, distúrbios corporais, e outras características neurológicas inerentes, como transtorno do espectro autista (TEA) e transtorno

de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Além disso, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), que está na quinta revisão, a DI pode ser classificada em diferentes níveis, de acordo com o diagnóstico clínico feito a partir da avaliação dos níveis das funções adaptativas, sociais e habilidades práticas, sendo os níveis de severidade: leve (49-70), moderado (36-50), grave (20-35) e profundo (<20) (DUARTE, 2018).

A etiologia da DI pode ser genética, ambiental ou multifatorial, e sua característica etiológica heterogênea contribui com a pouca compreensão sobre suas causas. Os fatores ambientais que resultam no fenótipo de DI sindrômica ou não sindrômica são diversos, como acesso a sistema de saúde pública e estilo de vida materno, que incluem desnutrição, deficiência de iodo, infecções pré-natais, exposição a teratógenos, principalmente o álcool, associado à síndrome alcoólica fetal), bem como intercorrências durante o parto como prematuridade e asfixia perinatal (CHIURAZZI *et al*, 2020). Por outro lado, o reconhecimento das causas genéticas da DI é determinante para compreender o prognóstico e estimar a recorrência familiar de condições genéticas com caráter de herança autossômica (dominante ou recessiva) ou monogênicas ligadas ao X, como a SXF, que foi a primeira condição de DI monogênica na qual houve identificação de seu gene, o que se deu por sua alta prevalência, padrão de herança e possibilidade de reconhecimento clínico (TOPPER *et al*, 2011; CHIURAZZI & PIROZZI, 2016; CHIURAZZI *et al*, 2020).

2.2 Síndrome do X-frágil

A síndrome do X-Frágil (SXF) (OMIM: #300624) é caracterizada como um distúrbio genético ligado ao cromossomo X; foi descrita pela primeira vez em 1943 por Martin e Bell, ficando conhecida como “síndrome de Martin-Bell”; contudo, a partir de 1969, foi relatada uma alteração num sítio do cromossomo X, que apenas em 1991 foi mapeado em Xq27.3, e a condição passou a ser chamada de “síndrome do X-frágil”; consiste na segunda causa mais comum de deficiência intelectual (DI) - sendo a primeira, a síndrome de Down - e a principal causa herdável de DI; e por ser uma condição monogênica ligada ao X, apresenta maior prevalência em indivíduos do sexo masculino (CIACCIO *et al*, 2017; SITZMANN *et al*, 2017). O cromossomo X apresenta uma gama de genes que são expressos no cérebro e estão envolvidos com processos essenciais ligados ao desenvolvimento neuronal normal, e cerca de 20% desses genes estão associados a distúrbios do neurodesenvolvimento, mais prevalentes em homens, que além disso, possuem fenótipo mais acentuado do que mulheres, devido ao método de compensação de dose gerado pela inativação de um dos cromossomos X em mulheres, que

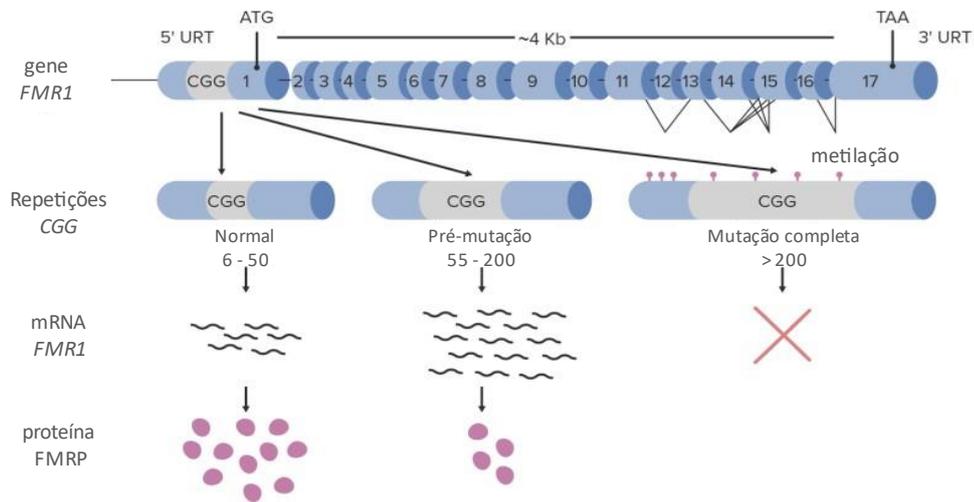
ocorre para garantir o mesmo nível de expressão de genes entre homens e mulheres (BRAND *et al*, 2021; RODRIGUES *et al*, 2022).

A SXF é causada por uma expansão instável de uma trinca de nucleotídeos (CGG - Citosina Guanina Guanina)_n na região 5' não traduzida do primeiro exon do gene *FMRI* (do inglês, *FMRP translational regulator 1*), tendo como consequência a hipermetilação da região promotora desse gene, causando seu silenciamento e perda ou redução significativa da expressão da proteína FMRP (do inglês, *fragile X mental retardation protein*) (SITZMANN *et al*, 2017; CIACCIO *et al*, 2017). O diagnóstico da SXF é feito de acordo com o número de repetições da trinca CGG expressa no gene *FMRI*, que varia entre 06 e 44 em indivíduos normais para a mutação, 55 e 200 em indivíduos com pré-mutação, e repetição maior que 200 para mutação completa no gene *FMRI*, expansão vista nos indivíduos afetados, configurando a SXF. Além disso, a herança da mutação não se apresenta como um padrão mendeliano, dependendo da expansão de repetição CGG, dessa forma, a característica da mutação permite que indivíduos com pré-mutação possam transmitir um alelo com uma maior expansão da região de CGG, configurando uma transição da condição para uma mutação completa na geração seguinte, característica das mutações dinâmicas (CIACCIO *et al*, 2017; SITZMANN *et al*, 2017).

A hipermetilação gênica observada nessa mutação ocorre de maneira que esse padrão de metilação se expande desde a região de repetição de CGG, bem como na região promotora, até o íntron 1 do gene *FMRI* o que resulta em perda de modificações ativas e ganho de modificações repressivas de proteínas histonas, o que leva ao bloqueio na transcrição do promotor do gene (Figura 1). Apesar de não haver um consenso sobre em qual fase do desenvolvimento esse padrão de metilação responsável pela mutação ocorra, acredita-se que entre a décima e décima terceira semana de gestação as expansões estão completas e a hipermetilação da região já tenha resultado na formação de heterocromatina na região promotora (MOR-SHAKED & EIGES, 2018; KRAAN *et al*, 2019; LIU *et al*, 2018). No entanto, apesar de na mutação completa haver uma redução na expressão de mRNA causada pela mutação no *FMRI*, na pré- mutação há um aumento expressivo de mRNAs (RNAs mensageiros) nos alelos, de maneira que há aumento de transcrição diretamente relacionado com o número de repetições da trinca CGG (Figura 1); não há um fator amplamente determinante para isso, porém, a literatura aborda a hipótese de que essa expansão resultante na pré-mutação altera o ambiente da cromatina a deixando mais exposta a fatores de inibição gênica e/ou de transcrição, permitindo a tradução de outras proteínas que podem estar

relacionadas com o fenótipo de indivíduos com pré-mutação, como aquelas codificadas pelo gene *FMR4* (KRAAN *et al*, 2019).

Figura 1- Estrutura do gene *FMR1* e os três grupos de alelos associados ao número de expansão de CGG (alelo normal, pré-mutação e mutação completa).



Fonte: Adaptada de OISETH *et al*, 2022.

Relacionadas à pré-mutação existem diversas alterações clínicas (Quadro 1), incluindo insuficiência ovariana primária associada ao X-frágil (FXPOI) e síndrome de tremor/ataxia associada ao X-frágil (FXTAS), uma condição descrita pela primeira vez em 2001 e se caracteriza por um aumento progressivo de tremores, dificuldade de ambulação, e déficits de funções cerebrais essenciais, com fenótipos associados comuns como fibromialgia, hipotireoidismo, dores de cabeça, apneia do sono e alterações cognitivas e psiquiátricas; além disso, quadros de ansiedade e depressão também são condições recorrentes em pacientes com pré-mutação no gene *FMR1*. Apesar de ocorrer mais frequentemente em mulheres, comparada à mutação completa, o fenótipo associado à pré-mutação é mais prevalente em homens (CABAL-HERRERA *et al*, 2020; MILA *et al*, 2018).

O fenótipo associado à SXF inclui diversas características além da deficiência intelectual (Quadro 1), como hipotonia (ao nascer), hiperatividade, ansiedade, atraso no desenvolvimento da linguagem, problemas comportamentais e TEA; bem como distorções corporais que são orelhas proeminentes, face alongada, pés achatados, hiperextensibilidade metacarpofalângica, polegares biarticulados, palato arqueado, peito escavado, maior risco de convulsões, prolapso da válvula mitral e macroorquidismo -ocorrendo após a puberdade- contudo, os indivíduos com mutação completa no gene *FMR1* podem apresentar apenas

algumas dessas características em conjunto, sendo mais acentuadas em indivíduos do sexo masculino que além disso, apresentam um comprometimento cognitivo maior (DI moderada ou grave) em comparação com indivíduos do sexo feminino. Todas essas alterações podem ser explicadas pelo fato do gene *FMRI* ser muito expresso nos tecidos cerebral e testicular, além do padrão de inativação parcial de um dos cromossomos X em mulheres (HAGERMAN *et al*, 2017; PROTIC *et al*, 2019; SITZMANN *et al*, 2017).

Quadro 1- Fenótipo típico da mutação no gene *FMRI*.

MC - ♂	PM - ♂	MC - ♀	PM - ♀
Orelhas proeminentes	FXTAS	DI	FXPOI
Face alongada	Fibromialgia	Problemas cognitivos	FXTAS
Pés achatados	Hipotireoidismo	Problemas psiquiátricos	Fibromialgia
Hiperextensibilidade metacarpofalângica	Dores de cabeça	-	Hipotireoidismo
Polegares biarticulados	Apneia do sono	-	Dores de cabeça
Palato arqueado	Problemas cognitivos	-	Apneia do sono
Peito escavado	Problemas psiquiátricos	-	Problemas cognitivos
Prolapso da válvula mitral	Ansiedade	-	Problemas psiquiátricos
Macroorquidismo	Depressão	-	Ansiedade
Convulsões	-	-	Depressão
Comportamento agressivo	-	-	-
Hipotonia	-	-	-
DI	-	-	-

MC- Mutação Completa; PM- Pré-mutação; ♂- Indivíduos do sexo masculino; ♀- Indivíduos do sexo feminino.
Fonte: Elaborado pela autora.

2.3 O gene *FMRI* e a proteína FMRP

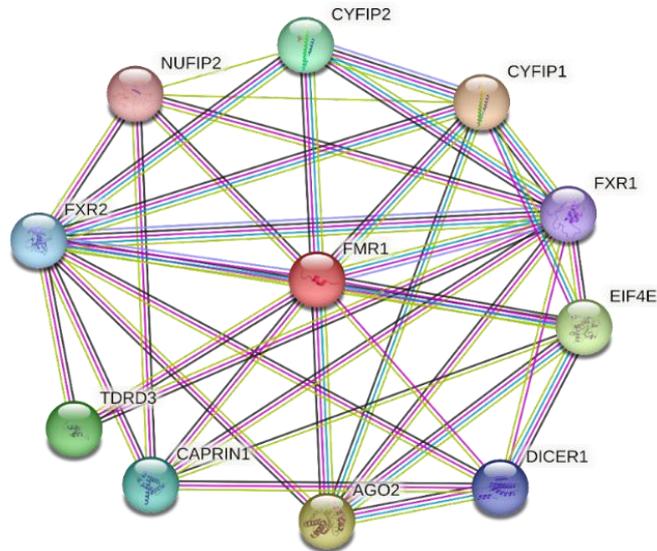
O gene *FMRI* tem significativa expressão na região cerebral, o que condiz com o padrão de alterações observadas na SXF; a proteína que é codificada por esse gene, a FMRP, é altamente expressa no sistema nervoso, se caracteriza por ser uma proteína sináptica reguladora da tradução de outras proteínas devido a sua interação com RNAs mensageiros (mRNA), e interação proteína-proteína com diversas funções descritas, como a modulação da duração de potenciais de ação e plasticidade sináptica, edição de RNA, regulação da diferenciação celular, estabilização do genoma e splicing de pré-RNA, além de alteração na função dos canais iônicos em células neuronais; todos esses fatores associados inferem que o fenótipo da SXF é causado

por interrupções na atividade neuronal decorrentes das alterações na expressão dessa proteína (SITZMANN *et al*, 2017; DENG & KLYACHKO, 2021).

Apesar da proteína FMRP ter funções bem estabelecidas na regulação de mecanismos moleculares, pouco se conhece a respeito de como esses mecanismos ocorrem e como se dá sua interação com outras proteínas; contudo, pode-se associar a esta proteína um envolvimento direto no controle de mRNA, visto que se encontra intimamente ligada ao mecanismo de tradução proteica, bem como síntese proteica local em microdomínios, por possuir alta expressão em neurônios e estar presente em cones de crescimento e espinhas dendríticas; todos esses mecanismos sugerem que a pouca expressão ou ausência da proteína acarretam em mecanismos de desregulação da tradução e alterações no transporte de mRNA que tem função essencial para a síntese de proteínas locais que estão envolvidas com o desenvolvimento neural e a maturação sináptica, além de afetar na funcionalidade de outras proteínas de RNA, como a CAPRIN1, que também apresenta capacidade de controle de tradução em neurônios (EL FATIMY *et al*, 2012).

Além disso, diversos mecanismos celulares e moleculares têm sido relacionados com o funcionamento dessa proteína, como a dinâmica relacionada ao citoesqueleto de actina e à cromatina, bem como respostas a danos do material genético e ao estresse de replicação deste. A FMRP é uma proteína da família de proteínas FXR, que também inclui a FXR1P (Proteína 1 Relacionada ao X-Frágil) e a FXR2P (Proteína 2 Relacionada ao X-Frágil) e estas compartilham sequências de alta conservação que estão relacionadas diretamente com suas funções na regulação da tradução. Além disso, interações da FMRP com outros genes (Figura 2), como o *TDRD3*, também tem consequência na regulação da tradução. Além dessas, outras proteínas estão intimamente ligadas ao funcionamento dos mecanismos associados à FMRP, sendo as principais as proteínas codificadas pelos genes *NUFIP*, *CYFIP1* e *CYFIP2*, genes correlacionados com o funcionamento do *FMR1* (Figura 2) (TAHA *et al*, 2021; EL FATIMY *et al*, 2012; LINDER *et al*, 2008). Outras proteínas com crítica importância neuronal são a AGO2 (ácido nucleico de Argonauta) e a Dicer1, que associadas agem facilitando a transferência de mRNA, e que são essenciais para a formação normal da morfologia neuronal (LANNOM *et al*, 2021; KENNY *et al*, 2014). Dentre outras importantes funções associadas à FMRP, em fases do desenvolvimento embrionário, desempenha importante papel durante a oogênese, espermatogênese, regulação da frequência cardíaca, manutenção de células-tronco, proliferação de células endoteliais, diferenciação, e fatores relacionados com câncer como angiogênese e progressão tumoral (TAHA *et al*, 2021).

Figura 2- Interações do gene *FMRI* com outros genes.



As linhas coloridas representam as interações, relacionadas ao desenvolvimento neuronal, dos genes entre si e com o *FMRI*. Fonte: Feito com STRING-db.org (v 11,5) ©.

2.4 Diagnóstico molecular da SXF

Devido a sua alta prevalência em casos de deficiência intelectual, sobretudo em indivíduos do sexo masculino, é importante avaliar a possibilidade do diagnóstico da síndrome do X-frágil em indivíduos com características relacionadas com deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, e alterações comportamentais. Diante disso, diferentes técnicas para a triagem do gene *FMRI*, associado ao diagnóstico etiológico da SXF, vêm sendo desenvolvidas em todo o mundo; dentre essas, dois métodos comuns para identificar o padrão de repetição CGG e metilação no gene *FMRI* são a PCR (do inglês, Polymerase Chain Reaction) e a análise por Southern blot (KUMARI & USDIN, 2020). Uma das técnicas de PCR ideais e mais utilizadas para a identificação da mutação associada à SXF é a PCR multiplex e posterior análise por Southern blot, podendo ser realizada com o uso de sondas quimioluminescentes radioativas ou não radioativas associadas a modificações nas reações com a utilização de reagentes específicos para a identificação da metilação (CAI *et al*, 2019).

Dentre outros métodos encontrados na literatura para identificação de alelos normais, pré-mutados ou mutados, a PCR em conjunto com a eletroforese em gel de agarose se mostra uma opção possível, contudo, com algumas alterações que são necessárias para permitir a revelação dos resultados das bandas de PCR por brometo de etídio, o que é inviável devido a característica da mutação (rica em CG) e necessidade de uso de reagentes como a 7-deza dGTP, para viabilizar a correta amplificação dessas regiões ricas em CG (CHONG *et al*, 1994;

BHAGYA *et al*, 2013). Outra alternativa consiste em técnicas baseadas em amplificação de genoma com primer quimérico associado com PCR baseada em betaína e eletroforese em gel de agarose 2% ou gel de poliacrilamida a 6%, com a utilização de marcadores específicos e sondas oligonucleotídica, porém ainda realizadas em conjunto com a técnica de Southern blot (TASSONE *et al*, 2008). Outras técnicas para o diagnóstico da SXF são menos comumente aplicadas, todas apresentando vantagens e desvantagens; uma delas é a detecção da expressão da proteína FMRP a partir de anticorpos e ensaios com espectrometria de massa (LYON *et al*, 2010). Contudo, os testes moleculares, a partir do DNA, representam um maior grupo de técnicas, entre elas a eletroforese capilar, que atrelada à PCR multiplex, viabiliza uma rápida, simples e eficaz identificação de alelos normais, pré-mutados e mutação completa; além disso, outras técnicas com o uso de eletroforese capilar aliada a outros métodos vêm sendo comumente aplicadas para identificação da mutação no gene *FMR1*, inclusive com a utilização de kits comerciais específicos, como o AmpliDeX[®] *FMR1* PCR, consistindo em uma alternativa mais dispendiosa (CHEN *et al*, 2010; RAJAN-BABU & CHONG, 2019; GRASSO *et al*, 2014; RAMOS *et al*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a padronização de uma técnica para triagem do gene *FMR1*, a partir de metodologias relativamente de baixo custo com a finalidade da sua inserção no rol de exames do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes no âmbito do SUS.

2.2 Específicos

- Identificar e selecionar casos com indicação de teste para síndrome do X-frágil ou pacientes com DI sindrômica sem elucidação diagnóstica de diferentes municípios de Alagoas;
- Padronizar a investigação molecular do gene *FMR1* a partir das metodologias de PCR e eletroforese capilar;
- Fazer a análise dos dados utilizando softwares específicos para a análise de fragmentos;
- Participar de avaliação clínica e especializada com médico geneticista das famílias selecionadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostra

A seleção de famílias para a investigação molecular foi feita através do levantamento de prontuários de pacientes atendidos em instituições de RI do estado, sendo observados inicialmente a clínica dos mesmos e, então, história familiar sugestiva para SXF. Além disso, pacientes atendidos no Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC-HUPAA-UFAL), e com indicação para a síndrome também passaram pela investigação molecular. Após aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP- CAAE: 39674220.1.1001.5013), as primeiras amostras foram obtidas a partir de coleta de sangue de uma família, composta por mãe e 4 filhos do sexo masculino, assistida pela APAE de Maceió. Por conseguinte, foi feita a coleta de material biológico em outros pacientes, atendidos no ambulatório do HUPAA, bem como em outras instituições de RI em outros municípios de Alagoas; após isso, as amostras coletadas foram direcionadas ao laboratório para a realização dos protocolos subsequentes.

4.2 Extração de DNA e quantificação

Em laboratório, as amostras de sangue foram devidamente recebidas e as informações dos pacientes inseridas no banco de dados de pacientes do LGMH. Após isso, foi feita a extração do DNA genômico com metodologia de lise de leucócitos com proteinase K com posterior purificação fenólica (SAMBROOK; FRITSCH, MANIATIS, 1989), protocolo já bem estabelecido no laboratório. Ao final do protocolo, o DNA foi ressuspendido em 200µl de solução tampão TE 1x (LGC®). No dia seguinte à extração, as amostras foram quantificadas com a utilização de um quantificador de ácidos nucleicos (BioDrop®), para verificação, em 1 µl, da concentração de cada amostra, bem como suas razões de pureza e integridade; e foram então, armazenadas em refrigerador para ideal conservação no banco de DNA do LGMH.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após os processos já citados, as amostras de DNA com concentração em cerca de 50 ng/µl foram utilizadas para a realização da PCR que, para a investigação molecular da SXF, foram a PCR com dois e três primers, um deles marcado com fluorescência, segundo protocolo adaptado de: HADDAD, L. A.; MINGRONI-NETTO, R. C.; VIANNA-MORGANTE, A. M. & PENA, S. D. J. (1996) e protocolo utilizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco - USP. A PCR é uma técnica utilizada na biologia molecular para amplificar, a partir de oscilações de temperatura específicas, uma ou algumas cópias de determinada região

de DNA, em diversas ordens de magnitude, com a utilização de reagentes específicos que propiciam a amplificação *in vitro*, conseqüentemente, gerando de milhares a milhões de cópias de uma sequência de material genético (JOSHI & DESHPANDE, 2010). Contudo, devido às características inerentes à mutação aqui abordada, foi necessário a utilização de outros reagentes, com funções específicas, a fim de garantir uma boa amplificação das regiões de interesse, sendo estes: o 7-deaza dGTP, reagente que potencializa a amplificação de trechos de DNA ricos em nucleotídeos CG (é essencial devido a expansão da trinca CGG) (HADDAD *et al*, 1995; BHAGYA *et al*, 2013); dimetilsulfóxido (DMSO), importante para amplificação de trechos de DNA com grande repetição de nucleotídeos, inibindo a formação de estruturas secundárias no molde de DNA e nos primers (HARDJASA *et al* 2010); além disso, há o uso de um terceiro primer em um conjunto de reações, característica de uma PCR multiplex, para que, além da amplificação da região polimórfica, seja amplificada uma região do DNA com o tamanho de 223 pb (pares de base), que funciona como um controle interno para a reação (Figura 3).

As amplificações foram realizadas em duas reações para cada paciente, com a utilização de 1µl de DNA por reação (sem diluição), em microtubos de 0,2 ml, porém cada reação possuía um mix de reagentes distinto; isso se deve ao fato de que dois mix foram feitos para a PCR, sendo um com três primers (Tabela 1) e outro com dois (Tabela 2), de maneira que os resultados das duas reações para cada paciente servem de confirmação um para a outra. Após isso, as reações foram efetivamente realizadas em termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems®), inicialmente com programa o “HOT-XFRA” para a desnaturação do DNA (Tabela 3). Logo após, num microtubo de 0,5 ml, foi feito um mix com água ultrapura, tampão 10x e a enzima Taq Polimerase Platinum (Tabela 4) e foram adicionados 2 µl desse mix em cada um dos microtubos contendo as amostras desnaturadas, estando estes ainda no termociclador; sendo, logo em seguida, submetidas ao programa “XFRA” no termociclador, no qual ocorre, de fato, a amplificação (Tabela 5). Contudo, para sua utilização nas reações de PCR, alguns reagentes foram previamente preparados, como especificado abaixo:

- dNTP (1,25mM - 75% 7deaza dGTP): Num microtubo, foi homogeneizado 5µl dATP (100mM), 5µl dTTP (100mM), 5µl dCTP (100mM), 1,25µl dGTP (100mM), 37,5µl 7-deaza dGTP (10mM) e 346,25µl H₂O MilliQ (Total: 400µl); logo após, foi estocado em freezer -20°C;
- MIX com 2 primers (7,5uM Eag-U-6FAM / 7,5uM f): Num microtubo, homogeneizar: 7,5µl primer Eag-U (100uM), 7,5µl primer f (100uM) e 85µl H₂O MilliQ (Total: 100µl); logo após, foi estocado em freezer -20°C;

- MIX com 3 primers (7,5uM Eag-U-6FAM / 5uM f / 2uM Eag-L): Num microtubo, homogeneizar: 7,5µl primer Eag-U (100uM), 2uL primer Eag-L (100uM), 5µl primer f (100uM) e 85,5µl H₂O MilliQ (Total: 100uL); logo após, foi estocado em freezer -20°C.

Tabela 1- Mix para PCR contendo três primers

Reagente/amostra	Volume para uma reação (µl)
H ₂ O Ultrapura	11,2 µl
Tampão 10x	2,3 µl
MgCl ₂	1 µl
dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 7 deaza dGTP)	4 µl
MIX 3 Primers (7,5uM Eag-U / 5uM f / 2uM Eag-L)	1 µl
Dimetilsulfóxido (DMSO)	2,5 µl
Amostra	1 µl
Total	23 µl

Tabela 2- Mix para PCR contendo dois primers

Reagente/amostra	Volume para uma reação (µl)
H ₂ O Ultrapura	11,2 µl
Tampão 10x	2,3 µl
MgCl ₂	1 µl
dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 7 deaza dGTP)	4 µl
MIX 2 Primers (7,5uM Eag-U / 7,5 uM f)	1 µl
Dimetilsulfóxido (DMSO)	2,5 µl
Amostra	1 µl
Total	23 µl

Tabela 3- Programa HOT-XFRA

Temperatura	Tempo
98°C	10 minutos
72°C	∞

Tabela 4- Mix da Taq Polimerase

Reagente	Volume para uma reação (µl)
H ₂ O Ultrapura	1,48 µl
Tampão 10x	0,2 µl
Taq Polimerase Platinum (5U/ µl)	0,32 µl
Total	2 µl

Tabela 5- Programa XFRA

Temperatura	Tempo
94°C	2 minutos
65°C	1 minuto
72°C	2 minutos
94°C	1 minuto e 30 segundos
72°C	20 minutos
10°C	∞

Os primers utilizados para a amplificação das amostras de DNA genômico dos pacientes foram os seguintes:

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

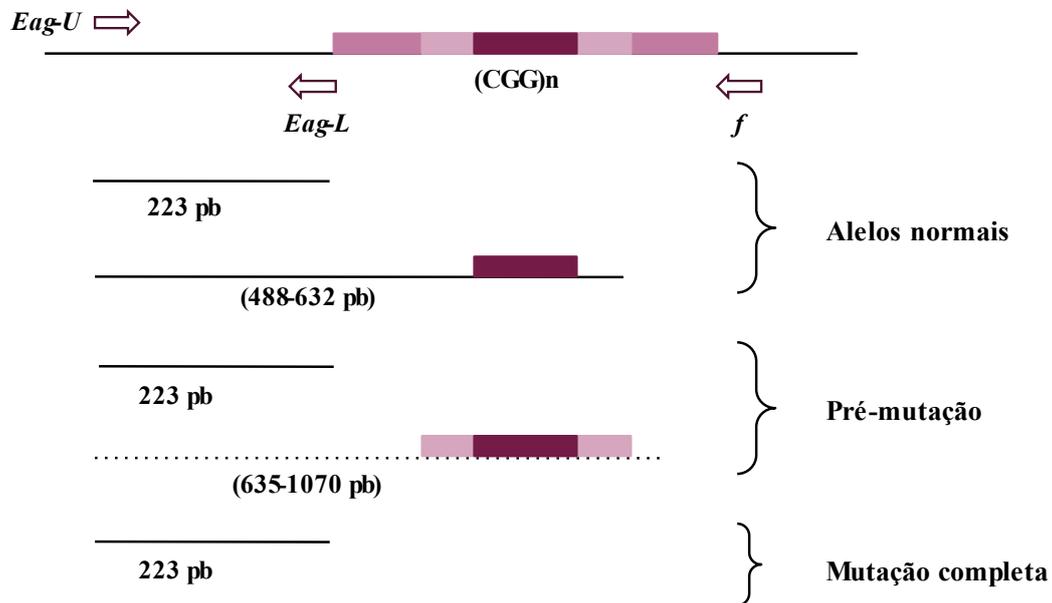
Primer Rev-1 - **Eag-L** – 5' cgctgcgggtgtaaacactgaaaccacgctc 3'

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

A partir disso, os tamanhos esperados dos produtos após amplificação da região polimórfica e análise em sequenciador (ABI 3500[®]) podem se enquadrar em três diferentes grupos, especificados abaixo, e esquematizados na figura 3.

- Indivíduo com alelos normais: 223bp (Eag-U e Eag-L) 488 a 632bp (Eag-U e f): até 54 repetições CGG
- Indivíduo com pré-mutação: 223bp (Eag-U e Eag-L) 635 a 1070bp (Eag-U e f): até 200 repetições CGG :
- Indivíduo com mutação completa: 223bp (Eag-U e Eag-L) ausência de banda (Eag-U e f): >200 repetições CGG

Figura 3- Diagrama da técnica de amplificação para a identificação da mutação no gene *FMRI*.



A caixa em roxo escuro indica a repetição CGG dentro da faixa normal. A caixa em roxo mais claro indica a expansão na faixa de pré-mutação. A expansão responsável pela mutação completa é indicada pela caixa em roxo intermediário. Os iniciadores da amplificação são indicados pelas setas. Os primers *Eag-U* e *Eag-L* amplificam a região de controle interno; os primers *Eag-U* e *f* amplificam a região polimórfica de expansão de CGG. A linha pontilhada na faixa de pré-mutação indica amplificação fraca. Fonte: Adaptado de HADDAD *et al*, 1995.

4.4 Eletroforese capilar

Os produtos obtidos após a amplificação passaram por etapa de preparação para serem inseridos no analisador de DNA (ABI 3500[®]), este capaz de analisar produtos com até 1200 pb. Nesta etapa, há a adição de formamida Hi-Di, um agente desnaturante de ácidos nucleicos; e *size standard*, reagente que funciona como um marcador fluorescente para identificação de alelos específicos de interesse e é capaz de marcar regiões de DNA com até 600 pb (Size standard LIZ 600) ou 1200 pb (Size standard LIZ 1200); ambos os reagentes em quantidades específicas para o número de reações (Tabela 6). Em seguida, as amostras foram levadas para o termociclador a 95°C por três minutos (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems[®]), com a finalidade de desnaturá-las e, então, foram colocadas imediatamente em gelo por, ao menos, 2 minutos; logo após, levadas para a corrida no analisador de DNA.

Tabela 6- Mix de reagentes para análise de fragmento em analisador de DNA

Reagente/amostra	Volume para uma reação
Formamida Hi-Di	7,7 µl
Size standard (LIZ 600) ou (LIZ 1200)	0,3 µl
Amostra (produto da PCR)	2 µl
Total	10 µl

4.5 Análise dos resultados

Ao fim da corrida das amostras por eletroforese capilar, foram gerados eletroferogramas com picos referentes a região analisada (expansão de repetição de CGG), bem como o pico de controle interno (para as reações com três primers), sendo que ambas as reações, com dois e com três primers, possuíam um deles marcado com fluorescência (6-FAM). Com a utilização do *size standard* (LIZ 600), o diagnóstico é feito pela presença ou ausência de pico na região de repetição de trinucleotídeos, visto que regiões acima de 600 pb (característicos de pré-mutação e de mutação completa) estarão ausentes; dessa forma, haverá pico de região de repetição apenas nos alelos de indivíduos normais para SXF. Contudo, utilizando-se o *size standard* (LIZ 1200), é possível identificar alelos com pré-mutação, pois pode-se observar picos na região entre 635 e 1070 pb (característicos de pré-mutação); porém, para a mutação completa, o diagnóstico ainda é feito pela ausência de pico da região polimórfica. Os dados brutos obtidos foram analisados em softwares específicos para análise de fragmentos (GeneMapper™ software 6; GeneMarker® software), possibilitando melhor visualização, quantificação e interpretação dos picos de fluorescência identificados para a amostra de cada paciente.

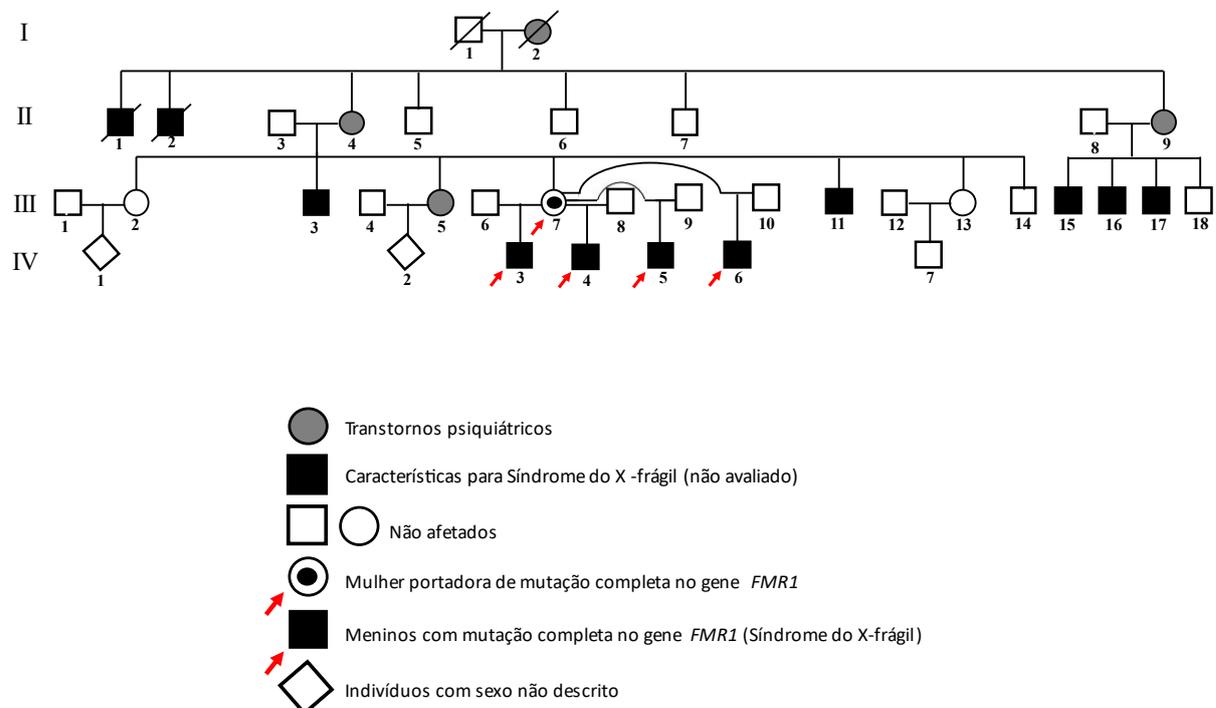
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Família da APAE: Caso índice

A partir da investigação molecular de pacientes de 6 famílias distintas, com história familiar positiva ou com indicação para o diagnóstico da SXF, foi realizada a análise dos eletroferogramas para cada indivíduo. Com relação à primeira família investigada, que possui larga história familiar condizente com o padrão de herança da condição em questão (Figura 4), foi observado que todos os quatro pacientes do sexo masculino são portadores de mutação completa no gene *FMRI*, visto que os eletroferogramas referentes as reações com três e com dois primers mostraram a ausência do pico da amplificação da região de repetição CGG,

indicando expansão da trinca maior que 55 [(CGG)>55], fora do padrão de normalidade, observado em até 600 pb (Figura 5). Enquanto isso, o paciente controle negativo (sem a SXF) apresentou amplificação da região polimórfica nas reações com três e com dois primers, indicando repetição dentro do padrão de normalidade [(CGG)<55]. Por outro lado, observou-se que em todos os pacientes, controle negativo ou afetados, houve amplificação do pico de controle interno com cerca de 223 pb nas reações de PCR multiplex, o que evidencia a eficácia das análises, visto que a visualização do pico nesta região era esperada em todos os pacientes, independente do tipo de alelo, pois a amplificação em até 223 pb está fora da região polimórfica. Além disso, nas reações com apenas dois primers a amplificação da região polimórfica no paciente controle negativo apresentou maior intensidade no pico, o que é explicado por maior eficácia do primer, que se ligou na região promotora apenas dessa região (com ausência de amplificação em 223 pb), favorecendo maior especificidade; sobretudo, é importante salientar que nos eletroferogramas de cada um dos pacientes houve concordância dos tamanhos moleculares dos picos referentes à região polimórfica nas reações com três e com dois primers, o que fortalece os resultados obtidos.

Figura 4- Genealogia de família com quatro irmãos afetados por Síndrome do X-frágil atendidos na APAE Maceió.

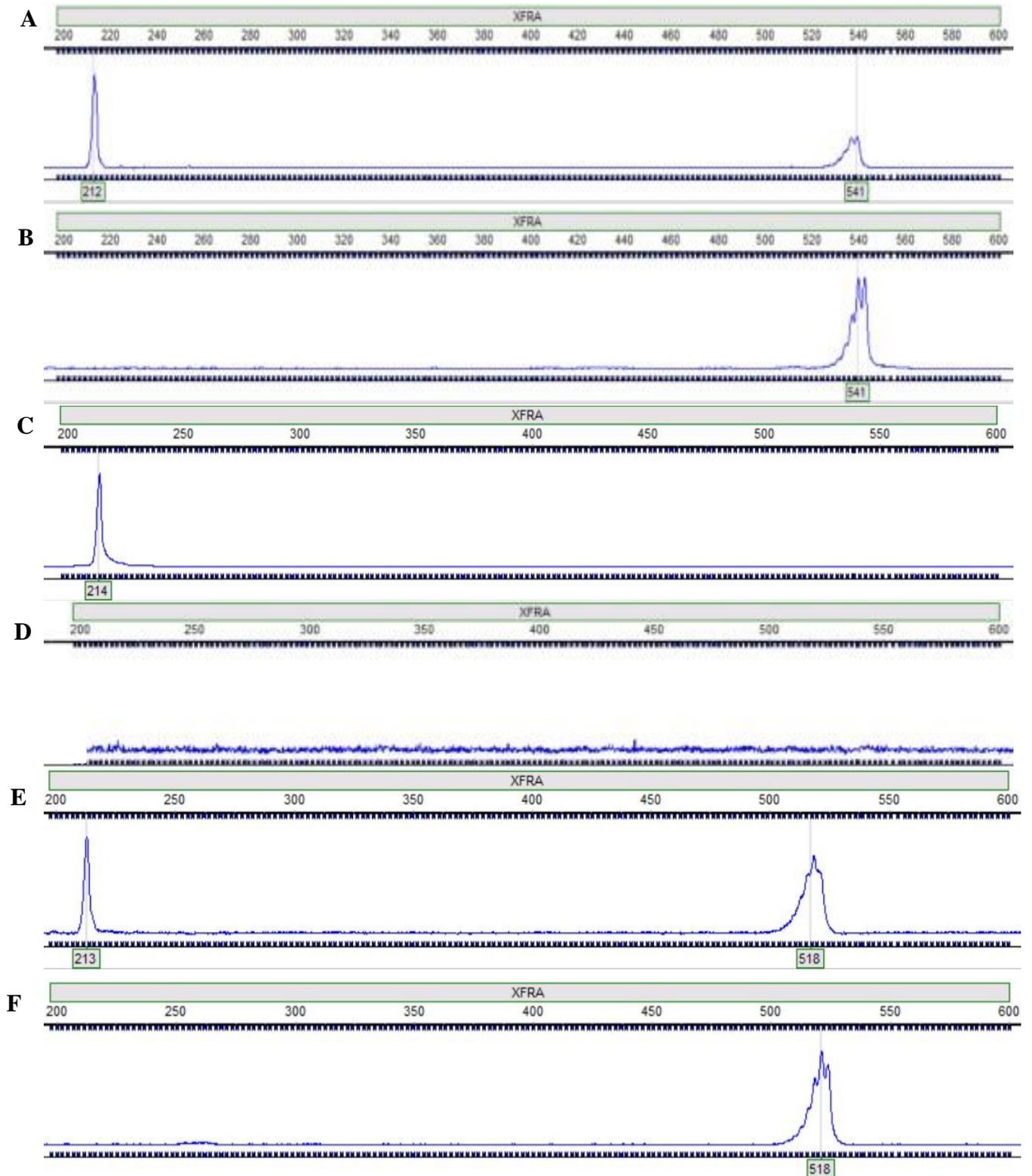


O heredograma representado acima demonstra um padrão típico de herança dominante ligada ao X, pois pode-se observar a prevalência de indivíduos do sexo masculino

provavelmente afetados, visto que possuem relatos de fenótipos semelhantes aos indivíduos avaliados clinicamente e positivados com a análise molecular para SXF dessa mesma família (IV- 3-6). Além disso, a presença de mulheres com problemas psiquiátricos é um forte indício de que essas sejam portadoras de pré-mutação ou mutação completa, considerando que, segundo a literatura, essa é uma característica comum no quadro associado à alterações no gene *FMRI* em mulheres, como é abordado por CABAL-HERRERA *et al*, 2020. A ocorrência de indivíduos possivelmente portadores de mutação em diferentes gerações desta família corrobora com o que se conhece a respeito de alterações ligadas ao cromossomo X, visto que é comum que sejam transmitidas para a descendência com uma frequência alta nas gerações familiares, principalmente para homens (CRABTREE, 2020). Somado a esses fatos, é importante salientar que os meninos que passaram pela investigação molecular apresentam fenótipo típico, incluindo características como: pés achatados, hiperextensibilidade metacarpofalângica, rosto alongado, orelhas proeminentes, irritabilidade e/ou agressividade e a característica que mais se destaca, responsável pelo atendimento assistencial em RI, a DI de moderada a grave associada ao transtorno do espectro autista, sendo todas essas características compatíveis com o fenótipo observado em indivíduos com mutação completa no gene *FMRI*, ou seja, portadores da SXF, como já bem estabelecido na literatura referente a condição (HAGERMAN *et al*, 2017; PROTIC *et al*, 2019).

Por outro lado, a mãe dos meninos não apresenta características faciais ou corporais compatíveis, o que está de acordo com os achados em mulheres portadoras da condição; além disso, esta mulher pode apresentar características comportamentais e/ou cognitivas não tão notáveis, mas que são compatíveis com o fenótipo da mutação. Isso pode ser explicado pelo método de compensação de dose causado pela inativação de um dos cromossomos X, o que pode ocorrer em quaisquer regiões deste, de maneira aleatória, garantindo uma expressão em mosaico dos genes do cromossomo sexual em indivíduos do sexo feminino, além de resultar em um mesmo nível de expressão de genes entre homens e mulheres (BRAND *et al*, 2021; RODRIGUES *et al*, 2022). Os resultados de mutação completa no gene *FMRI* [(CGG)>200] para esta família foi confirmado por análise molecular usando o método baseado no reagente AmplideX[®] *FMRI* PCR (Asuragen), capaz de quantificar alelos com mutação completa, realizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo, o que confirma os resultados encontrados nos meninos com o teste baseado em PCR convencional e multiplex realizado no LGMH.

Figura 5- Eletroferogramas com os perfis dos pacientes do sexo masculino.

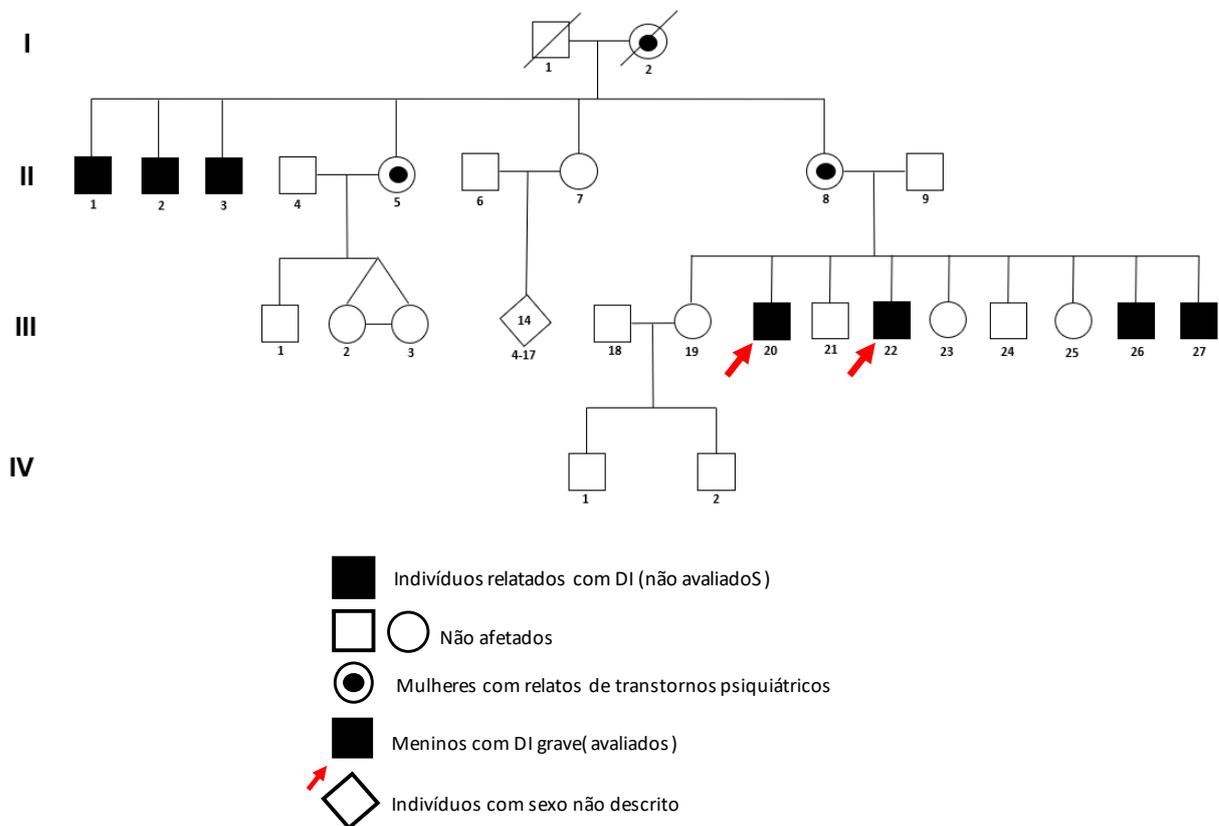


A-B: Paciente normal para X-frágil [(CGG)<55]. C-D: Paciente APAE afetado (IV-6), com mutação completa no gene *FMRI* [(CGG)>200]. E-F: Paciente do SGC/HUPAA, normal para X-frágil [(CGG)<55]. Mix com 3 primers: A, C, E. Mix com dois primers: B, D, F.

5.2 Famílias com DI e indicação para teste genético da SXF

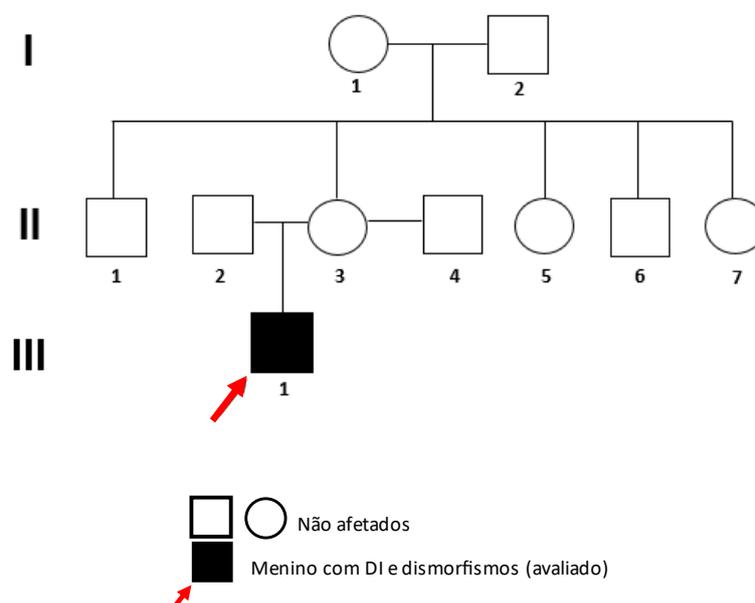
Com relação aos pacientes do sexo masculino de outras duas famílias (Figuras 6 e 7), com história familiar positiva e/ou indicação para o teste, que passaram pela triagem, todos apresentaram amplificação da banda de expansão da trinca CGG no intervalo de até 600 pb, o que infere que nenhum desses indivíduos seja portador da SXF (Quadro 2). Além disso, todas as reações, com dois e três primers, mostraram concordância nos resultados, com amplificação da região de controle interno na PCR multiplex e com picos com os mesmos tamanhos moleculares na comparação das duas reações para cada paciente, especificamente. O mesmo foi observado nos pacientes do SGC do HUPAA, que foram indicados ao teste por médica geneticista para descartar o diagnóstico de SXF, estes apresentando DI e dismorfismos moderados (Quadro 2: DI01 e DI02). Outros dois pacientes com DI selecionados por busca ativa em município do interior do estado foram triados para descartar mutação no gene *FMRI* e apresentaram resultado normal para a SXF, como esperado, por não apresentarem fenótipo típico da condição em questão, além da DI (Quadro 2: DI03 e DI04).

Figura 6- Genealogia de família com indicação de investigação molecular para a Síndrome do X-frágil.



A família representada pelo heredograma da figura 6 apresenta um padrão típico de herança de condição ligada ao X, devido a prevalência de indivíduos do sexo masculino acometidos, apresentando DI e/ou dismorfias, em quase todas as gerações, com base no que foi abordado por CRABTREE, 2020. Além disso, é importante destacar que mulheres, muitas vezes, podem apresentar fenótipo atenuado ou até mesmo não apresentar nenhuma manifestação, o que ocorre devido a inativação parcial de um dos cromossomos X, que dá as mulheres um perfil mosaico de expressão de genes nas células (MIGEON, 2020). Entretanto, a presença de mutação completa no gene *FMRI* foi descartada, dessa forma, outra alteração genética de padrão ligada ao X deve ser a causa etiológica da condição observada nesta família, o que possibilita a investigação de outras causas que podem ou não estarem descritas na literatura referente à DI. Para essa família, foi realizado o sequenciamento de exoma completo em um dos pacientes avaliados, os dados estão em fase de análise. Em relação ao indivíduo afetado na família representada pelo heredograma da figura 7, que não possui padrão de herança compatível com SXF, o teste foi indicado por médica neurologista, devido ao paciente apresentar DI moderada associada a dismorfismos. Entretanto, é importante salientar que a investigação da mutação no gene *FMRI* é imprescindível para meninos/homens com diagnóstico clínico de DI, pois, como difundido amplamente na literatura, a SXF é a causa mais comum de DI herdável, com outras características variáveis associadas, mas com alta prevalência em indivíduos do sexo masculino (CIACCIO *et al*, 2017; SITZMANN *et al*, 2017).

Figura 7- Genealogia de família com indicação de neurologista para investigação molecular da Síndrome do X-frágil.



Quadro 2- Pacientes do sexo masculino triados para mutação no gene *FMRI*.

Paciente	Indicação	Resultado
Fig.4 (IV-3)	Síndrome do X-frágil	Positivo
Fig.4 (IV-4)	Síndrome do X-frágil	Positivo
Fig.4 (IV-5)	Síndrome do X-frágil	Positivo
Fig.4 (IV-6)	Síndrome do X-frágil	Positivo
Fig.6 (III-20)	Síndrome do X-frágil	Negativo
Fig.6 (III-22)	Síndrome do X-frágil	Negativo
Fig.7 (III-1)	DI e dismorfias	Negativo
DI01	DI e dismorfias	Negativo
DI02	DI e dismorfias	Negativo
DI03	DI	Negativo
DI04	DI	Negativo

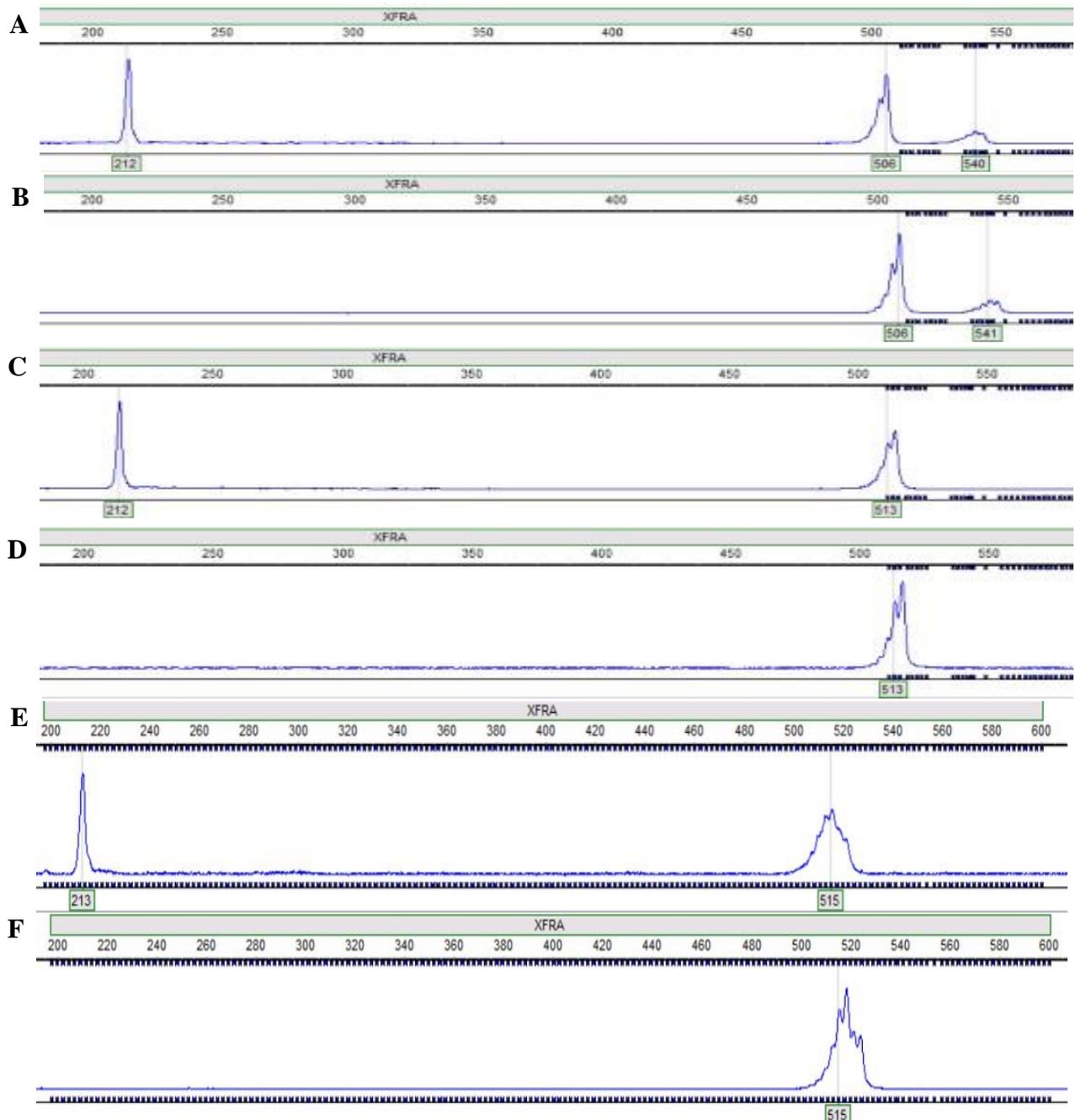
Pacientes com indicação para teste molecular da SXF estão descritos de acordo com a posição no heredograma; pacientes com DI, para confirmação de ausência da mutação no gene *FMRI* estão descritos em códigos.

5.3 Diagnóstico molecular para mulheres

Os resultados das análises em mulheres não demonstram um padrão específico que possibilite o diagnóstico etiológico da condição visto que, como portadoras de dois cromossomos X, mulheres podem apresentar ou não dois picos distintos referentes aos alelos da região de repetição CGG, pois os dois alelos (um materno e outro paterno) podem apresentar o mesmo tamanho molecular ou tamanhos muito similares que se sobrepõem, o que torna possível a visualização de apenas um pico amplificado. Os eletroferogramas de uma mulher controle negativo (sem diagnóstico de SXF) mostraram a amplificação de dois picos na região polimórfica (Figura 8), com os mesmos tamanhos moleculares na comparação das reações com dois e três primers; contudo, duas das mães de meninos investigados apresentaram apenas um pico amplificado nessa zona de repetição CGG (Figura 8), com uma delas possuindo um dos alelos mutados, visto que todos os seus filhos positivaram para a síndrome do X-frágil, e o diagnóstico foi confirmado por teste externo ao LGMH, realizado com outro método já citado; enquanto à outra mulher não se pode inferir a presença ou ausência de alelo mutado, pois mesmo que seu filho tenha apresentado resultado negativo no teste, não se pode identificar qual dos alelos referentes aos cromossomos X foi transmitido ao descendente. Entretanto, o diagnóstico para mulheres é possível se estas forem portadoras de pré-mutação, apresentando um dos picos na região de repetição CGG no intervalo entre 488 e 632 pb e outro pico entre 635 e 1070 pb, mostrando a quantificação de ambos os alelos dos cromossomos X, um normal e outro com expansão de CGG. A identificação de pré-mutação em mulheres é de extrema importância, pois possibilita que mulheres portadoras passem por aconselhamento genético especializado para a discussão de possíveis prognósticos decorrentes da alteração, como a FXPOI e FXTAS, que de

acordo com a literatura são condições associadas à pré-mutação no gene *FMRI*, em mulheres (CABAL-HERRERA *et al*, 2020). Além disso, há a possibilidade de que os alelos com pré-mutação sejam transmitidos com expansão da região de repetição de CGG para a próxima geração, ou seja, pode haver a ocorrência de meninos com SXF ou meninas com mutação completa no gene *FMRI* (SITZMANN *et al*, 2017).

Figura 8- Eletroferogramas com os perfis das pacientes do sexo feminino.



A-B: Paciente normal para X-frágil [(CGG)<55]. C-D: Paciente APAE (Fig. 4 - III-7), com mutação no gene *FMRI*. E-F: Paciente do SGC, normal para X-frágil. Mix com 3 primers (A, C, E); e 2 primers (B, D, F).

6 CONCLUSÃO

Diante das diversas técnicas empregadas para a identificação da mutação no gene *FMRI*, a combinação entre PCR convencional, PCR multiplex e eletroforese capilar demonstrou vantagem em vários quesitos para sua aplicação como forma de triagem do gene no Laboratório de Genética Molecular Humana do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes. Dentre essas vantagens está a disponibilidade de equipamento, como o ABI 3500[®], e reagentes necessários para a realização das reações de PCR de forma adequada. Sobretudo, a aplicação de diferentes técnicas como Southern blot, PCR e eletroforese em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida, e técnicas não moleculares como identificação de anticorpos e ensaios com espectroscopia de massa não são alternativas viáveis no âmbito do LGMH.

Diante disso, pode-se afirmar que a padronização de triagem do gene *FMRI* associado à síndrome do X-frágil foi realizada de maneira satisfatória para indivíduos do sexo masculino, a partir da análise dos eletroferogramas que demonstraram resultados coerentes com o esperado a partir de ajustes feitos nas técnicas de PCR e eletroforese capilar conforme os reagentes e equipamentos específicos disponíveis no LGMH.

No entanto, a investigação molecular a partir da técnica empregada no presente trabalho segue incerta para mulheres com mutação completa; contudo a identificação de portadores de pré-mutação, mulheres ou homens é possível. Além disso, a família investigada, com mãe e filhos confirmados como possuindo mutação completa no gene *FMRI* e que recebeu diagnóstico positivo para SXF, recebeu laudo diagnóstico e passaram por aconselhamento genético especializado; enquanto as que testaram negativo para a condição receberam os laudos e seguem em investigação para outras causas genéticas de deficiência intelectual.

REFERÊNCIAS

- BHAGYA CH, WIJESUNDERA SULOCHANA WS, HEMAMALI NP. Polymerase chain reaction optimization for amplification of Guanine-Cytosine rich templates using buccal cell DNA. **Indian J Hum Genet.** V. 19(1),p. 78-83. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722634/>.
- BRAND BA, BLESSON AE, SMITH-HICKS CL. The Impact of X-Chromosome Inactivation on Phenotypic Expression of X-Linked Neurodevelopmental Disorders. **Brain Sci.** V. 11(7):904. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8305405/>.
- CABALLERO PÉREZ V, LÓPEZ PISÓN FJ, MIRAMAR GALLART MD, GONZÁLEZ ÁLVAREZ A, GARCÍA JIMÉNEZ MC, GARCÍA INÍGUEZ JP, ORDEN RUEDA C, GIL HERNÁNDEZ I, FUERTES RODRIGO C, FERNANDO MARTÍNEZ R, RODRÍGUEZ VALLE A, ALCAINE VILLARROYA MJ. Phenotype in patients with intellectual disability and pathological results in array CGH. **Neurologia.** V. 32(9), p. 568-578. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27157524/>.
- CABAL-HERRERA AM, TASSANAKIJPANICH N, SALCEDO-ARELLANO MJ, HAGERMAN RJ. Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS): Pathophysiology and Clinical Implications. **Int J Mol Sci.** V. 21(12):4391. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7352421/>.
- CRABTREE, J. S. Fundamentals of heredity. *In:* CRABTREE, J. S. Clinical Precision Medicine: A Primer. **Academic Press**, 2020, p. 39-47.
- CAI X, ARIF M, WAN H, KORNREICH R, EDELMANN LJ. Clinical Genetic Testing for Fragile X Syndrome by Polymerase Chain Reaction Amplification and Southern Blot Analyses. **Methods Mol Biol.** V. 1942, p. 11-27. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30900172/>.
- CHEN L, HADD A, SAH S, FILIPOVIC-SADIC S, KROSTING J, SEKINGER E, PAN R, HAGERMAN PJ, STENZEL TT, TASSONE F, LATHAM GJ. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. **J Mol Diagn.** V. 12(5), p. 589-600. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928422/>.
- CHONG SS, EICHLER EE, NELSON DL, HUGHES MR. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. **Am J Med Genet.** V. 51(4), p. 522-6. 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7943034/>.
- CIACCIO C, FONTANA L, MILANI D, TABANO S, MIOZZO M, ESPOSITO S. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. **Ital J Pediatr.** v. 43(1):39. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395755/>.
- CHIURAZZI P, KIANI AK, MIERTUS J, PAOLACCI S, BARATI S, MANARA E, STUPPIA L, GURRIERI F, BERTELLI M. Genetic analysis of intellectual disability and autism. **Acta Biomed.** V. 91(13-S):e2020003. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8023126/>.

CHIURAZZI P, PIROZZI F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. **F1000Res**. V. 5:F1000 Faculty Rev-599. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27127621/>.

DENG PY, KLYACHKO VA. Channelopathies in fragile X syndrome. **Nat Rev Neurosci**. V. 22(5), p. 275-289. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8863066/>.

D'ÁVILA AJCL. Investigação genômica em pacientes com deficiência intelectual ou atraso global do desenvolvimento assistidos na rede pública de saúde do Estado de Goiás. Programa de **Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás**, Goiás, Brasil, 2022.

DUARTE RCB. Intellectual disabilities in children. Residência Pediátrica, Sociedade Brasileira de Pediatria. V. 8(supl 1), p. 17-25. 2018. Disponível em: <http://residenciapediatrica.com.br/detalhes/337/deficiencia%20intelectual%20na%20crianca>.

EL FATIMY R, TREMBLAY S, DURY AY, SOLOMON S, DE KONINCK P, SCHRADER JW, KHANDJIAN EW. Fragile X mental retardation protein interacts with the RNA-binding protein Caprin1 in neuronal RiboNucleoProtein complexes [corrected]. **PLoS One**. V. 7(6):e39338. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380850/>.

GRASSO M, BOON EM, FILIPOVIC-SADIC S, VAN BUNDEREN PA, GENNARO E, CAO R, LATHAM GJ, HADD AG, COVIELLO DA. A novel methylation PCR that offers standardized determination of *FMR1* methylation and CGG repeat length without southern blot analysis. **J Mol Diagn**. V. 16(1), p. 23-31. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873488/>.

HADDAD LA, MINGRONI-NETTO RC, VIANNA-MORGANTE AM, PENA SDJ. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Hum Genet**, 97:808-812, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8641701/>.

HAGERMAN RJ, BERRY-KRAVIS E, HAZLETT HC, BAILEY DB JR, MOINE H, KOOY RF, TASSONE F, GANTOIS I, SONENBERG N, MANDEL JL, HAGERMAN PJ. Fragile X syndrome. **Nat Rev Dis Primers**. V. 3:17065. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28960184/>.

HAN J Y, JANG JH, PARK J, LEE IG. Targeted Next-Generation Sequencing of Korean Patients With Developmental Delay and/or Intellectual Disability. **Front Pediat**. V. 6(391), 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30631761/>.

HARDJASA A, LING M, MA K, YU H. Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. **JEMI**. V. 14, p. 161-164. 2010. Disponível em: https://microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/14/JEMI14_161-164.pdf.

JOSHI M DESHPANDE JD. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **Int. J. Biomed**. V. 2, n. 1, p. 81-97, 2010. Disponível em: https://scholar.google.com.br/scholar?q=pcr+MOHINI+%26+DESHPANDE,+2010&hl=pt-BR&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart.

KENNY PJ, ZHOU H, KIM M, SKARIAH G, KHETANI RS, DRNEVICH J, ARCILA ML, KOSIK KS, CEMAN S. MOV10 and FMRP regulate AGO2 association with microRNA recognition elements. **Cell Rep.** V. 9(5), p. 1729-1741. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4268400/>.

KRAAN CM, GODLER DE, AMOR DJ. Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders. **Dev Med Child Neurol.** V. 61(2), p. 121-127. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dmcn.13985>.

KUMARI D, USDIN K. Molecular analysis of *FMR1* alleles for fragile X syndrome diagnosis and patient stratification. **Expert Rev Mol Diagn.** V. 20(4), p. 363-365. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7079815/>.

LANNOM MC, NIELSEN J, NAWAZ A, SHILIKBAY T, CEMAN S. FMRP and MOV10 regulate Dicer1 expression and dendrite development. **PLoS One.** V. 16(11):e0260005. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8631628/>.

LINDER B, PLÖTTNER O, KROISS M, HARTMANN E, LAGGERBAUER B, MEISTER G, KEIDEL E, FISCHER U. Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. **Hum Mol Genet.** V. 17(20), p. 3236-46. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18664458/>.

LIU XS, WU H, KRZISCH M, WU X, GRAEF J, MUFFAT J, HNISZ D, LI CH, YUAN B, XU C, LI Y, VERSHKOV D, CACACE A, YOUNG RA, JAENISCH R. Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the *FMR1* Gene. **Cell.** V. 172(5):979-992.e6. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6375087/>.

LYON E, LAVER T, YU P, JAMA M, YOUNG K, ZOCCOLI M, MARLOWE N. A simple, high-throughput assay for Fragile X expanded alleles using triple repeat primed PCR and capillary electrophoresis. **J Mol Diagn.** V. 12(4), p. 505-11. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2893636/>.

MIGEON BR. X-linked diseases: susceptible females. **Genet Med.** V. 22(7), p. 1156-1174. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7332419/>.

MILA M, ALVAREZ-MORA MI, MADRIGAL I, RODRIGUEZ-REVENGA L. Fragile X syndrome: An overview and update of the *FMR1* gene. **Clin Genet.** V. 93(2), p. 197-205. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28617938/>.

MOR-SHAKED H, EIGES R. Reevaluation of *FMR1* Hypermethylation Timing in Fragile X Syndrome. **Front Mol Neurosci.** V. 6;11:31. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5808132/>.

OISETH S, JONES L, MAZA E. Fragile X Syndrome. The Lecturio Medical Concept Library. 2022. Disponível em: <https://www.lecturio.com/concepts/>.

OMIM. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. **Johns Hopkins University** Disponível em: <https://www.omim.org/>. Acesso em: 23 nov 2022.

Pesquisa Nacional de Saúde (PNS): 2019: Pessoas com Deficiência e as Desigualdades Sociais no Brasil / **IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento.** - Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

PROTIC DD, AISHWORIYA R, SALCEDO-ARELLANO MJ, TANG SJ, MILISAVLJEVIC J, MITROVIC F, HAGERMAN RJ, BUDIMIROVIC DB. Fragile X Syndrome: From Molecular Aspect to Clinical Treatment. **Int J Mol Sci**. V. 23(4):1935. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8875233/>.

PROTIC D, SALCEDO-ARELLANO MJ, DY JB, POTTER LA, HAGERMAN RJ. New Targeted Treatments for Fragile X Syndrome. **Curr Pediatr Rev**. V. 15(4), p. 251-258. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6930353/>.

RAJAN-BABU IS, CHONG SS. Triplet-Repeat Primed PCR and Capillary Electrophoresis for Characterizing the Fragile X Mental Retardation 1 CGG Repeat Hyperexpansions. **Methods Mol Biol**. V. 1972, p. 199-210. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30847793/>.

RAMOS C, OCAMPOS M, BARBATO IT, GRAÇA BICALHO MD, NISIHARA R. Molecular analysis of *FMR1* gene in a population in Southern Brazil: Comparison of four methods. **Pract Lab Med**. V. 21:e00162. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7225725/>.

RODRIGUES B, GONÇALVES A, SOUSA V, MAIA N, MARQUES I, VALE-FERNANDES E, SANTOS R, NOGUEIRA AJA, JORGE P. Use of the *FMR1* Gene Methylation Status to Assess the X-Chromosome Inactivation Pattern: A Stepwise Analysis. **Genes (Basel)**. V. 13(3):419. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8951761/>.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbour Press**, New York. 1989.

SITZMANN AF, HAGELSTROM RT, TASSONE F, HAGERMAN RJ, BUTLER MG. Rare *FMR1* gene mutations causing fragile X syndrome: A review. **Am J Med Genet A**. v. 176(1), p. 11-18. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697153/>.

TAHA MS, HAGHIGHI F, STEFANSKI A, NAKHAEI-RAD S, KAZEMEIN JASEMI NS, AL KABBANI MA, GÖRG B, FUJII M, LANG PA, HÄUSSINGER D, PIEKORZ RP, STÜHLER K, AHMADIAN MR. Novel FMRP interaction networks linked to cellular stress. **FEBS J**. v. 288(3), p. 837-860. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32525608/>.

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**. V. 10(1), p. 43-9. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2175542/>.

TOPPER S, OBER C, DAS S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. **Clin. Genet.**, v. 80(2), p. 117-26, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21627642/>.