



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE PRÓ-CENTRO-OESTE

AVANÇOS TECNOLÓGICOS E VARIABILIDADE GENÉTICA DA
EXPANSÃO DE TRINUCLEOTÍDEOS NA REGIÃO PROMOTORA
DO GENE FMR1

Marc Alexandre Duarte Gigonzac

GOIÂNIA
GOIÁS – BRASIL
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

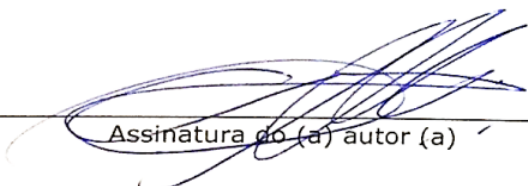
Nome completo do autor: Marc Alexandre Duarte Gigonzac

Título do trabalho: Avanços tecnológicos e variabilidade genética da expansão de trinucleotídeos na região promotora do gene FMR1

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 07/12/2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

MARC ALEXANDRE DUARTE GIGONZAC

**AVANÇOS TECNOLÓGICOS E VARIABILIDADE GENÉTICA DA
EXPANSÃO DE TRINUCLEOTÍDEOS NA REGIÃO PROMOTORA
DO GENE FMR1**

Orientador:

Prof. Aparecido Divino da Cruz, PhD

Co-orientador:

Prof. Rinaldo Wellerson Pereira, PhD

Tese apresentada à Universidade Federal de Goiás como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Goiânia
Goiás – Brasil
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Duarte gizonzac, Marc Alexandre

Avanços tecnológicos e variabilidade genética da expansão de trinucleotídeos na região promotora do gene FMR1 [manuscrito] / Marc Alexandre Duarte gizonzac. - 2016.
LXX, 70 f.: il.

Orientador: Prof. Aparecido Divino da Cruz; co-orientador Rinaldo Wellerson Pereira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. FMR1 . 2. Expansões trinucleotídicas. 3. Metilacao . 4. Diagnóstico molecular. I. Divino da Cruz, Aparecido, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362
email: pgbb.goias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE MARC ALEXANDRE DUARTE GIGONZAC - Aos dois dias do mês de dezembro do ano de 2016 (02/12/2016), às 08:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. Aparecido Divino da Cruz (PUC-Goiás Orientador), Angela Adamski da Silva Reis (UFG), Flávio Monteiro Ayres (UEG), Kátia Karina Verolli de Oliveira (PUC-Goiás) e Cláudio Carlos da Silva (PUC), para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Auditório da Reitoria da PUC-GO, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "INVESTIGAÇÃO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL: AVANÇOS BIOTECNOLÓGICOS E DIVERSIDADE GENÉTICA", em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, de autoria de **MARC ALEXANDRE DUARTE GIGONZAC**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador do discente, Prof. Dr. APARECIDO DIVINO DA CRUZ, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Aprovado / Reprovado

APROVADO

Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis

APROVADO

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres

APROVADO

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira

APROVADO

Profa. Dr. Cláudio Carlos da Silva

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADO (Habilitado ou não **Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**, na área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11h10min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, ZHARA HELOU RIBEIRO DE CASTILHO, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

AVANÇOS TECNOLÓGICOS E VIABILIDADE GENÉTICA DA EXPANSÃO DE TRINUCLEOTÍDIOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE TMRI

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira

Profa. Dr. Cláudio Carlos da Silva

[Assinaturas]

Vencer a si próprio é a maior das vitórias.

Platão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

A minha esposa Thaís Cidália Vieira Gigonzac, exemplo de mulher, mãe, companheira e profissional, presente que a vida me destinou, pelo imenso incentivo em todas as etapas da minha vida, desde a decisão de iniciar o doutorado até os últimos minutos de sua finalização, sempre com amor e carinho;

Aos meus lindos filhos, Luana Vitória Vieira Gigonzac e Philippe Vieira Gigonzac, por todo amor, carinho e momentos de alegria;

A minha mãe, Maria Lúcia Reis Duarte Gigonzac, fonte de vida e amor incondicional, meu pai, Philippe Gigonzac, pelo afeto e apoio, e aos meus irmãos, Barbara Marcelle Duarte Gigonzac e Jean Louis Duarte Gigonzac, exemplos de fraternidade, paciência e carinho;

Agradeço em especial ao meu orientador Aparecido Divino da Cruz, professor Peixoto, pela confiança, por ter acreditado no meu trabalho e pelo exemplo máximo de dedicação, responsabilidade, respeito, amizade e compreensão;

As instituições fomentadoras deste estudo, Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (SES-GO), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás);

A Universidade Estadual de Goiás (UEG) e Faculdade Estácio de Sá pelo incentivo à minha qualificação e aprimoramento;

Aos colegas do LAGENE/LACEN e Núcleo de pesquisas REPLICON, sobretudo Dra. Bárbara Helou, Dr. Marcos Milki, Dr. Aparecido Divino da Cruz, Dra. Thaís Cidália V. Gigonzac, Dr. Cláudio Carlos da Silva, Dra. Lysa Bernardes Minasí e Lílian Souza Teodoropelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa;

A Rede Pró Centro -Oeste e Universidade Federal de Goiás (UFG) pela colaboração, incentivo e estruturação deste programa de Pós-Graduação;

A todos os amigos e colegas que incentivaram e torceram pelo sucesso deste trabalho, meu eterno agradecimento e afeto;

Agradeço ainda infinitamente a todas as famílias que participaram deste projeto.

A todos e tantos outros, meu MUITO OBRIGADO e eterna consideração.

ÍNDICE

Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
Lista de siglas e abreviaturas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. A SÍNDROME DO X-FRÁGIL	03
2.1.1. Histórico	03
2.1.2. Aspectos Moleculares	04
2.1.2.1. <i>FMRI</i> e Variabilidade Genética das repetições CGG	05
2.1.3. Aspectos Clínicos	07
2.1.3.1. Alterações fenotípicas	08
2.1.4. Detecção das Expansões CGG no <i>FMRI</i>	09
3. OBJETIVOS	11
3.1. GERAL	11
3.2. ESPECÍFICOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	12
4.2. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	12
4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	12
4.4. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>FMRI</i>	13
4.5. AVALIAÇÃO DO GRAU DE METILAÇÃO	14
4.6. ELETROFORESE CAPILAR	15
4.6. GENOTIPAGEM	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	17
5.2. AMPLIFICAÇÃO DO <i>FMRI</i>	17
5.3. ELETROFORESE CAPILAR	19
5.4. DETERMINAÇÃO DAS EXPANSÕES TRINUCLEOTÍDICAS	20
5.5. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE METILAÇÃO	22
5.6. EXPANSÕES TRINUCLEOTÍDICAS E TEA	24
5.6.1. Avaliação dos pacientes pela CARS	24
5.6.2. Avaliação dos pacientes pela ADI-R	26
6. CONCLUSÕES	29
7. BIBLIOGRAFIAS	30
8. APÊNDICES	37
8.1. APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	38
8.2. APÊNDICE II – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	43
A. Artigo publicado	44
B. Artigo para submissão	48
9. ANEXOS.....	54
9.1. ANEXO I – CARS	54
9.2. ANEXO II - AUTORIZAÇÃO PARA USO DA ADI-R	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metáfase evidenciando um sítio frágil no cromossomo X	03
Figura 2.	Diagrama do cromossomo X, destacando a localização do gene <i>FMRI</i> e a sua estrutura com a região promotora, éxons e íntrons do referido gene	04
Figura 3.	Estrutura tridimensional da proteína FMRP destacando os sítios de ligação RGG e KH	05
Figura 4.	Relação entre tamanho das faixas de repetições CGG em normal, pré mutado e mutação completa e a respectiva produção de RNAm e FMRP..	06
Figura 5.	Aspecto facial de paciente com a SXF, destacando queixo proeminente, face alongada e orelha antevertidas	08
Figura 6.	Sobreposição de fenótipos entre SXF e TEA como atraso na fala, estereotípias e ansiedade, destacando ainda fenótipos que não se sobrepõem	09
Figura 7.	Esquema de ligação do <i>triplet de primers</i>	13
Figura 8.	Frequência das idades dos 34 pacientes encaminhados pelo SUS	17
Figura 9.	Eletroferograma do controle de qualidade apresentando os cinco alelos.....	19
Figura 10.	Proporção de mutação completa, pré-mutação e normais	20
Figura 11.	Eletroferograma de paciente do sexo masculino apresentando um alelo com mutação completa com 977pb (249 repetições)	20
Figura 12.	Eletroferograma de paciente do sexo feminino com dois fragmentos, sendo um normal e outro com mutação completa, de 317 e 1089pb .	21
Figura 13.	Eletroferograma de paciente do sexo masculino apresentando um alelo pré-mutado de 632pb	21
Figura 14.	Eletroferograma de paciente do sexo masculino apresentando um alelo normal de 317pb	21
Figura 15.	Eletroferograma de paciente do sexo feminino com fragmentos normais de 302/317pb	21
Figura 16.	Distribuição dos alelos encontrados destacando os alelos 28, 29 e 30 como os mais frequentes	22
Figura 17.	Eletroferograma de paciente com mutação completa revelando uma diferença entre os sinais FAM e HEX, indicando um alto grau de metilação	23
Figura 18.	Eletroferograma de paciente com alelo normal apresentando uma elevada digestão do alelo FAM, revelando uma baixa metilação	23
Figura 19.	Distribuição dos genótipos e grau de metilação dos alelos dos 34 pacientes analisados, indicando metilação variando de 0 a 100%	23
Figura 20.	Frequência dos fenótipos observados de acordo com a CARS	24
Figura 21.	Padrão de agrupamento entre escore da CARS e tamanho alelos	25
Figura 22.	Relação entre escore da ADI-R e genótipos, sendo: (A) Anormalidades qualitativas na interação social recíproca, (B) anormalidades qualitativas na comunicação, (C) padrões restritos, repetitivos e estereotipados e (D) anormalidades do desenvolvimento	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos de acordo com as faixas de repetições CGG.....	06
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados	13
Tabela 3. Reagentes utilizados na mPCR	14
Tabela 4. Reagentes utilizados na amplificação da região promotora do <i>FMRI</i>	18
Tabela 5. Condições de Termociclagem para amplificação da região promotora do <i>FMRI</i>	18
Tabela 6. Alelos observados e esperados para o controle de qualidade	19
Tabela 7. Relação entre genótipos do <i>FMRI</i> e fenótipos do TEA	24
Tabela 8. Comparação dos pacientes para escores da CARS e ADI-R, indicando uma concordância entre as duas ferramentas	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADI-R – Entrevista Diagnóstica para Autismo – Revisada

C – Citosina

CARS - Escala de Avaliação de Autismo na Infância

CID – Classificação Internacional de Doenças

CMA - Análise Cromossômica por Microarray

DI - Deficiência Intelectual

DNA – Acido Desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

FMR1 – Gene do Retardo Mental Ligado ao X-Frágil 1

FMRP – Proteína do *FMR1*

FOP - Falha Ovariana Precoce

FRAXA – Sítio Frágil A do *FMR1*

FXTAS - Síndrome do Tremor/Ataxia Ligada ao X frágil

G - Guanina

GABA - ácido gama-aminobutírico

MECP2 – Gene da Proteína 2 de Ligação a Metil-CpG

mL - Mililitro

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

PB – Pares de Bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido Ribonucléico

SXF - Síndrome do X-frágil

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEA – Transtorno do Espectro do Autismo

TP – *Triplet Primed*

WPS - Western Serviços de Psicologia

RESUMO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a principal causa de deficiência intelectual herdável no mundo e a segunda de etiologia genética, com uma prevalência estimada de 1/4000 homens e 1/8000 mulheres. O mecanismo molecular mais comum na SXF é decorrente de alterações na expressão do gene *FMR1*, localizado em Xq27.3, devido a expansões trinucleotídicas CGG na região promotora e subsequente metilação do gene. Apesar de apresentar achados clínicos consistentes, os mesmos não são exclusivos, e a existência de portadores de alteração no gene *FMR1* sem manifestações clínicas aparentes impossibilitam o diagnóstico da SXF baseado apenas no exame físico. No presente estudo foi desenvolvido uma proposta metodológica para o diagnóstico molecular da Síndrome do X-Frágil a partir da amplificação tripla metilação-específica da região promotora do gene *FMR1* combinada a eletroforese em capilar. Foram utilizados 34 pacientes com indicação clínica de SXF encaminhados para um laboratório da rede pública de saúde. Após extração e quantificação do DNA, as amostras foram amplificadas em protocolo otimizado e os produtos submetidos a eletroforese em capilar de 36cm para verificar a quantidade de repetições CGG e o grau de metilação do DNA de cada amostra. Foram detectadas uma pré-mutação (3%) e seis mutações completas (18%), sendo que todas estas últimas revelaram um alto grau de metilação. Considerando os sinais clínicos comumente apresentados, os pacientes foram também analisados para a ocorrência do Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), que sombreia e se sobrepõe à SXF, verificando que 100% dos indivíduos com mutação completa apresentaram o fenótipo. Foi possível observar pequenas diferenças comportamentais nos pacientes analisados, indicando um quadro clínico mais leve quanto aos aspectos da interação social e das estereotipias. Sendo assim, a nova proposta metodológica permite determinar de forma eficaz as expansões trinucleotídicas CGG no *FMR1* permitindo um diagnóstico assertivo da SXF para as famílias de pacientes atendidos na rede pública de saúde em Goiás.

PALAVRAS-CHAVE: *FMR1*, Expansões trinucleotídicas, Metilação, Diagnóstico Molecular

ABSTRACT

X-Fragile Syndrome (FXS) is the leading cause of inherited intellectual disability in the world and the second of genetic etiology, with an estimated prevalence of 1/4000 men and 1/8000 women. The most common molecular mechanism in SXF is due to changes in the expression of the FMR1 gene, located in Xq27.3, due to CGG trinucleotide expansions in the promoter region and subsequent methylation of the gene. In spite of presenting consistent clinical findings, they are not exclusive, and the existence of carriers of alteration in the FMR1 gene without apparent clinical manifestations makes it impossible to diagnose SXF based only on the evaluation. In the present study, a methodological proposal for the molecular diagnosis of X-Fragile Syndrome was developed from the methylation-specific triple amplification of the promoter region of the FMR1 gene combined with capillary electrophoresis. Thirty-four patients with clinical indication of SXF were referred to a laboratory of the public health network. After extraction and quantification of the DNA, the samples were amplified in an optimized protocol and the products submitted to 36cm capillary electrophoresis to verify the amount of CGG repeats and the degree of DNA methylation of each sample. Pre-mutation (3%) and six complete mutations (18%) were detected, all of which revealed a high degree of methylation. Considering the clinical signs commonly presented, the patients were also analyzed for the occurrence of Autism Spectrum Disorder (ASD), which shadowing and overlapping the SXF, verifying that 100% of the individuals with complete mutation presented the phenotype. Thus, it was possible to observe small behavioral differences in the patients analyzed, indicating a lighter clinical picture regarding aspects of social interaction and stereotypies. Thus, the new methodological proposal allows to effectively determine the CGG trinucleotide expansions in FMR1 allowing an assertive diagnosis of SXF for the families of patients attended in the public health network in Goiás.

KEYWORDS: *FMR1*, Trinucleotide Expansions, Methylation, Molecular Diagnostics.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversas pesquisas possibilitaram avanços consideráveis na área do diagnóstico molecular de doenças genéticas. No entanto, há um descompasso entre a possibilidade diagnóstica e a disponibilidade para o cidadão (Luz *et al.*, 2015). Condições geneticamente determinadas acometem milhões de famílias no mundo, sendo que uma em cada 20 gestações envolve o nascimento de uma criança com algum tipo de anomalia congênita, deficiência ou doença genética que comprometerá seu desenvolvimento e qualidade de vida (Meira & Acosta, 2009). Na maioria dos países em desenvolvimento, onde vive mais de 80% da população mundial e onde a maior parte das crianças nascerá, são muitos os obstáculos ao progresso e à aplicação da tecnologia genética na prática médica (Vieira & Favoreto, 2016).

Entre as condições genéticas, destaca-se a Síndrome do X-Frágil (SXF), por ser a causa mais comum de Deficiência Intelectual (DI) herdável em todas as populações humanas e a segunda de etiologia genética, com uma incidência estimada de 1/4000 homens e 1/8000 mulheres (Amancio *et al.*, 2015; Stembalska *et al.*, 2016). Esta é considerada como a doença de maior importância epidemiológica entre homens com deficiência intelectual no Brasil, mas ainda não se dispõe de dados epidemiológicos confiáveis em relação à distribuição desta e de várias outras doenças genéticas, apesar da aparente melhoria dos indicadores nacionais de saúde nas últimas décadas (Pinto *et al.*, 2014). Neste contexto, o diagnóstico para doenças genéticas como a SXF representa um desafio médico complexo para a comunidade científica, não podendo ser interpretado simplesmente com resultados positivos ou negativos (Marshall *et al.*, 2008; Bellavance, 2016).

O desenvolvimento e aperfeiçoamento das ferramentas biotecnológicas têm permitido avanços consideráveis no campo da genética clínica para a identificação das alterações envolvidos neste transtorno, superando as limitações do cariótipo convencional (Yiping *et al.* 2010; Kong *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2016). Por outro lado, as relações existentes entre genótipo e fenótipo ainda apresentam incógnitas, tanto na determinação de um diagnóstico efetivo como no estabelecimento de um real prognóstico (Niort & Hernandez-Vasquez, 2016).

Assim, estudos que permeiam investigar as correlações entre genótipo e fenótipo na SXF se fazem fundamentais para melhor compreensão da síndrome, para a devida

orientação das famílias e na sistemática do aconselhamento genético (Wang *et al.*, 2010; McCary & Roberts, 2013; Lozano *et al.*, 2015).

Apesar do conhecimento sobre as origens e efeitos do X-Frágil evoluírem, proporcionando novos desafios científicos e novas formas de compreensão da doença, no Brasil, esta doença tem sido subdiagnosticada. Este fato ocorre principalmente porque as características de Autismo que estas crianças podem apresentar levantam enormes dificuldades aos pais e aos profissionais dos diferentes domínios, que continuam a lidar diariamente com os desafios da aprendizagem e do comportamento da criança com a SXF, que sem diagnóstico confirmado, não alcança terapia efetiva e evolução considerável do quadro clínico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A SÍNDROME DO X-FRÁGIL

2.1.1. HISTÓRICO

A condição clínica atualmente conhecida como Síndrome do X-Frágil (SXF) foi descrita pela primeira vez em 1943 por James P. Martin & Julia Bell no artigo “*A pedigree of mental defect showing sex-linkage*”, caracterizando 6 gerações de uma família com homens portadores de Deficiência Intelectual (DI), sendo então denominada de síndrome de Martin & Bell (Bagni *et al.*, 2012). Somente em 1969, Hebert Lubs conseguiu associar esta condição de DI hereditária com a observação citogenética de uma constrição secundária (sítio frágil) no braço longo do cromossomo X (Figura 1), levando ao estabelecimento do nome Síndrome do X-Frágil na década de 70 pelo pesquisador Grant Sutherland (Andrade, 2012).

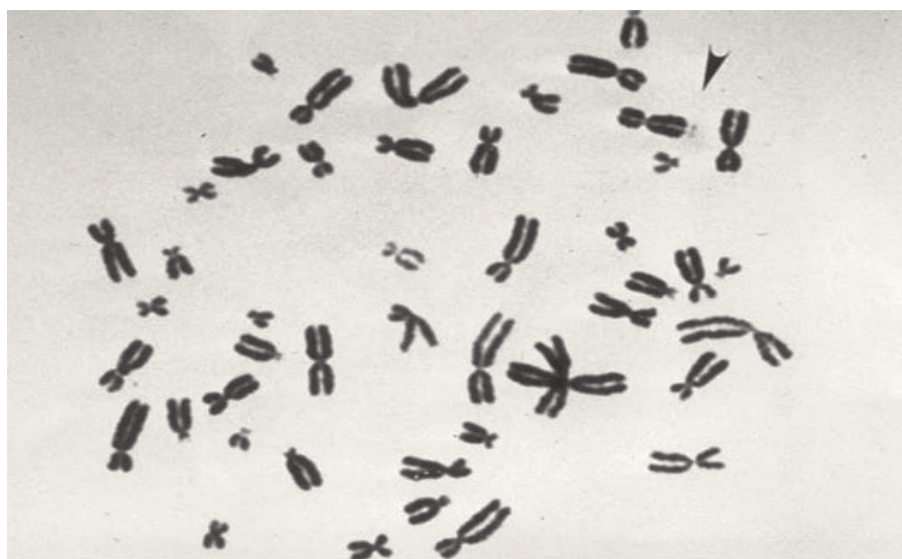


Figura 1 - Metáfase evidenciando um sítio frágil no cromossomo X (Simmons, 2008 - modificado)

Com o avanço das técnicas moleculares, o gene foi caracterizado por Verkerk *et al.* (1991), sendo definida a sua localização em Xq27.3 e denominado de *FMRI* (*Fragile Mental Retardation 1*). Poucos anos depois, Greenough *et al.* (1997) descreveram a proteína FMRP, produto do *FMRI*, indicando sua possível participação na maturação sináptica.

Recentemente, novas pesquisas relataram que esta proteína desempenha atividade em funções tais como o trânsito nuclear-citoplasmático de RNAs, controle de tradução, transporte de RNAs nos dendritos, tradução e regulação dendrito-específica. Porém o real papel desempenhado na célula por esta proteína ainda está longe de ser totalmente esclarecido (Ouwenga & Dougherty, 2015; Majumber *et al.*, 2016).

2.1.2. ASPECTOS MOLECULARES

A SXF é causada por alterações genéticas na expressão do *FMRI*, que é caracterizado por ser um gene altamente conservado em mamíferos, formado por 17 éxons distribuídos em aproximadamente 39 Kb, e apresenta uma região repetitiva de trinucleotídeos CGG na região não traduzida 5' (Yudkin *et al.*, 2015) (Figura 2).

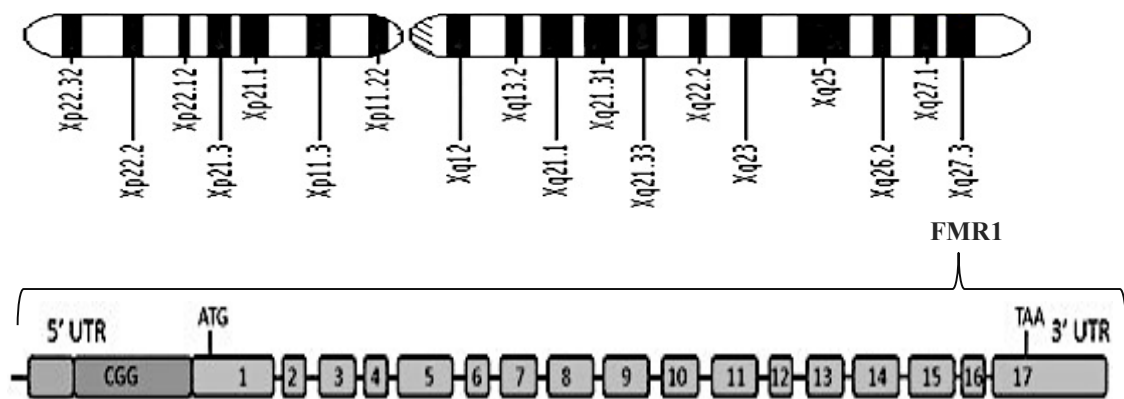


Figura 2 – Diagrama do cromossomo X, destacando a localização do gene *FMRI* e a sua estrutura com a região promotora, éxons e íntrons do referido gene.

O transcrito primário principal do *FMRI* tem 4,4 Kb, mas codifica para diferentes RNAs através de *splicing* alternativo, com expressão em diversos tecidos como cérebro, testículos e epitélio. Ainda muito pouco se pode inferir sobre os reais impactos do gene *FMRI* como um todo, mas é possível que este influencie ou module indiretamente a expressão de pelo menos uma centena de genes distintos (Brasa *et al.*, 2016).

A proteína FMRP, principal produto gênico do *FMRI*, participa diretamente da sinalização celular de proteínas envolvidas na formação dendrítica e plasticidade neuronal. Desde sua descoberta, é consenso que a perda de produção da FMRP é a responsável direta pelas manifestações patológicas da SXF (Hagerman *et al.*, 2008; Abbeduto *et al.*, 2014).

A estrutura cristalina de 2,8Å desta proteína de 58Kd apresenta sítios de ligação, como o *KH* e um motivo rico em arginina-glicina (*box RGG*) que possibilitam interações específicas com quadruplexos de guanina (G) e RNAm (Vasilyev *et al.*, 2015) (Figura 3).

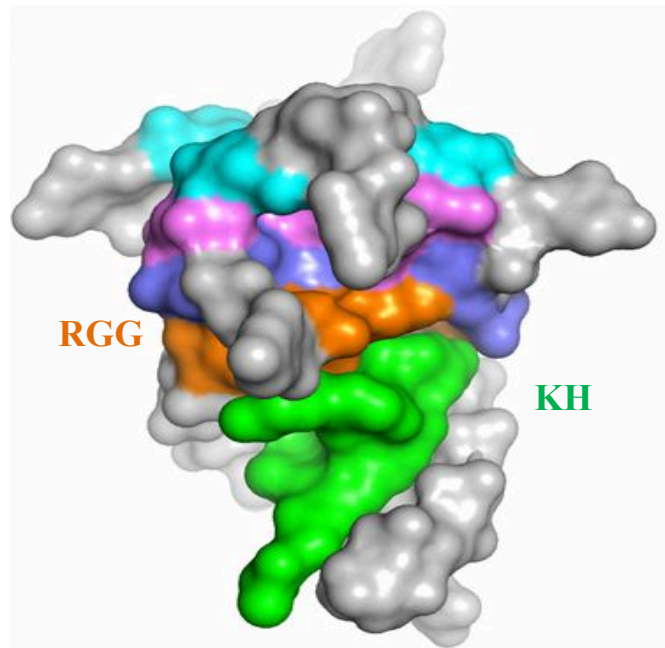


Figura 3: Estrutura tridimensional da proteína FMRP destacando os sítios de ligação RGG e KH (adaptado de Vasilyev *et al.*, 2015)

2.1.2.1. *FMRI* E VARIABILIDADE GENÉTICA DAS REPETIÇÕES CGG

A quantidade de repetições trinucleotídicas CGG observadas na região promotora do *FMRI* é bastante polimórfica na população mundial. Diferentes modelos tentam explicar a origem destas expansões, geralmente através de *slipage* (erro da polimerase no processo de replicação) ou por *crossing-over* desigual (Luo, 2015). Segundo Pretto e colaboradores (2014), quanto maior for a quantidade de repetições CGG, mais instável será a região, aumentando a incidência de erros e ocasionando inclusive o surgimento de mosaicismos celulares.

Em meados da década de 90, Eichler e colaboradores identificaram sequências AGG intercaladas às repetições CGG e sugeriram que estas poderiam levar a uma maior estabilidade do *FMRI*, reduzindo o risco de expansões futuras (Nolin *et al.*, 2014). Latham *et al.* (2014) relataram que mais de 90% dos indivíduos com genótipo normal apresentam uma a duas interrupções AGG e que a falta destas aumentaria em até 10 vezes o risco de expansões futuras para faixa de pré-mutação e mutação completa.

A problemática envolvida no aumento das repetições CGG está no fato de ser a causa primária da inativação do *FMRI* e desenvolvimento da SXF. Por convenção, indivíduos considerados não afetados pela SXF têm até 44 repetições CGG, enquanto os portadores de mutação completa apresentam mais de 200 repetições. Existe ainda a pré-mutação, com 55 a 200 repetições, além de uma zona cinza ou intermediária (*Grey Zone*), com 45 a 54 repetições (Eichler *et al.*, 1994; Hantash *et al.*, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1 – Determinação de genótipos de acordo com as faixas de repetições CGG

GENÓTIPO	FAIXA DE REPETIÇÕES CGG ¹
Normal	0 – 44
Intermediário (<i>Grey Zone</i>)	45 – 54
Pré-Mutação	55 – 200
Mutação Completa	> 200

¹: faixa de repetições medida em número de trincas CGG

Nas mutações completas, a grande extensão de repetições CGG leva tipicamente a um processo de metilação do gene, induzindo ao silenciamento da transcrição e inativação do *FMRI*. Nestas condições, o fenômeno epigenético resulta na diminuição ou ausência completa da proteína FMRP e surgimento do fenótipo associado à SXF (Figura 4) (Brasa *et al.*, 2016).

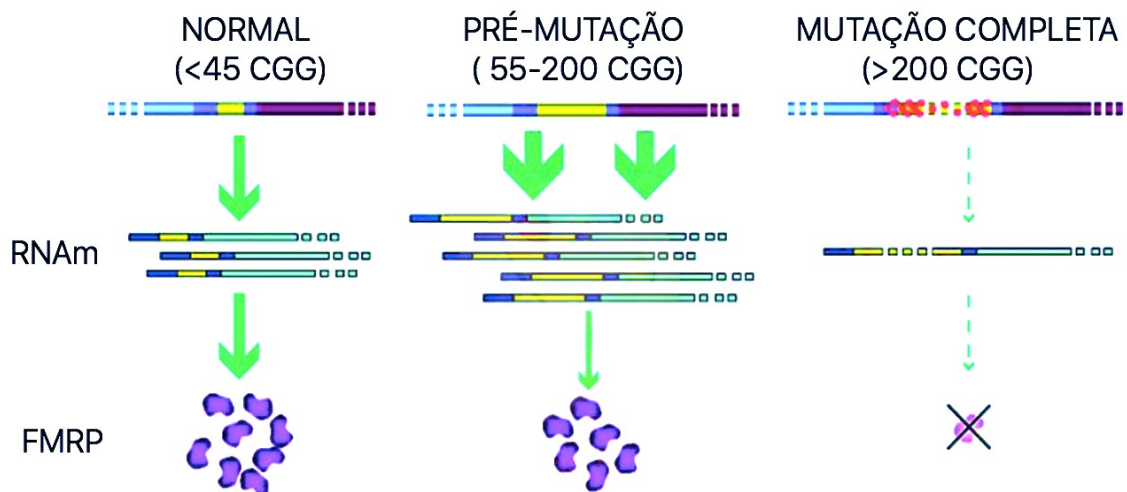


Figura 4 - Relação entre tamanho das faixas de repetições CGG em normal, pré-mutado e mutação completa e a respectiva produção de RNAm e FMRP (adaptado de Berman *et al.*, 2014)

Por outro lado, os portadores de pré-mutações normalmente não apresentam alterações significativas dos níveis da FMRP, apesar de alguns autores relatarem uma leve diminuição desta proteína. A problemática estaria no aumento considerável da concentração de RNAm, levando a uma ação “tóxica” destes RNAs e surgimento de outras condições clínicas associadas ao *FMRI* (Figura 4) (Tassone & Hagerman, 2012; Berman *et al.*, 2014; Suhl & Warren, 2015).

De acordo com Jiraanont *et al.* (2016), a metilação do *FMRI* em decorrência das expansões CGG são responsáveis por mais de 98% dos casos da SXF. Apesar da mutação completa representar a causa mais comum da SXF, esta síndrome também pode ser causada por outros mecanismos que também levam à perda da produção da FMRP (Luo *et al.*, 2015). Em torno de 1% dos casos da SXF, são reportados outros mecanismos, como a deleção completa do gene, mutações pontuais e rearranjos cromossômicos (Myrick *et al.*, 2014).

2.1.3. ASPECTOS CLÍNICOS

A SXF é a primeira doença humana descrita para mutações dinâmicas envolvendo expansões CGG. Por outro lado, até poucas décadas atrás, nenhum significado clínico era impactado para os portadores de pré-mutações, destacando apenas o risco de aumento das expansões CGG para a SXF. Atualmente, as pré-mutações estão relacionadas a duas entidades clínicas distintas: a Síndrome do Tremor e Ataxia ligada ao X-Frágil (FXTAS) e a Falha Ovariana Precoce (FOP) (Lozano *et al.*, 2014).

A FXTAS se inicia após os 40-50 anos e está presente em 50% dos homens portadores de pré-mutação Liu *et al.* (2012) também relatou o fenótipo em indivíduos distribuídos na zona cinza (45 a 54 repetições). Esta síndrome é caracterizada como um distúrbio neurológico progressivo com tremor de intensão e ataxia motora, além de se observarem alterações psiquiátricas como perda de memória, irritabilidade, ansiedade, depressão e apatia (Hagerman & Hagerman, 2008; Christofolini *et al.*, 2009).

No caso da FOP, ocorre uma redução da reserva ovariana associada a um ciclo menstrual irregular, amenorreias repetitivas, infertilidade e alteração hormonal com elevação de FSH (Spath *et al.*, 2011). Aproximadamente 20% das mulheres pré-mutadas apresentam uma insuficiência ovariana antes dos 40 anos (Hagerman & Hagerman, 2008, Alvarez-Mora, 2015).

2.1.3.1. ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DA SXF

Na SXF, a sintomatologia essencial envolve um quadro de Deficiência Intelectual (DI) associado a alterações comportamentais e cognitivas. Segundo Braat *et al.* (2015) e Liu *et al.* (2016), a SXF é bastante heterogênea e de difícil diagnóstico clínico, sendo fundamental o diagnóstico molecular.

Em recém-nascidos, a sintomatologia é mínima, sendo difícil o diagnóstico precoce. Alguns autores destacam casos envolvendo hipotonia e macrocefalia leve. Em crianças, o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor se torna mais evidente, com coordenação motora lenta e atraso na fala mais significativo.

Progressivamente, as alterações fenotípicas podem se tornar mais evidentes, sendo o quadro clínico mais característico apresentando orelhas largas e antevertidas, face triangular, longa e estreita, queixo proeminente, palato alto e curvo, estrabismo, pés planos e, em indivíduos pós-púberes, macroorquidia (Kidd *et al.*, 2014) (Figura 5).

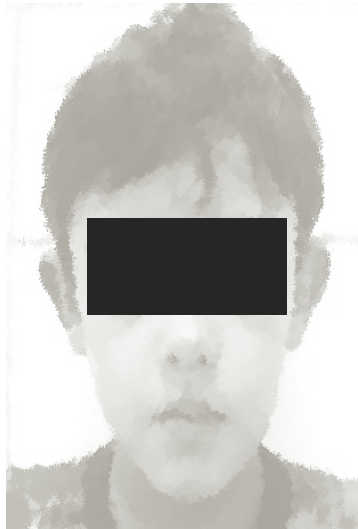


Figura 5. Aspecto facial de paciente com a SXF, destacando queixo proeminente, face alongada e orelha antevertidas

Recentemente, a SXF passou a ser fortemente associada ao Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), que é um distúrbio do desenvolvimento decorrente de alterações em genes que afetam direta ou indiretamente o sistema nervoso, tais como o gene *FMR1* (Wheeler *et al.*, 2015). Segundo Brock & Hattom (2010) e Stepniak *et al.* (2015), em torno de 60% dos homens e 20% das mulheres com mutações completas poderiam apresentar um fenótipo compatível com o TEA. Atualmente, considera-se que o *FMR1* é o gene mais frequentemente associado ao TEA, sendo responsável por 2 a 6%

de todas as crianças diagnosticadas com o transtorno (Li *et al.*, 2016; López-Mourelo *et al.*, 2016).

Segundo Wheeler *et al.* (2015), a SXF seria uma entidade clínica diferente do TEA, mas que compartilha uma série de características (Figura 6). Também, a SXF se apresentaria na forma de um espectro no qual o TEA seria um dos fenótipos possíveis. (Hagerman *et al.*, 2008; Schaefer & Mendelsohn, 2008; Wang *et al.*, 2010; Schaefer *et al.*, 2013; Brasa *et al.*, 2016).

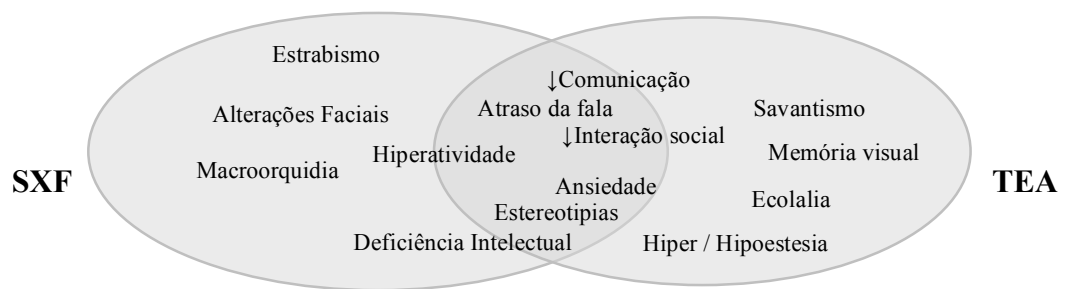


Figura 6 – Sobreposição de fenótipos entre SXF e TEA como atraso na fala, estereotípias e ansiedade, destacando ainda fenótipos que não se sobrepõem - adaptado de Wheeler *et al.* (2015).

Em 2000, Tassone e colaboradores associaram pela primeira vez o autismo com pacientes portadores de pré-mutações. Este achado foi confirmado posteriormente por vários outros grupos (Aziz *et al.*, 2003; Clifford *et al.*, 2007 e Hagerman & Hagerman, 2011), estimando-se que uma pequena parcela de pré-mutados possam apresentar clinicamente o TEA (Bailey *et al.*, 2008; Farzin & Koldewyn, 2014).

2.1.4. DETECÇÃO DAS EXPANSÕES CGG NO *FMRI*

Dentre as formas de avaliação das expansões CGG, destacam-se a análise citogenética, o Southern-blot e a investigação molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Inicialmente o diagnóstico laboratorial só era possível através da citogenética, uma vez que até 1991 não se conhecia o gene causador da SXF. Atualmente é considerada uma técnica relativamente limitada, uma vez que não permite identificar a extensão das repetições CGG e identifica a observação citogenética da mutação completa em uma porção mínima de células (Snow *et al.*, 1993; Tassone, 2015).

O diagnóstico por Southern-blot é ainda utilizado no Brasil e é capaz de identificar pré-mutações e mutações completas. No entanto, a metodologia é relativamente lenta e

dispendiosa em relação à técnica de PCR, além de não conseguir detectar adequadamente mosaicismos celulares e apresentar uma margem de erro de até 50 repetições CGG nas mutações completas, podendo levar a erros de classificação (Chen *et al.*, 2011).

A amplificação da região promotora do gene *FMRI* por PCR é bastante eficaz para alelos dentro da faixa de normalidade, mas limitada em pacientes que apresentam uma quantidade elevada de repetições CGG pela dificuldade da polimerase em conseguir copiar adequadamente toda a região repetitiva. Além disso, regiões metiladas tendem a dificultar a amplificação, inviabilizando a determinação das expansões (Nahhas *et al.*, 2012; Walsh *et al.*, 2013). Entretanto, recentes adequações metodológicas da PCR têm permitido amplificar mutações completas metiladas com mais de 1000 repetições CGG (Printy *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

Os avanços biotecnológicos das técnicas de separação dos fragmentos por eletroforese capilar também são fundamentais para a correta identificação dos alelos, com precisão e reprodutibilidade (Rajan-Babu *et al.*, 2016). Infelizmente, a padronização das reações e a disponibilidade de analisadores genéticos não são uma realidade para a maioria dos laboratórios, dificultando o diagnóstico da SXF (Viveiros, 2013; Niort & Hernandez Vasquez, 2016).

No âmbito do sistema público de saúde do Brasil, onde a maior parte dos casos de DI compatíveis com a SXF são registrados, a situação é bastante delicada. O recente estabelecimento de políticas públicas de atenção às doenças de etiologia genética e as parcerias com instituições de ensino superior dedicadas à pesquisa e extensão, dentro de paradigmas voltados ao bem-estar da população, têm permitido implementar novas técnicas de diagnóstico molecular para a SXF, fundamentais para a orientação genética das famílias.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Propor um método de diagnóstico molecular eficaz para investigar a quantidade de repetições trinucleotídica CGG na região promotora do gene *FMRI* em pacientes com indicação clínica da Síndrome do X-Frágil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a amplificação por *triplet primed* PCR da região promotora do gene *FMRI*;
- Propor um protocolo de eletroforese em capilar de 36cm para ser utilizado em analisador genético;
- Determinar a quantidade de repetições CGG e inferir a faixa genotípica para diagnóstico da SXF nos indivíduos encaminhados pelo serviço público de saúde;
- Avaliar o grau de metilação da região promotora do *FMRI* em indivíduos com expansão das repetições CGG;
- Aplicar a entrevista CARS para verificar a presença do fenótipo do Transtorno do Espectro Autista (TEA) nos pacientes encaminhados e relacionar com os genótipos;
- Verificar alterações comportamentais específicas pela entrevista estruturada ADI-R nos pacientes com TEA em relação aos seus genótipos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Pacientes com deficiência intelectual e indicação clínica da Síndrome do X-Frágil foram encaminhados por médicos da rede pública de saúde (Sistema Único de Saúde - SUS) para diagnóstico molecular do *FMRI*, no período de março de 2015 a setembro de 2016. Após esclarecimentos sobre a pesquisa, os pais ou responsáveis que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice 1). Os procedimentos foram todos desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (LaGene/SES-GO) em parceria com o Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás (NPR/PUC-GO).

4.2. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os pacientes encaminhados foram avaliados quanto à ocorrência de alterações comportamentais compatíveis com o transtorno do espectro autista através de dois questionários estruturados e validados em português aplicados aos pais ou responsáveis: a *CARS (Childhood Autism Rating Scale)*, questionário rápido composto por 15 itens de respostas escalonadas (Anexo 1) e a *ADI-R (Autism Diagnostic Interview – Revised)*, entrevista composta por 93 itens usados para avaliar as áreas comportamentais, sob autorização de uso limitado pela WPS (*Western Psychological Services*), detentora dos direitos autorais, pela licença exclusiva 70084231 (Anexo 2). O escalonamento do quociente de inteligência (QI) não foi avaliado nos pacientes por envolver fortes desvios nos pacientes não verbais (Skinner *et al.*, 2004) e não estar normatizado dentro do grupo heterogêneo estudado (Leiter, 2012; Ke & Liu, 2015)

4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para cada paciente, uma amostra de 5mL de sangue periférico foi coletada com EDTA e o DNA extraído utilizando o conjunto de reagentes comerciais *QIAamp[®]DNA*

Blood Mini Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro *NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences®)* e diluído para uma concentração de 20 ng/μL.

4.4. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *FMRI*

A amplificação da região promotora do gene *FMRI* foi realizada utilizando o conjunto de reagentes comerciais *AmplideX® FMRI PCR (Asuragen, Austin, Texas)*. Os protocolos originais foram todos readequados e padronizados para reduzir a quantidade de DNA do paciente e o volume total da reação de PCR, visando maximizar o quantitativo de reações por kit, mas mantendo a qualidade do produto de amplificação. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) fornecidos que flanqueiam a região promotora do *FMRI* está descrita na tabela 2.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados.

<i>Primer f (forward)</i>	TCA GGC GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC A
<i>Primer r (reverse)</i>	AAG CGC CAT TGG AGC CCC GCA CTT CC

Para viabilizar a amplificação das longas repetições CGG, que são geralmente refratárias à amplificação, foi realizada uma PCR *Triplet-Primed (TP-PCR)*, utilizando neste protocolo, além do par de iniciadores *forward* e *reverse*, um terceiro *primer* que se anela nas próprias repetições CGG para auxiliar na extensão da fita, como ilustrado na figura 7.

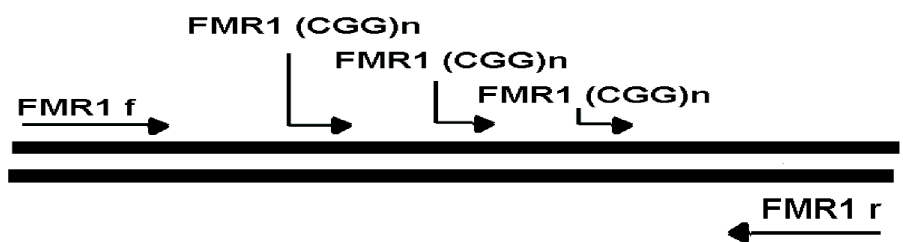


Figura 7 – Esquema de ligação do *triplet* de *primers*.

As amplificações foram realizadas em um termociclador *Veriti® ThermoCycler (Applied Biosystems, Foster City, California)* e todos os ensaios foram realizados juntamente com controle positivo e negativo. Para otimizar a amplificação das regiões altamente repetitivas, as condições de termociclagem foram também ajustadas em relação ao protocolo original.

4.5. AVALIAÇÃO DO GRAU DE METILAÇÃO

As amostras dos pacientes foram todas testadas quanto ao grau de metilação usando o conjunto de reagentes comerciais AmpliX mPCR FMR1 (Asuragen, Austin, Texas). A metodologia é baseada no protocolo de Chen *et al.* (2011) que permite a avaliação comparativa do grau de metilação de acordo com a intensidade de digestão do DNA da amostra teste em relação a um controle com alelo normal, denominada de mPCR.

Assim, para amostra testada, foi necessário separar 2 alíquotas deste DNA (2 μL a 10 ng/ μL cada). Uma das alíquotas foi misturada com 4 μL de enzima de restrição (HpaII) e a outra com 4 μL do controle contendo apenas tampão. Este par de amostras foi incubado simultaneamente a 37°C por duas horas. Após a digestão, os reagentes necessários à PCR foram adicionados separadamente para cada alíquota, diferindo apenas quanto aos *primers* reversos, sendo um marcado com fluorocromo FAM para a amostra digerida (tratada) e outro com o HEX para amostra controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Volume dos reagentes utilizados na mPCR.

REAGENTES	ALÍQUOTA FAM (μL)	ALÍQUOTA HEX (μL)
Tampão	20	20
DNA controle interno	0,4	0,4
<i>Primer forward</i>	1,5	1,5
<i>Primer reverso</i> FAM	1,5	-
<i>Primer reverso</i> HEX	-	1,5
Polimerase rica em CG	0,1	0,1
Água Mili-Q	2,0	2,0
DNA tratado	6,0	-
DNA + tampão	-	6,0
TOTAL	31,5 μL	31,5 μL

Para este protocolo, as condições de termociclagem foram estabelecidas em 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de 97°C por 35 segundos, 62°C por 35 segundos e 72°C por 4 minutos, e um período final de 72°C por 10 minutos.

Para quantificar a metilação, foi realizada uma eletroforese capilar das amostras e em seguida a comparação entre a intensidade dos dois picos (FAM e HEX) no eletroferograma. O cálculo obedeceu à seguinte fórmula:

$$Mi (\%) = \left(\frac{\text{Controle HEX}}{\text{Controle FAM}} \right) \cdot \frac{\text{Pico } i \text{ FAM}}{\text{Pico } i \text{ HEX}}$$

Onde: Mi = intensidade da metilação em porcentagem

4.6. ELETROFORESE CAPILAR

Após a reação de PCR, um volume de 2,0 μL de cada produto de amplificação foi misturado com 11,0 μL de Formamida Hi-Di e 2,0 μL do padrão de corrida ROX 1000 (Asuragen, Austin, Texas), em ambiente protegido da luz. Após ressuspender por 5 segundos, o material foi aquecido por 2 minutos a 95°C para promover a desnaturação e então resfriado para 4°C. Cada amostra foi então transferida para uma placa de eletroforese capilar identificada, para uso em analisador genético ABI-3500 (*Applied Biosystems, Foster City, California, EUA*).

Para a separação dos fragmentos, foi necessário padronizar todas as condições da eletroforese para um capilar de 36 cm, visto que o protocolo comercial padrão dependia de um capilar de 50 cm não disponível para a análise. Nestas condições, o ensaio foi testado e validado, com fragmentos comerciais padronizados de diferentes tamanhos, adequando-se a densidade do polímero do capilar e todas as condições de separação dos fragmentos, como tempo e voltagem da pré-corrida, da eletroinjeção e da corrida total.

4.7. GENOTIPAGEM

Os eletroferogramas gerados pelo analisador genético foram exportados em arquivos individuais com a extensão ‘*fsa*’ para o software *GeneMapper*[®], versão ID-X 1.4 (*Applied Biosystems, Vermon Hills, Illinois, USA*). O software foi configurado para análise de fragmentos de sequências repetitivas CGG do gene *FMRI*, sendo então calibrado com o padrão corrida ROX 1000, que forma uma escala alélica de 21 fragmentos diferentes. Para a validação dos processos foi usado um controle comercial positivo com 7 alelos conhecidos de diferentes faixas genotípicas.

Os eletroferogramas gerados pelo *GeneMapper*[®] foram então analisados, possibilitando a determinação do tamanho dos fragmentos de cada paciente. A genotipagem, dada pela determinação da quantidade de repetições CGG (CGG_n), foi realizada baseando-se no tamanho observado dos amplicons (T_o) com a redução do tamanho comum para todos os fragmentos (C_o), sendo então dividido pelo fator de

correção do padrão linear de migração do ROX1000 em relação mobilidade das trincas CGG (M_0):

$$\text{Genótipo (CGG}_n) = \frac{T_0 - C_0}{M_0} \quad \therefore \quad \frac{T_0 - 230}{2,995}$$

Nesta fórmula, o tamanho dos fragmentos gerados nos eletroferogramas e caracterizados em pares de bases (pb) são convertidos em alelos e nomeados de acordo com a quantidade de repetições CGG presentes.

Em seguida, todos os resultados foram plotados em planilhas do Excel[®] 2016 (*Microsoft Office*[®]) e organizados para serem tratados de forma descritiva. As análises estatísticas foram realizadas para um nível de significância de 5% através da ferramenta VBA de análise dos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi analisado um total de 34 pacientes encaminhados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) com deficiência intelectual e indicação clínica para a Síndrome do X-Frágil. A idade dos indivíduos variou entre 3 e 41 anos (média 12,8 anos) (Figura 8), sendo que 47% tinha menos que 10 anos. Em um estudo de Tejada *et al.* (2014) na população espanhola, foi observado que a maior frequência de indivíduos testados era também abaixo dos 10 anos (48,1%), sendo relatado ainda pacientes diagnosticados somente após os sessenta anos. Nestas condições, é importante destacar a dicotomia ainda existente entre o diagnóstico precoce e o tardio.

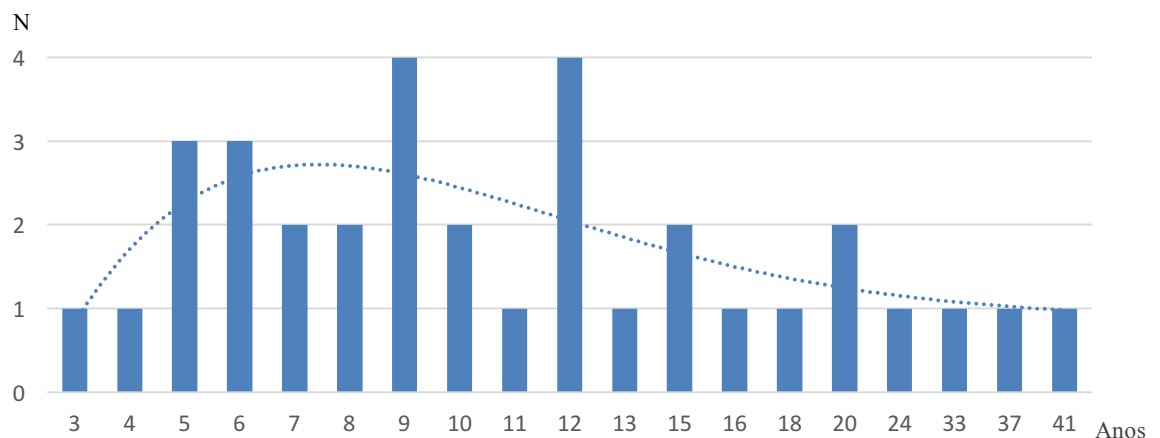


Figura 8 – Frequência das idades dos 34 pacientes encaminhados pelo SUS

A amostra foi composta por 22 indivíduos do sexo masculino (64,7%) e 12 do sexo feminino (35,3%). A maior frequência de encaminhamentos de pacientes do sexo masculino já era esperada, visto que as alterações no *FMRI* estão associadas a fenótipos mais significativos neste grupo (França *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012).

5.2. AMPLIFICAÇÃO DO FMRI

As condições de amplificação por PCR da região promotora do *FMRI* foram adequadas para otimizar a qualidade e quantidade das reações. Assim, o volume total da reação indicada pelo fabricante (15µL) foi testado com reduções progressivas em relação

ao protocolo padrão. Para cada reação, três outras variáveis foram testadas, sendo: quantidade de DNA genômico, tampão enriquecido em CG e DNA-polimerase. A qualidade das amplificações foi avaliada pela intensidade da leitura no eletroferograma em relação à reação original. As melhores condições analíticas estabelecidas se encontram na tabela 4, perfazendo uma redução final de 26% do volume total.

Tabela 4 – Reagentes utilizados na amplificação da região promotora do *FMRI*

REAGENTES	VOLUME ORIGINAL (μL)	VOLUME ADEQUADO (μL)
Tampão rico em CG	11,45	9,16
Diluente	0,5	0,3
<i>Primers FMRI</i>	0,5	0,3
<i>Primer CGG</i>	0,5	0,3
DNA-Polimerase	0,05	0,04
DNA	2,0 (20ng/μL)	1,0 (20ng/μL)
TOTAL	15,0 μL	11,1 μL

Nas condições analisadas, a redução na quantidade de DNA genômico utilizado foi marcante para a melhoria das amplificações, sendo viável inclusive em quantidades inferiores a 10ng por reação.

As condições de termociclagem foram ajustadas para aumentar o tempo de abertura da fita dupla e de extensão, visto se tratar de regiões altamente repetitivas, além de aumentar progressivamente este tempo de polimerização a cada ciclo, a partir do 11º ciclo, em mais 20 segundo por ciclo (Tabela 5). Nestas condições, o tempo de amplificação foi de aproximadamente 4,5 horas.

Tabela 5 – Condições de termociclagem para amplificação da região promotora do *FMRI*

ETAPA	CICLO (S)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (SEGUNDOS)
1ª	1x	97,0	300
2ª	10x	97,0	45
		62,0 68,0	40 240
3ª	20x	97,0	40
		62,0	40
		68,0	240 + 20/ciclo
4ª	1x	72,0	900
5ª	1x	4,0	∞

Todas estas adequações não estão descritas pelos protocolos operacionais padrão dos fabricantes, sendo, portanto, desenvolvidas internamente no sentido de customizar e principalmente aumentar o rendimento dos reagentes comerciais, mantendo a qualidade das reações e confiabilidade das análises.

5.3. ELETROFORESE CAPILAR

A separação dos amplicons foi realizada adaptando a eletroforese para um capilar de 36 cm. Nestas condições, o ensaio foi padronizado usando um polímero mais denso, o POP-4 (*Applied Biosystems, Foster City, California*) e as condições de separação dos fragmentos foram otimizadas para um tempo pré-corrída de 180 segundos (15 kVolts), tempo de injeção de 15 segundos (2,0 kVolts) e um tempo de corrida total de 2200 segundos (15 kVolts).

Todas as condições foram testadas e validadas com controle comercial AmpliX FMR1 (ref. 49513, lot. 16683; Asuragen) composto por 7 fragmentos de tamanhos e concentrações diferentes (Figura 9, Tabela 6 e apêndice 1).

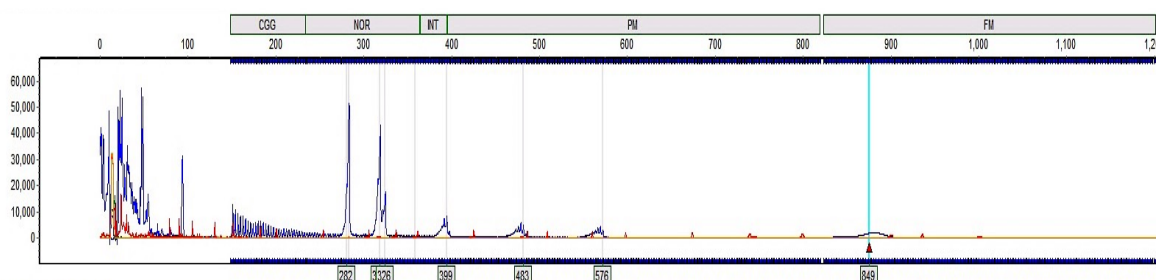


Figura 9 – Eletoferograma do controle de qualidade apresentando os cinco alelos presentes.

Tabela 6 – Alelos observados e esperados para o controle de qualidade

Fragmentos Observados¹	Alelos Correspondentes²	Referência Fornecida²	Desvio aceito pelo controle²	Desvio observado²
283 pb	18	18	± 1	0
320 pb	30	30	± 1	0
326 pb	32	32	± 1	0
399 pb	56	56	± 1	0
483 pb	84	84	± 3	0
576 pb	115	115	± 3	0
849 pb	206	206	± 3	0

¹ – em pares de bases; ² – em número de repetições CGG

5.4. DETERMINAÇÃO DAS EXPANSÕES TRINUCLEOTÍDICAS

Dentre os 34 indivíduos analisados, foram detectados alelos dentro da faixa de normalidade em 27 (79%), pré-mutação em 1 (3%) e mutação completa em 6 (18%) (Figura 10).

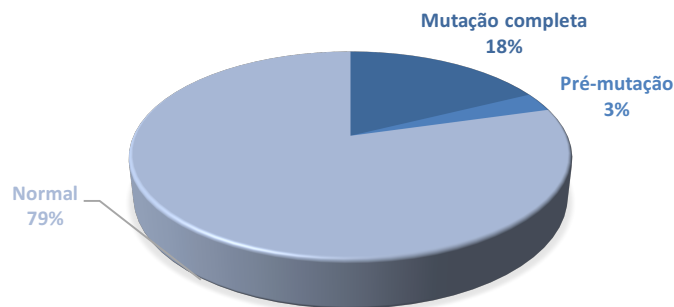


Figura 10 – Proporção de indivíduos com mutação completa, pré-mutação e normais.

Os valores são superiores aos apresentados por Rodrigueiro (2006), que encontrou uma frequência de 9,3% de alelos mutados em pacientes. Santos (2010) encontrou uma frequência ainda menor, de 3,1%, mas relatou resultados inconclusivos em 71,8% das pacientes analisadas em decorrência de dificuldades técnicas na identificação de alelos, levando a uma provável subestimativa da frequência observada. Por outro lado, pode-se inferir uma melhoria na seletividade dos encaminhamentos pelos profissionais do SUS, baseados em critérios fenotípicos e história familiar.

Entre os seis indivíduos identificados com mutação completa, cinco eram do sexo masculino e um do sexo feminino, sendo que esta também apresentava um alelo dentro da faixa de normalidade (Figura 11 e 12). Também foi possível identificar uma pré-mutação em um indivíduo, com 134 repetições (Figura 13).

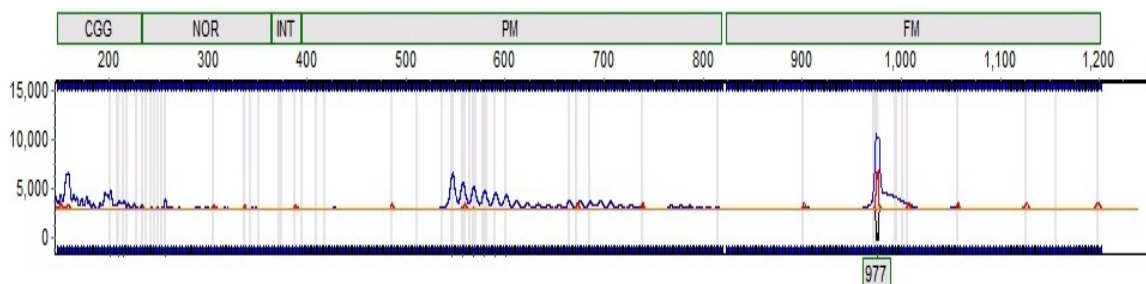


Figura 11 – Eletroferograma de paciente do sexo masculino apresentando um alelo com mutação completa com 977pb (249 repetições).

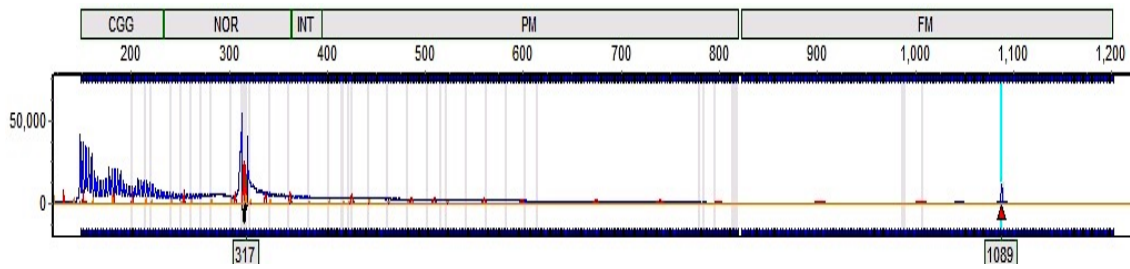


Figura 12 – Eletroferograma de paciente do sexo feminino com fragmentos normal e com mutação completa de 317 e 1089pb (29 e 286 repetições).

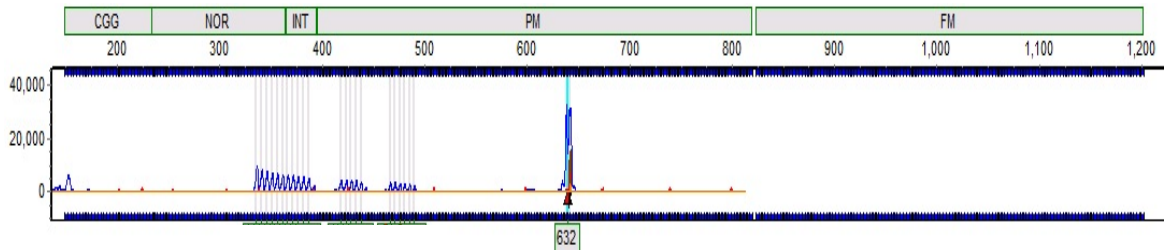


Figura 13 – Eletroferograma de paciente do sexo masculino com um fragmento pré-mutados de 632pb (134 repetições).

Não foram encontrados pacientes na zona cinza que, segundo Debrey *et al.* (2015) e Yang *et al.* (2016), representam um risco para aumento das expansões CGG, além de existirem relatos de pacientes com FOP, FXTAS e DI nesta faixa genotípica. Por outro lado, os demais pacientes apresentaram alelos dentro da faixa de normalidade, como exemplificado na figura 14 (paciente do sexo masculino) e figura 15 (paciente do sexo feminino).

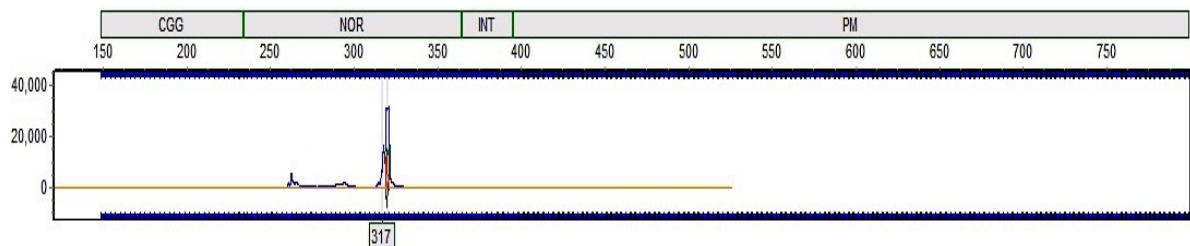


Figura 14 – Eletroferograma de paciente do sexo masculino com um fragmento normal de 317pb (29 repetições).

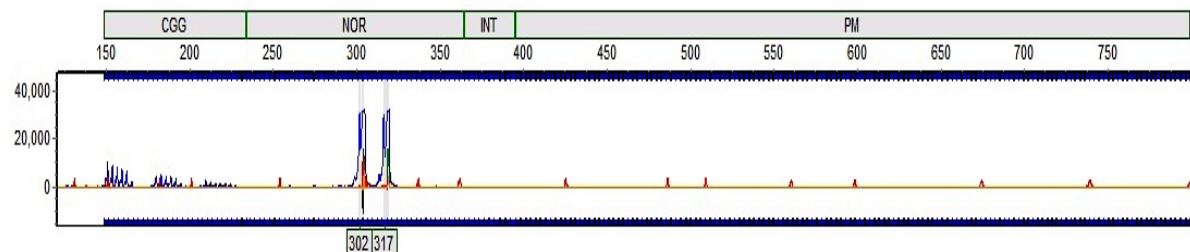


Figura 15 – Eletroferograma de paciente do sexo feminino com fragmentos normais de 302/317pb (24/29 repetições).

A distribuição dos alelos seguiu uma curva normal, sendo o alelo mais frequentemente observado na amostra o 29 (26%), seguido pelos alelos 28 e 30 (22% e 11%, respectivamente) (Figura 16). Esta distribuição foi semelhante à encontrada por Crawford *et al.* (2001) em caucasóides, Fernandez-Carvajal *et al.* (2009) em europeus e Fontes (2011) em brasileiros. No estudo de Tassone *et al.* (2012), o alelo 29 só não foi prevalente em populações asiáticas, sendo observado o alelo 30 como mais frequente.

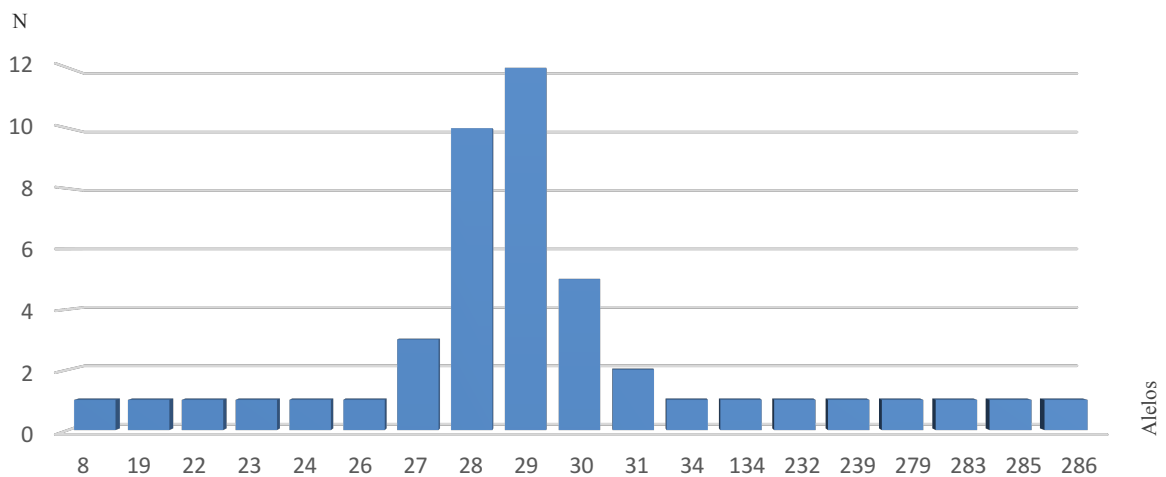


Figura 16 – Distribuição dos alelos encontrados., destacando os alelos 28, 29 e 30 como sendo os mais frequentes.

Na amostra analisada, também foi identificado um indivíduo com um fragmento de 256pb, caracterizando um alelo com 8 repetições. Em um estudo multicêntrico de Peprah (2012) que analisou 19 grupos populacionais, incluindo ameríndios, negros e caucasóides brasileiros, não foi encontrado o alelo 8. Até o presente momento, este alelo foi descrito na população japonesa (Otusaka *et al.*, 2010) e coreana (Kim *et al.*, 2013), com uma frequência estimada inferior a 0,01%. De acordo com Adhikari *et al.* (2016), a população brasileira tende a apresentar uma maior variabilidade alélica devido ao seu intenso processo de miscigenação.

5.5. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE METILAÇÃO

A metilação foi estimada pela leitura em eletroferograma das sequências tratadas com enzima de restrição e marcadas com HEX (verde) e das marcadas com FAM (azul). Assim, foi observado nos pacientes alelos com alto grau de metilação (Figura 17) e baixa metilação (Figura 18).

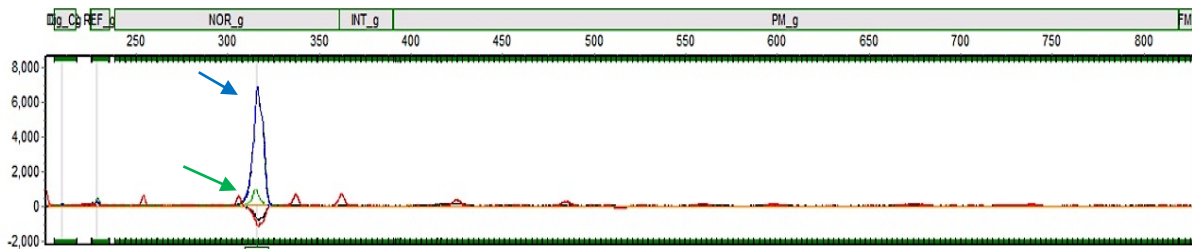


Figura 17 – Eletroferograma de paciente com mutação completa revelando uma diferença entre os sinais FAM e HEX indicando um alto grau de metilação

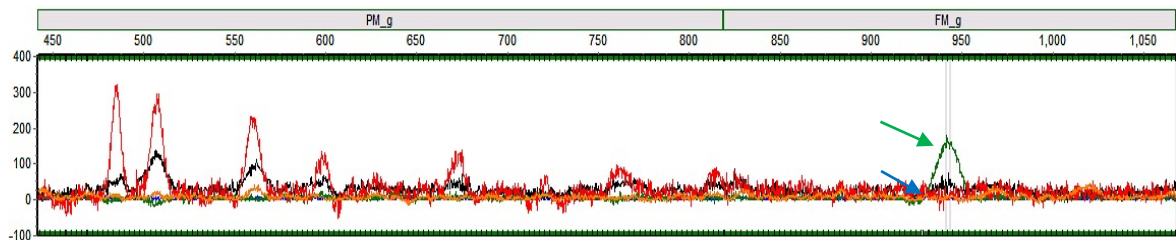


Figura 18 – Eletroferograma de paciente com alelo normal apresentando uma elevada digestão do alelo FAM, revelando um baixo grau de metilação.

O grau de metilação dos pacientes foi calculado para cada paciente e revelou uma metilação que variou de 97% a 100% nas amostras com mutação completa e de 37% no alelo com pré-mutação. Os indivíduos com genótipos normais apresentaram uma metilação de 12 a 28% em mulheres e 0% a 4% em homens (Figura 19).

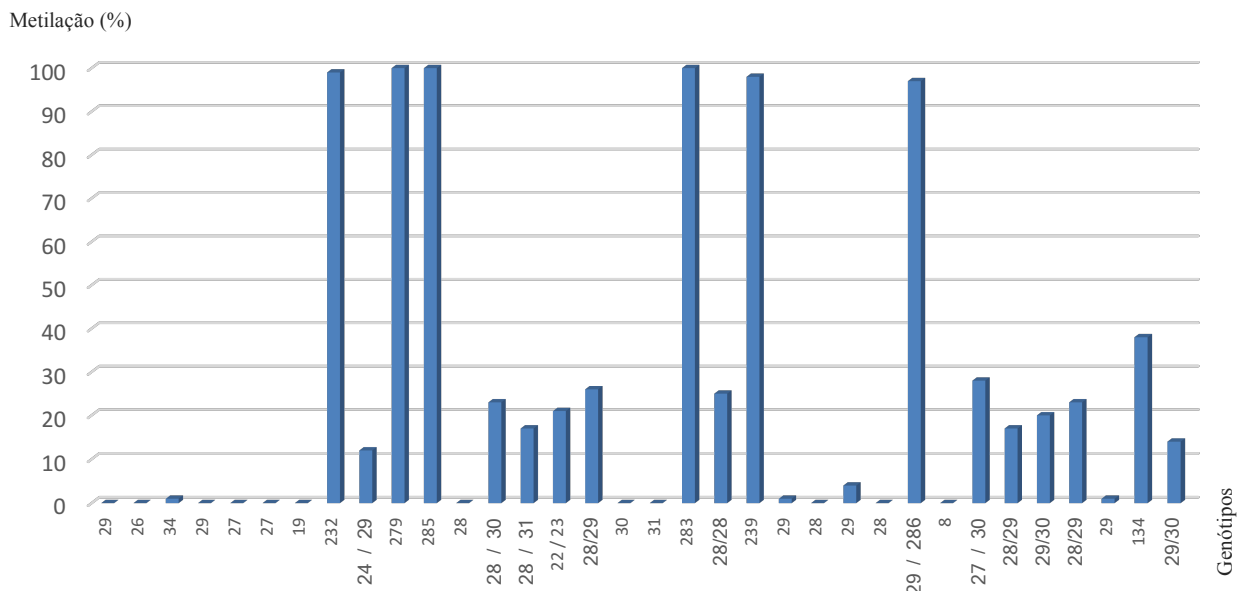


Figura 19 – Distribuição dos genótipos e grau de metilação dos alelos dos 34 pacientes analisados, indicando metilação variando de 0 a 100%.

De acordo com Pretto *et al.* (2014), as mutações completas cursam tipicamente com uma elevada metilação, a qual pode ocorrer raramente em pacientes com alelos normais, o que não foi observado em nossa amostra.

Por outro lado, os pacientes com genótipos normais do sexo feminino apresentaram uma diferença significativa do grau de metilação (M=20,5%) em relação aos pacientes com genótipos normais do sexo masculino (M=0,41%) ($p < 0,0001$). Segundo Pretto *et al.* (2014) e Brasa *et al.* (2016), esta relação é normal e esperada, sendo consequência direta da inativação de um cromossomo X em mulheres, não impactando para alterações fenotípicas.

5.6. EXPANSÕES TRINUCLEOTÍDICAS E TEA

5.6.1. AVALIAÇÃO DOS PACIENTES PELA CARS

Os pacientes foram avaliados para verificar a ocorrência de alterações comportamentais compatíveis com o espectro do autismo pela CARS, sendo divididos em 3 grupos para a classificação do transtorno: Sem autismo (escore entre 0 e 29), Autismo leve / moderado (escore entre 30 e 36) e Autismo severo (escore entre 37 e 60) (anexo 1). Os escores variaram de 12 a 51, sendo que 21 pacientes (62%) não apresentaram o TEA, 6 (18%) o apresentavam na forma leve / moderada e 7 (20%) na forma severa (Figura 20).

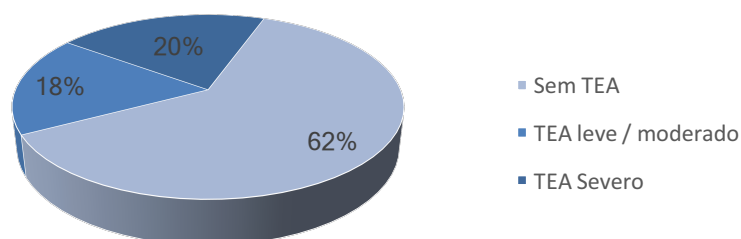


Figura 20 – Frequência dos fenótipos observados de acordo com a CARS

Na relação entre os escores da CARS e o tamanho dos alelos dos pacientes, foi possível observar indivíduos com alelos dentro da faixa de normalidade com fenótipos sem autismo, com autismo leve ou moderado e com autismo severo (Tabela 7).

Tabela 7 – Relação entre Genótipos do *FMRI* e Fenótipos do TEA.

Genótipo <i>FMRI</i> \ Fenótipo CARS	Sem autismo	Autismo leve / moderado	Autismo severo
Normal	20	4	3
Pré-mutação	1	-	-
Mutação completa	-	2	4
TOTAL	21	6	7

Nestas condições, não foi observada uma relação entre o tamanho normal dos alelos com o TEA. Este fato pode ser explicado por existirem outros mecanismos, fora da expansão CGG, que também poderiam levar a alteração da expressão do *FMRI* (Jin & Warren, 2000; Lozano *et al.*, 2014; Stepniak *et al.*, 2015; Suhl *et al.*, 2015). Nestes casos, seria recomendado o uso de técnicas complementares, como o sequenciamento completo da região alvo.

Entretanto o mais provável é que estes fenótipos estejam associados a alterações de outros genes envolvidos com o TEA, necessitando de investigações de múltiplas regiões genômicas, com auxílio de técnicas que permitam a detecção de pequenos rearranjos estruturais, como por hibridização genômica comparativa (Marshall *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2012).

Avaliando-se o padrão de agrupamento entre o tamanho das expansões, foi possível verificar que a linha de tendência é positiva na relação entre o aumento do tamanho dos alelos e o aumento do escore, com um coeficiente de correlação (r) de 37,83% (Figura 21). Comparando as faixas genóticas (alelos normais, pré-mutados e mutados) com as faixas fenóticas (sem autismo, autismo leve/moderado e autismo severo), foi possível verificar uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,0032$).

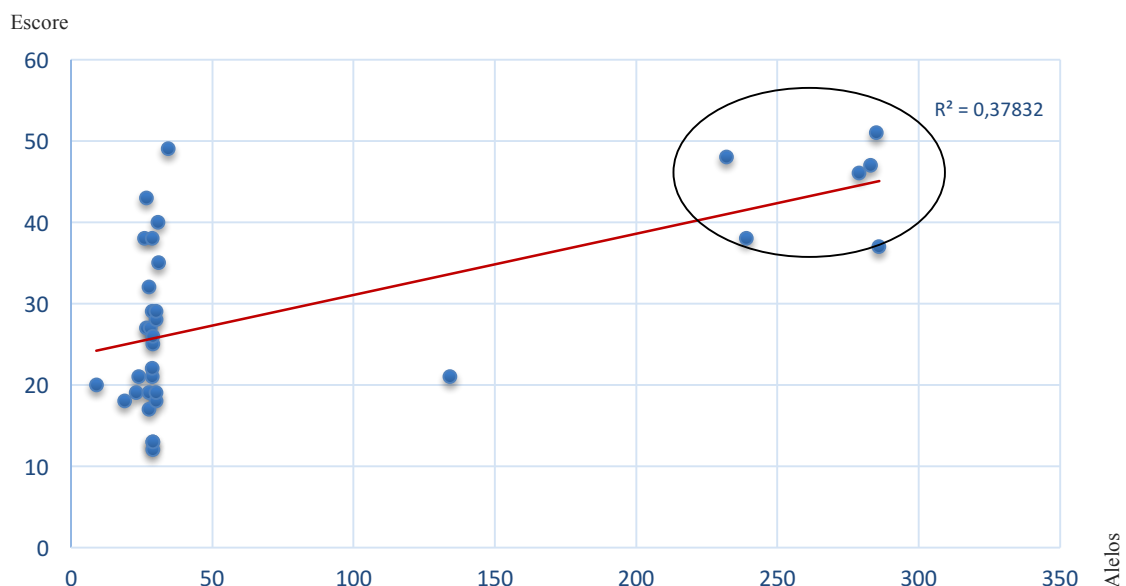


Figura 21 – Padrão de agrupamento entre escore da CARS e tamanho dos alelos.

Todos os seis pacientes portadores de mutação completa apresentaram um fenótipo compatível com autismo severo (100%), sendo que o maior escore da CARS foi observado justamente no paciente homem com a maior expansão trinucleotídica (Figura

21). Estes resultados corroboram com vários estudos que tem apontado para uma correlação entre a mutação completa e o TEA (McCary & Roberts, 2013; Abbeduto *et al.*, 2014; Aliaga *et al.*, 2016; Alvarez-Mora *et al.*, 2016). Apesar da correlação positiva entre a CARS e as expansões, o aumento do número de pacientes é recomendado para gerar maior consistência dos dados apresentados.

Também se deve destacar que a correlação positiva observada não permite inferir diretamente causalidade. De acordo com Sulh & Warren (2015), a causalidade das mutações completas depende de uma sequência de eventos moleculares extremamente variável, envolvendo metilação diferencial, redução/ausência da FMRP, alteração nos processos de interação FMRP-RNAs e FMRP-proteínas, perda dos sinais de localização e exportação nuclear para diferentes domínios estruturais, culminando com a alteração da expressão de neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e diminuição do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5).

Estudos *post-mortem* mostraram que a expressão da FMRP, do GABA e do mGluR5 estava reduzida nos cérebros de indivíduos com esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão maior, síndrome do X-frágil e autismo (Fatemi & Folsom, 2015). Recentemente, as modulações do GABA e mGluR5 têm ganhado papel de destaque na etiologia do TEA, sendo considerados os principais alvos terapêuticos no tratamento das alterações comportamentais existentes (Gurkan & Hagerman, 2012; Lozano *et al.*, 2014; Ebrahimi-Fakhari & Sahin, 2015; Kim *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016).

5.6.2. AVALIAÇÃO DOS PACIENTES PELA ADI-R

A entrevista estruturada ADI-R permite quantificar separadamente quatro variáveis comportamentais distintas presentes em pacientes com TEA: (A) interação social recíproca, (B) comunicação, (C) padrões restritos, repetitivos e estereotipados do comportamento e (D) anormalidades do desenvolvimento. Todos os pacientes caracterizados pela CARS com o transtorno, tanto com genótipo normal quanto com mutação completa para *FMRI*, foram analisados pela ADI-R, sendo observada uma concordância de 100% entre os testes, corroborando os estudos de Rapin & Goldman (2008) e Becker (2009) (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação dos pacientes para os escores da CARS e ADI-R, indicando uma concordância entre as duas ferramentas

Pacientes	CARS	Fenótipo	ADI-R*				Fenótipo
			A	B	C	D	
Genótipo Normal	38	Autismo (Leve / Moderado)	16	15	7	4	Autismo
	38	Autismo (Leve / Moderado)	15	17	13	5	Autismo
	49	Autismo (Severo)	20	19	9	3	Autismo
	43	Autismo (Severo)	21	20	12	4	Autismo
	32	Autismo (Leve / Moderado)	17	17	9	2	Autismo
	35	Autismo (Leve / Moderado)	18	16	8	3	Autismo
	40	Autismo (Severo)	18	14	11	3	Autismo
Mutação Completa	47	Autismo (Severo)	11	15	5	3	Autismo
	38	Autismo (Leve / Moderado)	10	14	6	2	Autismo
	37	Autismo (Leve / Moderado)	12	11	4	3	Autismo
	48	Autismo (Severo)	15	14	5	4	Autismo
	46	Autismo (Severo)	13	14	3	2	Autismo
	51	Autismo (Severo)	11	16	4	2	Autismo

* (A) Anormalidades qualitativas na intera o social recíproca, (B) anormalidades qualitativas na comunica o, (C) padrões restritos, repetitivos e estereotipados e (D) anormalidades do desenvolvimento.

Ao se comparar as m dias do ADI-R, não foi observada uma diferença significativa entre os pacientes com muta o completa em rela o aos sem muta o ($P=0,052$). No entanto, ao se analisar os parâmetros separadamente, foi revelada uma diferença significativa para a redu o fenotípica das anormalidades qualitativas na intera o social recíproca (A) ($P=0,00023$) e para os padrões restritos, repetitivos e estereotipados (C) ($P=0,0002$) (Figura 22).

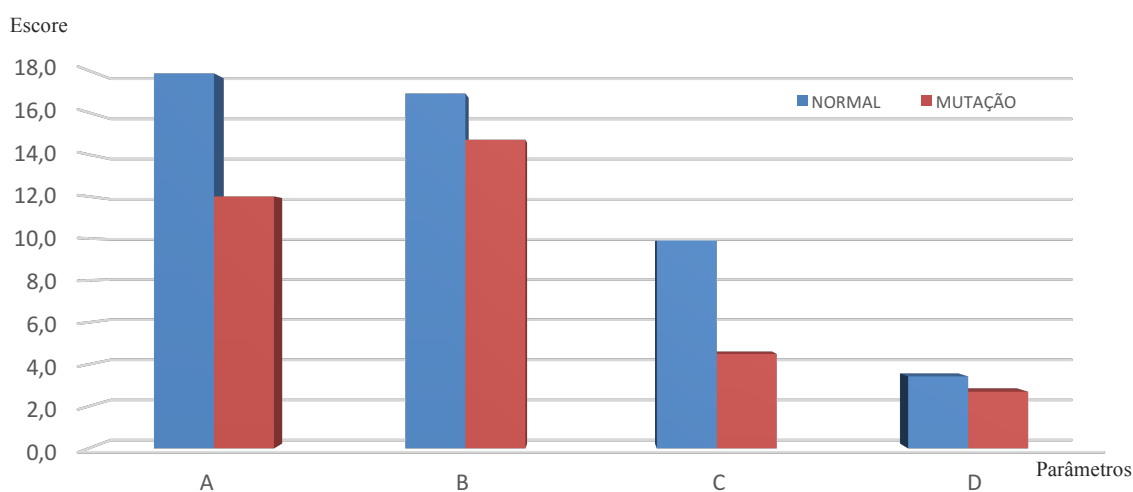


Figura 22 – Rela o entre escore da ADI-R e genótipos, sendo: (A) Anormalidades qualitativas na intera o social recíproca, (B) anormalidades qualitativas na comunica o, (C) padrões restritos, repetitivos e estereotipados e (D) anormalidades do desenvolvimento.

De acordo com Marteleto *et al.* (2011) e Hazlett *et al.* (2012), as variações clínicas do TEA em crianças com a SXF são bastante significativas e às vezes até interdependentes. Por outro lado, Carmona & Franco (2012) e Franco *et al.* (2014) avaliaram que, em pacientes autistas portadores de mutações completas do *FMRI*, os níveis de ansiedade seriam menos intensos, facilitando os processos de interação social.

Segundo Wei *et al.* (2016), os pacientes com SXF também seriam menos propícios a estereotípias e padrões restritos e repetitivos, o que também facilitaria a interação social destes indivíduos. Assim, é provável que a compreensão da ação de diferentes genes, como o *FMRI*, permita estabelecer no futuro uma relação mais preditiva entre genótipo e fenótipo.

6. CONCLUSÕES

A Síndrome de X-Frágil representa uma importante e complexa alteração do desenvolvimento, de etiologia genética e difícil diagnóstico. Os avanços biotecnológicos têm contribuídos para a melhor compreensão da diversidade genética das populações humanas e seus impactos no desenvolvimento de fenótipos complexos, como os observados na SFX.

No presente estudo, foi possível realizar a investigação molecular da SXF, permitindo o estabelecimento de uma proposta de diagnóstico eficaz e preciso para indivíduos encaminhados para o serviço público de saúde no estado de Goiás com indicação clínica de deficiência intelectual compatível com a SXF. Sendo assim, foi estabelecido:

- Padronização e otimização de um sistema *triplet primed* PCR para amplificação da região promotora do gene *FMRI*;
- Desenvolvimento de um protocolo de eletroforese em capilar de 36cm para o analisador genético ABI 3500 (*Applied Biosystems*);
- Determinação da quantidade de repetições CGG de indivíduos com DI, estabelecendo-se a faixa genotípica para as expansões CGG;
- Avaliação do grau de metilação do DNA na região alvo para todos os indivíduos com a indicação clínica da síndrome;
- Determinação da ocorrência do Transtorno do Espectro Autista nos pacientes pela CARS;
- Verificação de alterações comportamentais nos pacientes com TEA em relação aos genótipos encontrados;
- Disponibilização do exame para diagnóstico da SXF pelo SUS.

Ainda é importante destacar que o diagnóstico efetivo da SXF traz abertura para a orientação adequada das famílias envolvidas, que poderão ser encaminhadas para o serviço de aconselhamento genético, e o potencial estabelecimento de novas propostas terapêuticas específicas para a SXF.

7. BIBLIOGRAFIAS

- Abbeduto, L., McDuffie, A., Thurman, A. J. (2014). The fragile X syndrome-autism comorbidity: what do we really know?. *Frontiers in genetics*, 5, 355-355.
- Adhikari, K., Mendoza-Revilla, J., Chacón-Duque, J. C., Fuentes-Guajardo, M., & Ruiz-Linares, A. (2016). Admixture in Latin America. *Current Opinion in Genetics & Development*, 41, 106-114.
- Alvarez-Mora, M. I., Rodriguez-Revenga, L., Madrigal, I., Garcia-Garcia, F., Duran, M., Dopazo, J. & Milà, M. (2015). Deregulation of key signaling pathways involved in oocyte maturation in FMR1 premutation carriers with Fragile X-associated primary ovarian insufficiency. *Gene*, 571(1), 52-57.
- Amancio, A. P., Melo, C. D. O., Vieira, A. D. M., Minasi, L. B., e Silva, D. D. M., da Silva, C. C., & da Cruz, A. D. (2015). Molecular analysis of patients suspected of Fragile X Syndrome. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 14660-14669.
- Andrade, D. D. (2012). Fenótipos em portadoras brasileiras da pré-mutação da síndrome do X-Frágil.
- Aris, A., & Leblanc, S. (2011). Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reproductive Toxicology*, 31(4), 528-533.
- Aziz, M., Stathopulu, E., Callias, M., Taylor, C., Turk, J., Oostra, B., Patton, M. (2003). Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 121(1), 119-127.
- Bagni, C., Tassone, F., Neri, G., & Hagerman, R. (2012). Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *The Journal of clinical investigation*, 122(12), 4314-4322.
- Bailey, D. B., Raspa, M., Olmsted, M., Holiday, D. B. (2008). Co-occurring conditions associated with *FMR1* gene variations: Findings from a national parent survey. *American journal of medical genetics part A*, 146(16), 2060-2069.
- Berman, R. F., Schwartz, J. J., & Hunsaker, R. (2014). Mouse Models of the Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) and the Fragile X Premutation. In *Elsevier Inc.*.
- Becker, M. M. (2009). Tradução e validação da entrevista Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) para diagnóstico de autismo no Brasil.

Bellavance, J. (2016). Le syndrome du X fragile chez l'homme présentant une déficience intellectuelle: dépistage et phénotype comportemental (Doctoral dissertation, Université du Québec à Montréal).

Brasa, S., Mueller, A., Jacquemont, S., Hahne, F., Rozenberg, I., Peters, T., Grenet, O. (2016). Reciprocal changes in DNA methylation and hydroxymethylation and a broad repressive epigenetic switch characterize *FMR1* transcriptional silencing in fragile X syndrome. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 1.

Brock, M., & Hatton, D. (2010). Distinguishing features of autism in boys with fragile X syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, 54(10), 894-905.

Carmona, C., & Franco, V. (2012). Dimensões desenvolvimentais da Síndrome do X-Frágil – uma reflexão sobre o estado da arte.

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

Christofolini, D. M., Pinheiro, F. S., Bianco, B., Melaragno, M. I., de Paula Ramos, M. A., Brunoni, D., ... & Barbosa, C. P. (2009). Síndrome de tremor e ataxia associada ao X frágil: rastreamento por PCR em amostra de idosos. *Arq Bras Ciências Saúde*, 34, 1-5.

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

Crawford, D. C., Acuña, J. M., & Sherman, S. L. (2001). *FMR1* and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine*, 3(5), 359-371.

Ebrahimi-Fakhari, D., & Sahin, M. (2015). Autism and the synapse: emerging mechanisms and mechanism-based therapies. *Current opinion in neurology*, 28(2), 91-102.

Eichler, E. E., Holden, J. J., Popovich, B. W., Reiss, A. L., Snow, K., Thibodeau, S. N. & Nelson, D. L. (1994). Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the *FMR1* gene. *Nature genetics*, 8(1), 88-94.

Farzin, F., & Koldewyn, K. (2014). Fragile X syndrome and autism. In *Comprehensive guide to autism* (pp. 2743-2754). Springer New York.

- Fatemi, S. H., & Folsom, T. D. (2015). GABA receptor subunit distribution and FMRP–mGluR5 signaling abnormalities in the cerebellum of subjects with schizophrenia, mood disorders, and autism. *Schizophrenia research*, 167(1), 42-56.
- Fernandez-Carvajal, I., Walichiewicz, P., Xiaosen, X., Pan, R., Hagerman, P. J., Tassone, F. (2009). Screening for expanded alleles of the *FMR1* gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(4), 324-329.
- França, D. C. C., Maria, d. M. C., Correa, I. P. C., Aburad, a. T. T., Aguiar, S. M. H. (2011). Síndrome do X Frágil: relato de caso. *Revista Faipe*, 1(1), p-1.
- Gürkan, C. K., & Hagerman, R. J. (2012). Targeted treatments in autism and fragile X syndrome. *Research in autism spectrum disorders*, 6(4), 1311-1320.
- Hagerman, RJ., & Hagerman, P. J. (2008). Testing for fragile X gene mutations throughout the life span. *Jama*, 300 (20), 2419-2421.
- Hagerman, RJ & Hagerman, P. (2011). *FMR1* premutation and full mutation molecular mechanisms related to autism. *Journal of neurodevelopmental disorders*, 3(3), 211.
- Hantash, F. M., Goos, D. G., Tsao, D., Quan, F., Buller-Burckle, A., Peng, M., Strom, C. M. (2010). Qualitative assessment of *FMR1* (CGG) n triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening. *Genetics in Medicine*, 12(3), 162-173.
- Jin, P., & Warren, S. T. (2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human molecular genetics*, 9(6), 901-908.
- Ke, X., & Liu, J. (2015). Deficiência intelectual. Tratado de Saúde Mental da Infância e Adolescência da IACAPAP. Brasil.
- Kidd, S. A., Lachiewicz, A., Barbouth, D., Blitz, R. K., Delahunty, C., McBrien, D., ... & Berry-Kravis, E. (2014). Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics*, 134(5), 995-1005.
- Kim, M. J., Kim, S. Y., Yang, J. H., Kim, M. H., Lee, S. W., Jeong, S. O., Ryu, H. M. (2013). Fragile X carrier screening in Korean women of reproductive age. *Journal of medical screening*, 20(1), 15-20.
- Kim, H., Lim, C. S., & Kaang, B. K. (2016). Neuronal mechanisms and circuits underlying repetitive behaviors in mouse models of autism spectrum disorder. *Behavioral and Brain Functions*, 12(1), 1.

- Kong SW, Shimizu-Motohashi MG, Lee HC, Collins CD, Brewster SJ, Holm IA, Rappaport L, Kohane IS, Kunkel LM. (2013). Peripheral blood gene expression signature differentiates children with autism from unaffected siblings. *Neurogenetics* 14:143–152.
- Latham, G. J., Coppinger, J., Hadd, A. G., & Nolin, S. L. (2014). The role of AGG interruptions in fragile X repeat expansions: a twenty-year perspective. *Frontiers in genetics*, 5.
- Leiter, U. (2012). O uso do teste não-verbal Leiter-R na avaliação de inteligência em distúrbios do desenvolvimento. *Cadernos de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*, 12(2), 9-15.
- Liu, J., Kościelska, K. A., Cao, Z., Hulsizer, S., Grace, N., Mitchell, G., Hagerman, R. J. (2012). Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Human molecular genetics*, dds207.
- Lozano, R., Rosero, C. A., Hagerman, R. J. (2014). Fragile X spectrum disorders. *Intractable & rare diseases research*, 3(4), 134-146.
- Luo, J. J. (2015). *An investigation into the effect of DNA structural polymorphism and single-stranded DNA binding proteins on repair of disease-associated slipped-DNA repeats* (Doctoral dissertation).
- Luo, S. Y., Wu, L. Q., & Duan, R. H. (2016). Molecular medicine of fragile X syndrome: based on known molecular mechanisms. *World Journal of Pediatrics*, 12(1), 19-27.
- Luz, G. D. S., Silva, M. R. S. D., & DeMontigny, F. (2015). Rare diseases: diagnostic and therapeutic journey of the families of affected people. *Acta Paulista de Enfermagem*, 28(5), 395-400.
- Majumder, P., Chu, J. F., Chatterjee, B., Swamy, K. B., & Shen, C. K. J. (2016). Co-regulation of mRNA translation by TDP-43 and Fragile X Syndrome protein FMRP. *Acta Neuropathologica*, 132(5), 721-738.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, et al. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 82(2): 477– 488.
- Marteletto, M. R. F., Schoen-Ferreira, T. H., Chiari, B. M., & Perissinoto, J. (2011). Behavioral problems of children with Autism Disorders. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 27(1), 5-12.
- McCary, L. M., & Roberts, J. E. (2013). Early identification of autism in fragile X syndrome: a review. *Journal of Intellectual Disability Research*, 57(9), 803-814.

- Meira, J. G. C., & Acosta, A. X. (2009). Políticas de saúde pública aplicadas à genética médica no Brasil. *Revista de Ciências médicas e biológicas*, 8(2), 189-197.
- Nahas, F. A., Monroe, T. J., Prior, T. W., Botma, P. I., Fang, J., Snyder, P. J., Feldman, G. L. (2012). Evaluation of the human fragile X mental retardation 1 polymerase chain reaction reagents to amplify the *FMR1* gene: testing in a clinical diagnostic laboratory. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 16(3), 187-192.
- Niort, J., & Hernández Vázquez, F. J. (2016). Comparative study of laterality in people with fragile X syndrome, people with intellectual disabilities, and people with typical development. *Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition*, 1-13.
- Otsuka, S., Sakamoto, Y., Siomi, H., Itakura, M., Yamamoto, K., Matumoto, H., Nanba, E. (2010). Fragile X carrier screening and *FMR1* allele distribution in the Japanese population. *Brain and Development*, 32(2), 110-114.
- Ouwenga, R. L., & Dougherty, J. (2015). Fmrp targets or not: long, highly brain-expressed genes tend to be implicated in autism and brain disorders. *Molecular autism*, 6(1), 1.
- Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., Vorstman, J. A. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *The American Journal of Human Genetics*, 94(5), 677-694.
- Pretto, D., Yrigollen, C. M., Tang, H. T., Williamson, J., Espinal, G., Iwahashi, C. K., Tassone, F. (2014). Clinical and molecular implications of mosaicism in *FMR1* full mutations. *Front Genet*, 5, 318.
- Rapin, I., & Goldman, S. (2008). A escala CARS brasileira: uma ferramenta de triagem padronizada para o autismo. *J. Pediatr.(Rio J.) vol*, 84.
- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, et al. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*. 19.45-237.
- Schaefer, G. B., & Mendelsohn, N. J. (2008). Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genetics in Medicine*, 10(1), 4-12.
- Schaefer, G. B., Mendelsohn, N. J., & Professional Practice and Guidelines Committee. (2013). Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genetics in Medicine*, 15(5), 399-407.
- Snow, K., Doud, L. K., Hagerman, R., Pergolizzi, R. G., Erster, S. H., & Thibodeau, S. N. (1993). Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *American journal of human genetics*, 53(6), 1217.

- Spath, M. A., Feuth, T. B., Allen, E. G., Smits, A. P. T., Yntema, H. G., van Kessel, A. G., Thomas, C. M. G. (2011). Intra-individual stability over time of standardized anti-Müllerian hormone in *FMRI* premutation carriers. *Human reproduction*, 26(8), 2185-2191.
- Stembalska, A., Łaczmańska, I., Gil, J., & Pesz, K. A. (2016). Fragile X syndrome in females—a familial case report and review of the literature. *Developmental period medicine*, 20(2), 99.
- Stepniak, B., Kästner, A., Poggi, G., Mitjans, M., Begemann, M., Hartmann, A., Brosi, C. (2015). Accumulated common variants in the broader fragile X gene family modulate autistic phenotypes. *EMBO molecular medicine*, e201505696.
- Suhl, J. A., & Warren, S. T. (2015). Single-Nucleotide Mutations in *FMRI* Reveal Novel Functions and Regulatory Mechanisms of the Fragile X Syndrome Protein FMRP. *Journal of Experimental Neuroscience*, 2015(Suppl. 2), 35-41.
- Tassone, F., & Hagerman, R. (2012). The fragile X-associated tremor ataxia syndrome. In *Modeling Fragile X Syndrome* (pp. 337-357). Springer Berlin Heidelberg.
- Tassone, F. (2015). Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragile X syndrome. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(11), 1465-1473.
- Tejada, M. I., Glover, G., Martínez, F., Guitart, M., de Diego-Otero, Y., Fernández-Carvajal, I. & Calvo, M. T. (2014). Molecular Testing for Fragile X: Analysis of 5062 Tests from 1105 Fragile X Families—Performed in 12 Clinical Laboratories in Spain. *BioMed research international*, 2014.
- Vasilyev, N., Polonskaia, A., Darnell, J. C., Darnell, R. B., Patel, D. J., & Serganov, A. (2015). Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a β -turn in the RGG motif of FMRP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(39), E5391-E5400.
- Vieira, D. K. R., & Favoreto, C. A. O. (2016). Narrativas em saúde: refletindo sobre o cuidado à pessoa com deficiência e doença genética no Sistema Único de Saúde (SUS). *Interface-Comunicação, Saúde, Educação*, 20(56), 89-98.
- Viveiros, M. T. M. (2013). Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental idiopática no Maranhão: diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil. Tese de doutorado, Rio de Janeiro.

- Walsh, E., Wang, X., Lee, M. Y., & Eckert, K. A. (2013). Mechanism of replicative DNA polymerase delta pausing and a potential role for DNA polymerase kappa in common fragile site replication. *Journal of molecular biology*, 425(2), 232-243.
- Wang, L. W., Berry-Kravis, E., & Hagerman, R. J. (2010). Fragile X: leading the way for targeted treatments in autism. *Neurotherapeutics*, 7(3), 264-274.
- Wei, D., Dinh, D., Lee, D., Li, D., Anguren, A., Moreno-Sanz, G., ... & Piomelli, D. (2016). Enhancement of Anandamide-Mediated Endocannabinoid Signaling Corrects Autism-Related Social Impairment. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 81-89.
- Wheeler, A. C., Mussey, J., Villagomez, A., Bishop, E., Raspa, M., Edwards, A. & Bailey Jr, D. B. (2015). DSM-5 changes and the prevalence of parent-reported autism spectrum symptoms in fragile X syndrome. *Journal of autism and developmental disorders*, 45(3), 816-829.
- Yiping S, Kira AD, Ingrid A. Holm MD, Carolyn BMD, et al. (2010). Clinical Genetic Testing for Patients With Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*. v: 125, n° 4, 727- 735.
- Yudkin, D. V., Lemskaya, N. A., Grischenko, I. V., & Dolskiy, A. A. (2015). Chromatin changes caused by expansion of CGG repeats in *fmr1* gene. *Molecular Biology*, 49(2), 179-184.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “Determinação de expansões trinucleotídicas CGG no gene *FMRI*”.

Meu nome é Marc Alexandre Duarte Gigonzac, sou biomédico e responsável (sob orientação da Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz) por esta pesquisa. A área de atuação é em saúde. Após ler com atenção este documento e estar esclarecido (a) sobre as informações necessárias, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final do documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato direto a qualquer momento com o pesquisador Marc Alexandre Duarte Gigonzac.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

O título do estudo é “Determinação de expansões trinucleotídicas CGG no gene *FMRI*”.

Esta pesquisa se justifica visto que o diagnóstico para o Transtorno do Espectro do Autismo - TEA é um desafio médico complexo e inovador para as comunidades científicas. Infelizmente, tal transtorno não pode ser diagnosticado por testes de interpretação simples, com resultados positivos ou negativos sendo que é necessário uma série de testes, questionários e análises de comportamento para direcionar o diagnóstico. Recentemente, vários estudos sugeriram também que testes genéticos para repetições CGG no gene *FMRI* também devem ser testados por ser o gene mais comumente envolvido no TEA.

Desta forma, a avaliação do *FMRI* permitirá uma possível determinação do diagnóstico e ao estabelecimento de caracterizações e prognósticos diferenciais de acordo com o tipo de mutação detectada. Além disso, este estudo permitirá a produção de informações científicas, mantendo intercâmbio do serviço público de saúde com instituições de ensino e pesquisa, contribuindo para o fortalecimento do desenvolvimento biotecnológico regional e nacional.

A presente pesquisa é submetida a um Comitê de Ética em Pesquisa - CEP – que é um colegiado independente criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos, sendo responsável pela avaliação e acompanhamento

dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, conforme diretrizes éticas internacionais.

- Sua participação será de grande importância para este estudo, pois através dela poderemos correlacionar alterações genéticas com o TEA.
- Os objetivos da presente pesquisa são analisar as variações genéticas presentes no gene *FMRI* e relacionar com variantes do TEA
- Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento do estudo, porém é totalmente **VOLUNTÁRIA**.
- O estudo será realizado através de questionários padronizados denominados CARS e ADI-R, para avaliação de TEA.
- Será também feita uma coleta de 10 mL de sangue venoso mediante a punção do antebraço.
- Todos os procedimentos acima citados serão realizados no Núcleo de Pesquisa Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás na Rua 235 nº 40 Área 4 Bloco L - Setor Universitário.
- Nenhuma pesquisa com os seres humanos é livre de riscos. Os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem risco mínimo aos participantes. Os principais riscos envolvidos neste estudo são: desconforto, aparecimento de inchaço, vermelhidão e hematoma na pele pelo extravasamento de sangue no local da coleta (antebraço), sensação de desmaio, ansiedade e nervosismo por causa da coleta de sangue e medo de agulha, entre outras. Caso ocorra qualquer intercorrência devido à coleta sanguínea os pacientes terão direito de assistência médica integral e gratuita devido a danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa.
- Caso haja qualquer dano psicológico a qualquer dos participantes da pesquisa, tais como quebra do sigilo do participante, constrangimento em responder alguma pergunta do questionário, entre outras, os mesmos terão direito de assistência psicológica integral e gratuita devido a danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa.
- As fichas de avaliação serão armazenadas em pastas plásticas e ficarão arquivadas em armário devidamente trancado com chave, de acesso único e exclusivo do coordenador da pesquisa, no Núcleo de Pesquisa Replicon da PUC-Goiás,

protegido por vigilância eletrônica permanente. Elas serão armazenadas por 5 anos e posteriormente serão incineradas.

- Será mantido sigilo absoluto em relação aos nomes dos participantes da pesquisa.
- Os resultados encontrados terão finalidade apenas para a pesquisa e os dados genéticos poderão ser utilizados para outras pesquisas, desde que aprovado um novo projeto de pesquisa junto ao CEP, mediante autorização por escrito do participante.
- Caso queira saber das informações adicionais, entre em contato com o pesquisador em qualquer momento do estudo pelo telefone já informado acima.
- Caso desista de participar desta pesquisa, você poderá manifestar-se em **qualquer momento** e não sofrerá nenhum dano por isto. Assim, a retirada do consentimento deverá ser feita por escrito e assinada, a qualquer tempo, com validade a partir da data da comunicação da decisão.
- Diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, o participante terá direito legal de solicitar indenização. Esta pesquisa não terá nenhum custo para o seu participante.
- Os resultados individuais e coletivos do estudo serão repassados logo após o término das avaliações e ao final das análises dos marcadores genéticos, bem como serão divulgados o dia e o local da defesa deste estudo.
- Sua participação será muito importante, pois poderá contribuir em ações futuras de promoção e prevenção na saúde.

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO
PARTICIPANTE DA PESQUISA**

Eu,

_____ ,
abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa intitulada “Determinação de expansões trinucleotídicas CGG no gene *FMRI*”, como voluntário.

Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador Marc Alexandre Duarte Gigonzac sobre os procedimentos envolvidos na pesquisa, assim como os possíveis riscos e sobre os benefícios para a pesquisa.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. O pesquisador responsável garantiu-me sigilo e privacidade dos meus dados pessoais e os resultados encontrados no exame realizado.

Este documento foi elaborado em duas vias, rubricadas em todas as páginas e deve ser assinado ao seu término pelo convidado a participar da pesquisa ou seu representante legal, pelo pesquisador responsável e por duas testemunhas não participantes da pesquisa.

Goiânia, ____ de _____ de 20 ____.

*

Nome e Assinatura do participante da pesquisa / Responsável legal

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____.

Nome: _____.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do participante da pesquisa em participar desta.

Marc Alexandre Duarte Gigonzac
Pesquisador responsável

APÊNDICE 2

ARTIGOS CIENTÍFICOS

A. ARTIGO PUBLICADO

Electrophoresis (ISSN 0173-0835)

ELECTROPHORESIS

© WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Editor-in-Chief: Ziad El Rassi

Impact Factor: 2.482

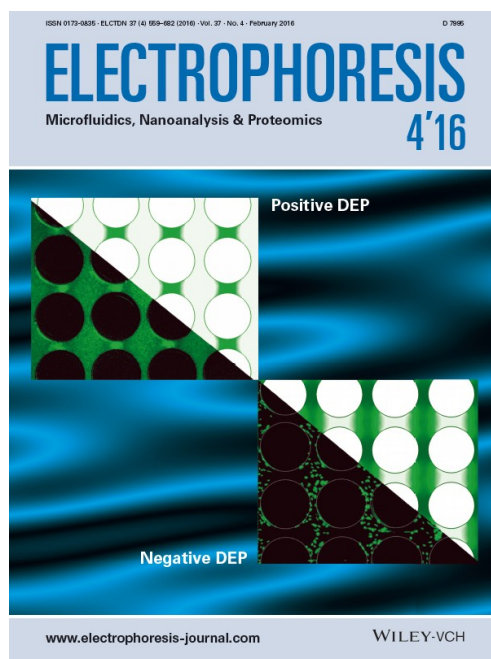
ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 26/75

(Chemistry Analytical); 38/77

(BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS)

Online ISSN: 1522-2683

Associated Title(s): [Journal of Separation Science](#)



Marc Alexandre Duarte
Gigonzac^{1,2,3,4}
Lilian Souza Teodoro⁴
Lysa Bernardes Minasi⁴
Thaís Cidália Vieira^{1,3,4}
Aparecido Divino da Cruz^{1,2,4}

Short Communication

Standardization of capillary electrophoresis for diagnosis of fragile X syndrome in the Brazilian public health system

¹LaGene-Laboratory of Human Cytogenetics and Molecular Genetics, Secretary of State for Health of Goiás (LACEN/SESGO), Goiânia, GO, Brazil

²Biotechnology and Biodiversity Graduate Program, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

³State University of Goiás (UEG), Goiânia, GO, Brazil

⁴Postgraduate Program in Genetics (MGene)/Replicon Research Center, Pontifical Catholic University of Goiás (PUC-GO), Goiânia, GO, Brazil

Received April 5, 2016

Revised September 12, 2016

Accepted September 14, 2016

Fragile X syndrome (FXS) is the most common cause of inherited intellectual disability. The most common etiology of the syndrome is expansion and methylation of a CGG trinucleotide at chromosome region Xq27.3 involving *FMR1* (fragile X mental retardation 1 gene). This disorder is commonly underdiagnosed in children and adolescents, given the high clinical variability. In Brazil, molecular diagnosis of FXS by CE does not exist in the public health system. The current standard for separation and identification of DNA fragment sizes is 50 cm CE, which is uncommon in public genotyping laboratories. This study describes the standardization of 36 cm CE for fragment analysis of samples from patients with intellectual disability suggestive of FXS. Genomic dsDNA was isolated from patients and amplified by PCR using the *FMR1* AmpliDeX[®] Kit. It was then possible to detect changes in repeat length of *FMR1*, such as full mutation and premutation. Thus, the proposed standardization proved to be effective for the diagnosis of FXS, permitting suitable genetic counseling for families. Inclusion of molecular testing such as this in the Brazilian public health service bridges the gap between available technologies and effective diagnosis, universalizing access to genetic testing in central Brazil.

Keywords:

FMR1 / Intellectual disability / Molecular diagnostic

DOI 10.1002/elps.201600333

Fragile X syndrome (FXS) (OMIM—online Mendelian inheritance in man #300624) is the most common heritable cause of mental retardation, affecting 1/4000 males and 1/6000–8000 females. The majority of cases are caused by a trinucleotide repeat expansion (CGG)_n in the first exon of *FMR1* (fragile X mental retardation 1) located in the Xq27.3 region. In FXS patients, the CGG repeat expansion can be accompanied by dsDNA methylation and transcriptional silencing of the *FMR1* allele, resulting in the absence of the *FMR1*-encoded protein and the onset of symptoms. Gene expansion can be variable. Although healthy individuals harbor between five and 55 copies of the CGG repeats, affected patients have more than 200 copies, characterizing “full mutation.” In addition, individuals who have between 55 and 200 copies of the CGG repeats are grouped as “premutation” [1, 2].

Women who carry the complete mutation show milder phenotypes compared to men. This situation could be related to a dosage compensation mechanism due to X chromosome

inactivation. Therefore, a large number of these women are misdiagnosed or even undiagnosed. Another feature of FXS is the occurrence of patients with a premutation, commonly undiagnosed for not presenting significant clinical features of the syndrome, but who may have children with full mutation owing to new expansions [3–5].

In this context, molecular analysis of patients with a clinical indication of FXS and relatives of individuals previously diagnosed with the syndrome becomes crucial. However, tools used in routine analysis, such as Southern blot, have technical limitations. New commercial kits for the amplification of *FMR1* and subsequent analysis by 50 cm CE in automated genetic analyzers, allows us to evaluate the occurrence of mutations and premutations in patients by precisely identifying the region containing the CGG repeats [6–9].

Unfortunately, diagnosis of FXS using 50 cm CE is not available in the public health system and patients should have to pay for tests or remain without a diagnosis. However, the Genetic Service of Human Cytogenetics and Molecular Genetics Laboratory (LaGene/LACEN) of public health, with support from the Replicon Laboratory in the Biology Department of Pontifical Catholic University, have standardized the separation and identification of *FMR1* dsDNA fragment size, using a Genetic Analyzer ABI3500 (Applied Biosystems, Vernon Hills, Illinois, USA) with 36 cm CE, which is more

Correspondence: Dra. Thaís Cidália Vieira, LaGene-Laboratory of Human Cytogenetics and Molecular Genetics, Secretary of State for Health of Goiás (LACEN/SESGO), Goiânia, GO, Brazil
E-mail: thaiscidalia@gmail.com
Fax: +55-62-34961443

Abbreviations: *FMR1*, fragile X mental retardation 1 gene; FXS, fragile X syndrome; OMIM, online Mendelian inheritance in man; TP, triplet repeat primed

Colour Online: See the article online to view Fig. 1 in colour.

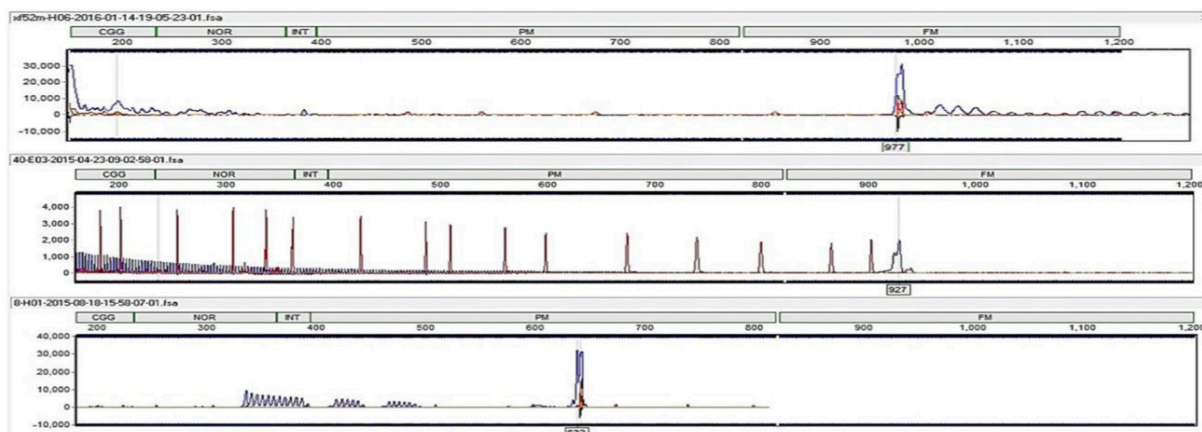


Figure 1. Electropherograms of three male patients with mutations in the *FMR1*. The size of the fragment was 977 bp with 249 CGG expansions (Fig. 1A), 927 bp with 233 CGG expansions (Fig. 1B), and a premutation fragment of 632 bp involving an expansion to 134 CGG copies (Fig. 1C).

commonly used in public genotyping laboratories like ours. Herein, we report a methodological standardization to resolve many of the technological challenges routinely hindering FXS testing. Therefore, the evaluation of trinucleotide expansions in *FMR1* has allowed the diagnosis of patients with intellectual disabilities in the public health system in central Brazil and the establishment of appropriate clinical correlations relevant for family orientation and genetic counseling.

The study was composed of 26 probands with a clinical diagnosis of intellectual disability and a request for *FMR1* investigation. Due to cognitive limitations and/or individual age, probands were not able to make the decision to enroll themselves in the study. Thus, their parents or guardians signed the consent forms approved by the Ethics Committee on Human Research at Pontifical Catholic University of Goiás (CEPPUC/GO), under the protocol number 769 126.

For each proband, a total of 5 mL of peripheral blood was drawn using a standard vacuum extraction blood-collecting system containing EDTA. Genomic dsDNA was isolated from whole blood using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions, and a dsDNA sample was diluted to a final concentration of 20 ng/μL.

The diluted dsDNA sample was amplified using AmpliDeX[®] *FMR1* PCR reagents (Asuragen, Austin, TX, USA) and the fragments were separated by CE using the ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Vernon Hills, Illinois, USA). After several calibration tests, the original protocol of using a 50-cm capillary with POP-7 polymer was modified and standardized by using a 36-cm capillary with POP-4 polymer, instead. For the capillary assay, we maintained the original prerun time of 180 s at 15 kV, reduced the injection time from 20 to 15 s and 2.5 to 2.0 kV, and the run time from 2400 s at 19.5 kV to 2200 s at 15 kV.

After completion of the run, the raw sequence data was uploaded to GeneMapper ID-X 1.4 software (Applied Biosystems, Vernon Hills, Illinois, USA) and analyzed with specific

standards for Fragile X fragments. The number of repeats per allele was calculated using a single Microsoft Excel table based on the size of the PCR product, excluding the flanking regions, divided by three nucleotides (CGG size). For all runs, we performed blind experiments using the AmpliDeX[®] *FMR1* PCR process control supplied by Asuragen (ref. 49513, lot. 16683) with seven reference peaks representing normal, premutated, and low concentration full mutated fragments (18, 30, 32, 56, 84, 115, and 206 CGG repeats). We performed the test in the same plate for each experiment to provide process control, and despite the supplier highlighting an acceptable range of up to three CGG repeats standard deviation, our analyses showed no difference in the specific size.

Our study reports the results of TP (triplet repeat primed) PCR of 26 unrelated individuals, nine females and 17 males, ranging in age from 3 to 18 years old. The normal CGG range observed was eight to 35 repeats, and 29, 28, and 30 repeats represented the most common alleles corresponding to 20, 11.5, and 11.5%, respectively, consistent with previous studies that reported the most common alleles as having 29 or 30 repeats [2, 10–14].

Two (7.7%) full mutations were identified in male individuals (Fig. 1). The size of the fragment was 977 bp with 249 CGG expansions (Fig. 1A), and 927 bp with 233 CGG expansions (Fig. 1B). Moreover, premutation was identified in another male patient who showed a fragment of 632 bp involving an expansion to 134 CGG copies (Fig. 1C).

Although FXS is recognized as the main cause of inherited intellectual disability, it is still an underdiagnosed disease in the State of Goiás and in the rest of Brazil. In this study, with standardized 36 cm CE, it was possible to identify three males with trinucleotide expansion in *FMR1*, despite the small sample size. People with premutations may not exhibit intellectual disability, but may exhibit other signs characteristic of Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome (OMIM #300623) or Premature Ovarian Failure (OMIM #311360) in women.

Over 98% of FXS cases are caused by CGG expansions and the remaining cases are attributed to deletions, point mutation variants, or direct methylation in the *FMR1* region [15]. Thus, tests that include sequencing and the detection of methylation in the promoter region of *FMR1* are needed for all patients with a negative TP PCR, especially if patients exhibit phenotypes suggestive of FXS [16]. In the current study, it was possible to amplify and characterize the CGG repeat number for all patients.

Our study, and that of Chen et al. [2], concluded that the *FMR1* TP PCR using CE is appropriate for FXS molecular diagnosis and demonstrated the important use of this technology. Tests based on TP PCR and CE technologies are relatively new and are likely to continue to evolve in the coming years. Standardizing the available technology for routine diagnostic analysis in a public health system has great value for families with no established etiology of intellectual disability. Finally, the identification of individuals with FXS through an accurate diagnostic method allows for the reduction of institutional costs, improvement of knowledge about the genetic condition, and effective genetic counseling for affected patients and families.

The authors acknowledge the financial support of the FAPEG, and thanks to LaGene-Secretary of Goiás State for Public Health, State University of Goiás (UEG), and Replicon Research Center, Pontifical Catholic University of Goiás (PUC-GO) for the assistance and support provided during the present study.

The authors have declared no conflict of interest.

1 References

- [1] Saldarriaga, W., Tassone, F., Gonzalez-Teshima, L. Y., Forero-Forero, J. V., Ayala-Zapata, S., Hagerman, R., *Columb. Med.* 2014, *45*, 190–198.
- [2] Chen, X., Wang, J., Xie, H., Zhou, W., Zhou, W., Wu, Y., Wang, J., Qin, J., Guo, J., Gu, Q., Zhang, X., Ji, T., Zhang, Y., Xiong, Z., Wang, L., Wu, X., Latham, G. J., Jian, Y., *BMC Pediatr.* 2015, *15*, 1–9.
- [3] Costa, S. S., Fonseca, A. M., Bagnoli, V. R., Vianna-Morgante, A. M., *Genet. Mol. Biol.* 2006, *29*, 423–428.
- [4] Capelli, L. P. T., Gonçalves, R. R. M., Leite, C. C., Barbosa, E. R., Nitrini, R., Vianna-Morgante, A. M., *Arq. Neuro-Psiquiatr.* [online]. 2010, *68*, 791–798.
- [5] Curinha, A., Braz, S. O., Pereira-Castro, I., Cruz, A., Moreira, A., *Nucleus* 2014, *5*, 508–519.
- [6] Nahhas, F. A., Monroe, T. J., Prior, T. W., Botma, P. I., Fang, J., Snyder, P. J., Talbott, S. L., Feldman, G. L., *Genet. Test Mol. Biomarkers* 2011, *16*, 187–192.
- [7] Seneca, S., Lissens, W., Endels, K., Caljon, B., Bonduelle, M., Keymolen, K., De Rademaeker, M., Ullmann, U., Haentjens, P., Van Berkel, K., Van Dooren, S., *J. Mol. Diagn.* 2012, *14*, 560–568.
- [8] Monaghan, K. G., Lyon, E., Spector, E. B., *Genet. Med.* 2013, *15*, 575–586.
- [9] Tang, G., Gudsruk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio O., Peterson, B. R., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., David S., *Neuron* 2014, *83*, 1131–1143.
- [10] Filipovic-Sadic, S., Sah, S., Chen, L., Krosting, J., Sekinger, E., Zhang, Z., Hagerman, P. J., Stenzel, T. T., Hadd, A., Latham, G. J., Tassone, F., *Clin. Chem.* 2010, *56*, 399–408.
- [11] Zhong, N., Ju, W., Xu, W., Ye, L., Shen, Y., Wu, G., Chen, S. H., Jin, R., Hu, X. F., Yang, A., Liu, X., Poon, P., Pang, C., Zheng, Y., Song, L., Zhao, P., Fu, B., Gu, H., Brown, W. T., *Am. J. Med. Gene* 1999, *84*, 191–194.
- [12] Tzeng, C. C., Cho, W. C., Kuo, P. L., Chen, R. M., *Diagn. Mol. Pathol.* 1999, *8*, 152–156.
- [13] Zhong, N., Liu, X., Gou, S., Houck, J. G. E., Li, S., Dobkin, C., Brown, T. W., *Am. J. Med. Genet.* 1994, *51*, 417–422.
- [14] Chiu, H. H., Tseng, Y. T., Hsiao, H. P., Hsiao, H. H., *J. Genet.* 2008, *87*, 275–277.
- [15] Strom, C. M., Crossley, B., Redman, J. B., Buller, A., Quan, F., Peng, M., McGinnis, M., Fenwick Jr, G., Sun, W., *Genet. Med.* 2007, *9*, 46–51.
- [16] Chen, L., Hadd, A. G., Sah, S., Houghton, J. F., Filipovic-Sadic, S., Zhang, W., Hagerman, P. J., Tassone, F., Latham, G. J., *Genet. Med.* 2011, *13*, 528–538.

B. ARTIGO PARA SUBMISSÃO

 Springer

Child & School Psychology

 2015 Impact Factor

3.493

Journal of Autism and Developmental Disorders

Editor-in-Chief: Fred R. Volkmar

ISSN: 0162-3257 (print version)

ISSN: 1573-3432 (electronic version)

Journal no. 10803



Brief Report: Genomic Alteration Research in Patient with Idiopathic Mental Disability

Marc Alexandre Duarte Gigonzac^{1,2}, Thaís Cidália Vieira^{1,4}, Fabiana Gonçalves dos Reis³, Irene Plaza Pinto², Lílian Fonseca Teodoro⁴, Daniela de Melo e Silva^{3,4}, Aparecido Divino da Cruz^{1,2,3,4}

¹ LaGene- Laboratory of Human Cytogenetics and Molecular Genetics, Secretary of State for Health of Goiás (LACEN/SESGO), Goiânia, GO, Brazil.

² Biotechnology and Biodiversity Graduate Program, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

³ Genetics and Molecular Biology Graduate Program, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

⁴ Graduate Program in Genetics (MGene)/Replicon Research Center, Catholic University of Goiás (PUC-GO) Goiânia, GO, Brazil.

¹ LaGene- Laboratory of Human Cytogenetics and Molecular Genetics, Secretary of State for Health of Goiás (LACEN/SESGO), Goiânia, GO, Brazil.

² Biotechnology and Biodiversity Graduate Program, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil,

³ Genetics and Molecular Biology Graduate Program, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil,

⁴ Graduate Program in Genetics (MGene)/Replicon Research Center, Catholic University of Goiás (PUC-GO) Goiânia, GO, Brazil

⁵ Biomedical of Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil,

ABSTRACT

The Intellectual Disability (ID) is one of the most prevalent development disorders, which appears before 18 years of age, characterized by adaptive and cognitive limitations with significant impairment in intellectual functioning. Due to its heterogeneity, the etiology of ID is variable and difficult to identify, often referred to as Idiopathic Intellectual Disability. Several studies highlight the genetic changes as factors that significantly contribute to this condition. The aim of this study was to investigate the genomic cause of Intellectual Disability Idiopathic in an individual with clinical indication of developmental delay. Initially we conducted a study with G cytogenetic banding and Ikaros® software analysis (Meta systems Corporation, Germany) to identify potential chromosomal abnormalities. Then the molecular analysis of the promoter region of the *FMRI* gene on chromosome Xq27 was performed by capillary electrophoresis genetic analyzer ABI3500 (Applied Biosystems®) to check possible CGG expansions. Subsequently, the investigation for SNPs and CNVs via Chromosomal Analysis of Microarrays (CMA) was tested with high density CytoScan™ HD platform Array (Affymetrix, USA). The karyotype 46,XX did not provide numerical and/or structural changes detectable by G banding. However, through molecular analysis was possible to identify a single allele with 28 repeats in *FMRI*, indicating the absence of the other allele on chromosome X. The analysis by microarray the patient presented a *de novo* microdeletion in Xq27.3-q28 of 4,176 kb region. The microdeletion involving 34 genes, and of these, five have direct relation to the phenotype of DI and neurological disorders, including the *FMRI* gene. This study reinforces the importance of holding the chromosomal microarray analysis as a diagnostic method in patients with idiopathic intellectual disabilities, contributing to the description of rare chromosomal changes or not previously described in the literature

KEYWORDS: Intellectual and developmental Disability, Microarrays, Chromosomal deletions, Copy number/structural variation

INTRODUCTION

The Intellectual Disability (ID) is one of the most prevalent disorders of development, which appears before 18 years of age, characterized by adaptive and cognitive limitations with significant impairment in intellectual functioning. Due to its heterogeneity, the etiology of DI is variable and difficult to identify, often referred to as idiopathic Intellectual Disabilities. Among known factors related to the DI, there is the Fragile X Syndrome (FXS), characterized as the most common cause of Intellectual Disability (ID) and the second inherited genetic etiology, with an estimated prevalence of 1/4000 males and 1 / 6-8000 women. The most common molecular changes in FXS is associated with a CGG trinucleotide expansion and sequences hypermethylation in promoter region of the FMR1 (Fragile X Mental Retardation-1) located in the region Xq27.3. The symptoms result from the non expression of FMRP protein (Fragile X Mental Retardation Protein), essential for the growth of dendrites and synaptic function. This syndrome is often underdiagnosed in children and adolescents given the high phenotypic variability of patients and diagnostic laboratory complex and costly. The aim of this study was to investigate the genomic cause of idiopathic DI in an individual with clinical indication of developmental delay.

MATERIAL AND METHODS

The B. D. Patient, female, 11 years old, brunette, 47 kg, height 1.55 m, presenting developmental delay (ADNPM), was referred to LAGENE / LACEN Laboratory - SES / GO by your doctor of the public health system (Figure 1). Born in 2001, 3200 kg, 53 cm long, did not cry at birth, not sucked, he had cyanosis and was slow to open his eyes. A few days after receiving high showed a jaundice.



Figure 1: Side and front facial phenotype of the patient B. D.

The father, 39, painter, reported sporadic alcohol consumption. The mother had urine infection of the fifth to the sixth month, was in great pain and bleeding in the stomach over a period of about 6 months, a fact that led to hospitalization. She has a sister 17 years and brother 14 years, both without known genetic diseases or physical and mental disorders. It has two cousins on his father with autism and a cousin on his mother with a valve in the head.

RESULTS AND DISCUSSION

The cytogenetic analysis by G banding patient who did not show numerical and / or structural changes, and then forwarded to molecular diagnosis of Fragile X syndrome was performed. Genomic DNA was isolated from whole blood samples and then amplified by PCR using the set of PCR Commercial reagents AmplideX® FMR1 (Asuragen, Austin, TX, USA). The amplification products were separated by capillary electrophoresis in ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Vernon Hills, Illinois, USA), revealing the presence of a normal single allele with 28 repeats (314pb) (Figure 2).

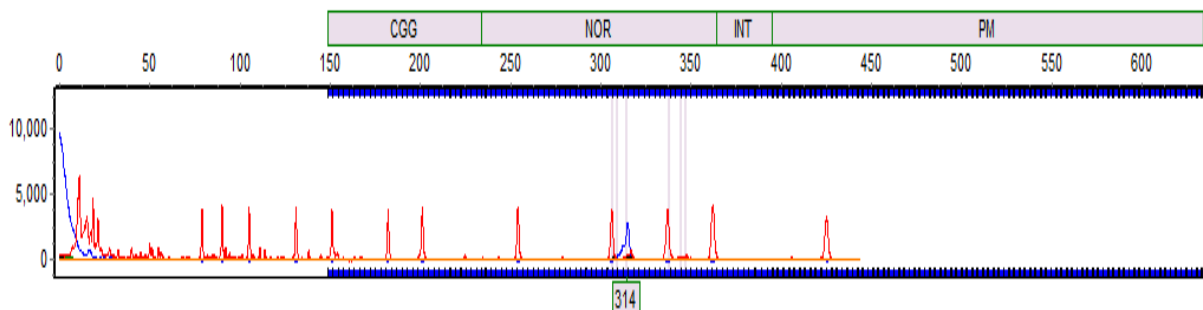


Figure 2: electropherogram with the presence of one allele of 314 bp of the FMR1 gene

By presenting a normal karyotype register (46, XX) but only a single allele for the promoter region of the FMR1 present on the X chromosome, he suspected a possible mutation involving the flanking region of the gene. Thus, the sample was referred to Chromosome Microarray Analysis - CMA (Chromosomal Microarray Analysis), the high density HD CytoScan™ Array platform (Affymetrix, USA) having CNVs 2,696,550 markers, non-1953246 polymorphic markers and 743,304 SNPs markers. The result was analyzed by Chas software - Chromosome Analysis Suite version 2.0 (Affymetrix, USA), revealing a microdeletion again in Xq27.3q28 4,176 kb region (Figure 3).

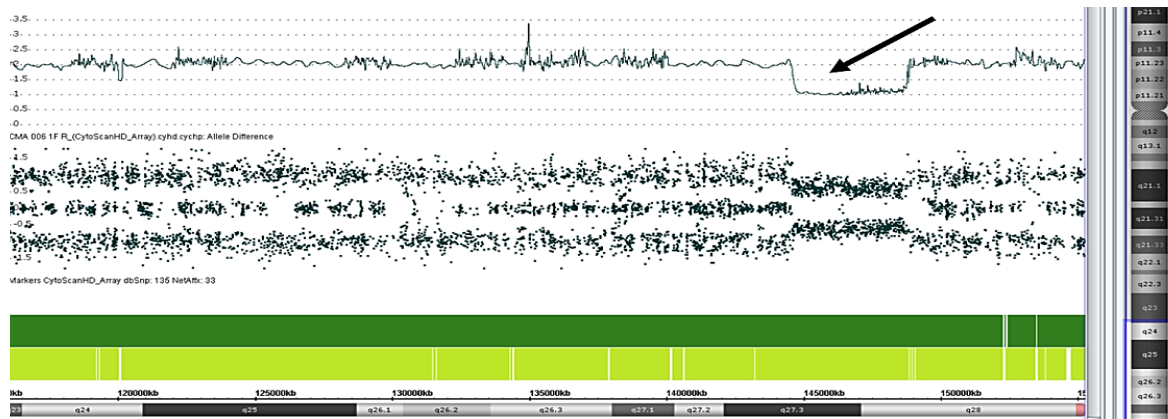


Figure 3: 4.176kb microdeletion in Xq27.3q28 observed by Chas software (Affymetrix, USA)

The microdeletion observed in patient BD 34 involved genes, and of these, according to the DGV (Data Base of Genomic Variants) and OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man), five genes (TMEM185A, TMEM257, FMR1, IDS and FMR2) they are reported as candidate genes to the phenotype of intellectual disability. According HAASE et al. (2013) and Pratte-Santos et al. (2016), most of the monogenic causes related to intellectual disability are found on the X chromosome, and the CGG expansion in the promoter region of the FMR1 gene the most important etiology.

According to Luo et al. (2016), the fragile X syndrome can be caused by other changes beyond CGG expansions as complete deletion of the gene. In this report, the amplification FMR1 PCR alone showed no diagnosis capacity, since it allows only infer the extent of trinucleotide expansions. Thus, despite the changes involve the FMR1, it highlights the importance of the examination by the JMC to understand the phenotype displayed by the patient.

CONCLUSION

The syndrome of the fragile X (FXS) is one of the most studied forms of hereditary DI in humans, usually associated with CGG expansions in FMR1. The availability of more robust or complementary techniques in intellectual disability assessment is a need still rather neglected in Brazil. Technical higher solvability, such as CMA and sequencing has brought answers hitherto not possible. The incorporation of these tools in the diagnosis of DI practice constitutes a major challenge for public health and should be taken into account in health promotion policies.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Chen, L., Hadd, A. G., Sah, S., Houghton, J. F., Filipovic-Sadic, S., Zhang, W., ... & Latham, G. J. (2011). High-resolution methylation polymerase chain reaction for fragile X analysis: evidence for novel *FMR1* methylation patterns undetected in Southern blot analyses. *Genetics in Medicine*, *13*(6), 528-538.
- Franca, Wendy CSC et al. Fragile X Syndrome and Epilepsy: case report. *J Epilepsy*, v. 20, n. 3, p. 141-143, 2014.
- Haase, Vitor Geraldi; DE AGUIAR, Marcos José Burle; CARVALHO, Maria Raquel Santos. Avaliação de estratégia de diagnóstico neuropsicológico e genético-molecular dos Transtornos do Desenvolvimento Cognitivo (Retardo Mental). Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG-1ª ed., v. 1, n. 1, 2013.
- Hagerman, R. J., Rivera, S. M., & Hagerman, P. J. (2008). The fragile X family of disorders: a model for autism and targeted treatments. *Current Pediatric Reviews*, *4*(1), 40-52.
- Hantash, F. M., Goos, D. G., Tsao, D., Quan, F., Buller-Burckle, A., Peng, M., Strom, C. M. (2010). Qualitative assessment of *FMR1* (CGG) n triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening. *Genetics in Medicine*, *12*(3), 162-173.
- Jin, P., & Warren, S. T. (2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human molecular genetics*, *9*(6), 901-908.
- Lozano, R., Rosero, C. A., Hagerman, R. J. (2014). Fragile X spectrum disorders. *Intractable & rare diseases research*, *3*(4), 134-146.
- Luo, S. Y., Wu, L. Q., & Duan, R. H. (2016). Molecular medicine of fragile X syndrome: based on known molecular mechanisms. *World Journal of Pediatrics*, *12*(1), 19-27.
- Luo, S. Y., Wu, L. Q., & Duan, R. H. (2016). Molecular medicine of fragile X syndrome: based on known molecular mechanisms. *World Journal of Pediatrics*, *12*(1), 19-27.
- McCary, L. M., & Roberts, J. E. (2013). Early identification of autism in fragile X syndrome: a review. *Journal of Intellectual Disability Research*, *57*(9), 803-814.
- Murray, A., Macpherson, J. N., Pound, M. C., Sharrock, A., Youings, S. A., Dennis, N. R. & Jacobs, P. A. (1997). The role of size and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Human molecular genetics*, *6*(2), 173-184.
- Nahas, F. A., Monroe, T. J., Prior, T. W., Botma, P. I., Fang, J., Snyder, P. J., Feldman, G. L. (2012). Evaluation of the human fragile X mental retardation 1 polymerase chain reaction reagents to amplify the *FMR1* gene: testing in a clinical diagnostic laboratory. *Genetic testing and molecular biomarkers*, *16*(3), 187-192.
- Pratte-Santos, Rodrigo et al. Análise de anomalias cromossômicas por CGH-array em pacientes com dismorfias e deficiência intelectual com cariótipo normal. *Einstein* (16794508), v. 14, n. 1, 2016.
- Preto, Dalyir et al. Clinical and molecular implications of mosaicism in *FMR1* full mutations. *Frontiers in genetics*, v. 5, p. 318, 2014.
- Steiner, C. E., Guerreiro, M.M., Marques-de-Faria, A. P. & Lopes-Cendes, I. (2005). Laboratorial diagnosis of fragile-X syndrome: experience in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *63*(3a), 564-570.
- Suhl, J. A., & Warren, S. T. (2015). Single-Nucleotide Mutations in *FMR1* Reveal Novel Functions and Regulatory Mechanisms of the Fragile X Syndrome Protein FMRP. *Journal of Experimental Neuroscience*, *2015*(Suppl. 2), 35-41.
- Wang, L. W., Berry-Kravis, E., & Hagerman, R. J. (2010). Fragile X: leading the way for targeted treatments in autism. *Neurotherapeutics*, *7*(3), 264-274.

9. ANEXOS

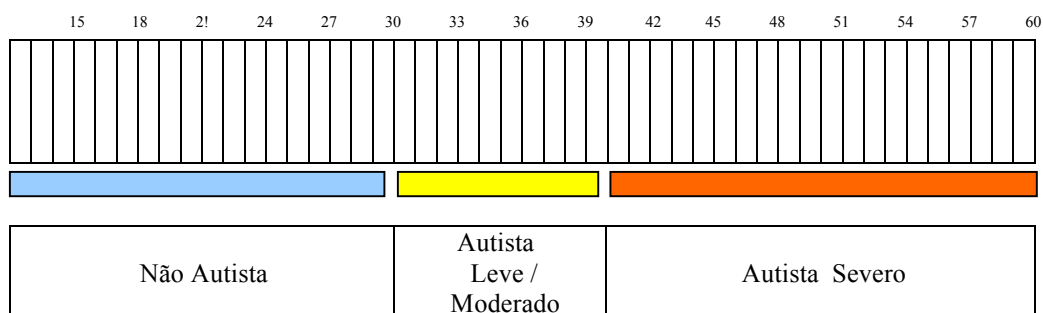
ANEXO I

CARS

(CHILDHOOD AUTISM RATING SCALE)

ESCALA DE COTAÇÃO			
	DOMÍNIOS	PONTUAÇÃO	OBSERVAÇÕES
I	Relação com pessoas	1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 3,5 - 4	
II	Imitação		
III	Resposta emocional		
IV	Uso corporal		
V	Uso de objetos		
VI	Adaptação à mudança		
VII	Resposta visual		
VIII	Resposta auditiva – ao som		
IX	Resposta ao paladar, olfato e tato		
X	Medo ou ansiedade		
XI	Comunicação verbal		
XII	Comunicação não verbal		
XIII	Nível de atividade		
XIV	Nível e consistência da resposta intelectual		
XV	Impressão global		
COTAÇÃO TOTAL:			

COTAÇÃO TOTAL



Nome : _____	
Data de Nascimento: ____ / ____ / ____.	Idade: ____ anos.
Data de observação: ____ de ____.	

I – RELAÇÃO COM AS PESSOAS

1 - Sem evidência de anomalia ou dificuldade na relação com as pessoas.

Alguma timidez, agitação ou aborrecimento pode ser observada na avaliação, mas não um nível superior do que é esperado para uma criança da mesma idade.

2 - Relação ligeiramente anormal.

Evita olhar nos olhos do adulto, evita o adulto ou zanga-se se a interacção é forçada, excessivamente tímido, não responde para o adulto como uma criança da sua idade, ou mais ligada aos pais do que é esperado.

3 - Relação moderadamente anormal.

A criança mostra-se distante ignorando os adultos e parecendo ausente por momentos. São necessários esforços e persistência para prender a sua atenção. O contacto iniciado pela criança e a qualidade é pouco pessoal.

4 - Relação severamente anormal.

A criança está distante e desinteressada do que o adulto está a fazer. Quase nunca inicia ou responde ao contacto com o adulto. Somente um esforço mais persistente consegue prender a sua atenção.

Observações:

II – IMITAÇÃO

1 - Imitação apropriada.

A criança é capaz de imitar sons, palavras e movimentos de forma adequada às suas capacidades.

2 - Imitação ligeiramente anormal.

Imita comportamentos simples como bater palmas ou sons simples na maior parte das vezes. Ocasionalmente pode imitar somente depois de muito estimulado ou com algum tempo de atraso.

3 - Imitação moderadamente anormal.

Imita só parte do tempo, requerendo uma grande persistência e ajuda do adulto. Pode frequentemente imitar após algum tempo de atraso.

4 - Imitação severamente anormal.

Raramente ou nunca imita sons, palavras ou movimentos mesmo com a ajuda do adulto.

Observações:

III – RESPOSTA EMOCIONAL

1 - Respostas emocionais adequadas à idade e à situação.

A criança mostra um tipo e um grau de resposta adequada, revelada por alteração na expressão facial, postura e modo/atitude.

2 - Resposta emocional ligeiramente anormal.

Ocasionalmente desenvolve um tipo ou grau de reacção emocional desajustada. As reacções muitas vezes não estão relacionadas com os objectos ou acontecimentos à sua volta.

3 - Resposta emocional moderadamente anormal.

Tipo e ou grau de resposta desajustada. Reacções muito apagadas ou excessivas e outras vezes não relacionadas com a situação. Pode gritar, rir, sem motivo aparente.

4 - Resposta emocional severamente anormal.

Raramente a resposta é adequada á situação; o humor mantém-se independentemente da alteração dos acontecimentos. Por outro lado, pode manifestar diferentes emoções num curto espaço de tempo, mesmo que nada se altere.

Observações:

IV- MOVIMENTOS DO CORPO

1 - Movimento do corpo apropriado à idade.

Move-se com a facilidade, agilidade e coordenação da criança normal na mesma idade.

2 - Movimento do corpo ligeiramente anormal.

Algumas peculiaridades podem estar presentes, tais como uma criança desajeitada, movimentos repetitivos, coordenação pobre, ou aparecimento raro de movimentos invulgares referidos no ponto 3.

3 - Movimento do corpo moderadamente anormal.

Notados comportamentos nitidamente estranhos e não usuais para esta idade. Pode incluir movimentos finos dos dedos, postura peculiar dos dedos ou corpo, auto-agressão, balanceio, rodopiar, enrolar/entrelaçar de dedos, marcha em bicos de pés.

4 - Movimento do corpo severamente anormal.

Movimentos descritos no ponto 3 mais frequentes e intensos. Estes comportamentos persistem, muito embora se proibam e se envolva a criança noutras actividades.

Observações:

V- UTILIZAÇÃO DOS OBJETOS

1 - Interesse e uso apropriados de brinquedos ou objetos.

A criança mostra um interesse normal em objectos ou brinquedos apropriados para o seu nível e usa-os de um modo adequado.

2 - Interesse e uso ligeiramente inapropriados de objetos ou brinquedos.

Pode mostrar menos interesse que o normal num brinquedo ou brincar com ele de modo infantil, como batendo com ele ou levando-o à boca numa idade em que este comportamento já não é aceitável.

3 - Interesse e uso moderadamente inapropriados de objetos ou brinquedos.

Mostra pouco interesse em brinquedos e objetos, ou pode estar preocupado em os utilizar de um modo anómalo e estranho. Pode focar a atenção numa parte insignificante destes, ficar fascinado com a reflexão de luz do objecto, mover repetidamente uma parte do objecto em particular ou brincar só com um objecto excluindo os outros. Este comportamento pode ser pelo menos parcial ou temporariamente modificado.

4 - Interesse e uso severamente inapropriados de objetos ou brinquedos.

Comportamento semelhante ao ponto 3 mas de um modo mais frequente e intenso. É muito difícil desligar-se destas actividades uma vez nela embrenhada, sendo muito difícil alterar esta utilização desajustada.

Observações:

VI- ADAPTAÇÃO À MUDANÇA

1 - Adaptação à mudança adequada.

Pode reagir à mudança de rotina, mas aceita-a sem stress desajustado.

2 - Adaptação à mudança ligeiramente anormal.

Quando o adulto tenta mudar de tarefa esta pode querer continuar na mesma tarefa ou usar o mesmo material, mas consegue-se desviar a sua atenção facilmente. Por exemplo, pode-se zangar se é levada a um supermercado diferente ou se fez um percurso diferente da escola, mas acalma-se facilmente.

3 - Adaptação à mudança moderadamente anormal.

Resiste activamente às mudanças de rotina. Quando se pretende alterar uma actividade, tenta manter a anterior, sendo difícil de dissuadir. Por exemplo, insiste em recolocar a mobília que foi mudada. Fica zangada e infeliz quando uma rotina estabelecida é alterada.

4 - Adaptação à mudança severamente anormal.

Quando ocorrem mudanças mostra uma reacção intensa que é difícil de eliminar. Se a mudança é imposta, fica extremamente zangada, não colaborante respondendo com birras.

Observações:

VII- RESPOSTA VISUAL

1 - Resposta visual adequada à idade.

O comportamento visual é normal. A visão é usada em conjunto com os outros sentidos para explorar novos objectos.

2 - Resposta visual ligeiramente anormal.

Tem de ser lembrada de tempos a tempos para olhar para os objectos. Pode estar mais interessada em olhar para um espelho ou luzes que uma criança da mesma idade e, ocasionalmente, ficar com olhar ausente. Pode também evitar o contacto visual.

3 - Resposta visual moderadamente anormal.

Tem de ser lembrada frequentemente para olhar o que está a fazer. Pode ficar com o olhar fixo, ausente, evitar olhar nos olhos das pessoas, olhar para os objectos de um ângulo estranho ou levá-los muito perto dos olhos embora os vendo normalmente.

4 - Resposta visual severamente anormal.

Evita constantemente olhar para as pessoas ou certos objectos e pode mostrar formas extremas de peculiaridades visuais descritas acima.

Observações:

VIII- RESPOSTA AO SOM

1 - Resposta ao som adequada à idade.

O comportamento auditivo é normal. A audição é utilizada em conjunto com os outros sentidos, como a visão e o tacto.

2 - Resposta ao som ligeiramente anormal.

Alguma falta de resposta para alguns sons ou uma resposta ligeiramente exagerada para outros. Por vezes, a resposta ao som pode ser atrasada e os sons podem ocasionalmente necessitar de repetição para prender a atenção da criança. Pode por vezes distrair-se por sons externos.

3 - Resposta ao som moderadamente anormal.

A resposta ao som varia muitas vezes. Muitas vezes ignora um som nos primeiros minutos em que é desencadeado. Pode assustar-se por sons do dia-a-dia tapando os ouvidos quando os ouve.

4 - Resposta ao som severamente anormal.

A criança hiper ou hiporeage de um modo externo independentemente do tipo de som.

Observações:

IX - RESPOSTAS AO PALADAR, OLFATO E TATO

1 - Resposta normal ao paladar, olfato e tato.

Explora objectos novos de um modo apropriado à idade tocando-lhes e observando-os. O paladar e o olfacto podem ser utilizados quando apropriado como nos casos em que o objecto é parecido com algo que se come. Reagem a estímulos dolorosos menores do dia-a-dia decorrentes de quedas, pancadas e beliscões, expressando desconforto mas não de um modo excessivo.

2 - Uso e resposta ligeiramente anormal do paladar, olfato e tato.

Persiste em levar objectos à boca, mesmo quando as crianças da sua idade já ultrapassaram essa fase. Pode por vezes cheirar ou tomar o gosto de objectos não comestíveis. Pode ignorar ou reagir excessivamente a um beliscão ou estímulo doloroso ligeiro, que a criança normal expressa apenas como ligeiro desconforto.

3 - Uso e resposta moderadamente anormal do paladar, olfato e tato.

Pode estar moderadamente preocupada em tocar, cheirar ou saborear objectos ou pessoas. Pode mostrar uma reacção moderadamente anormal à dor reagindo muito ou pouco.

4 - Uso e resposta severamente anormal do paladar, olfato e tato.

Mostra-se preocupada em cheirar, saborear ou tocar objectos mais pela sensação do que pela expressão ou uso normal do objecto. Pode ignorar completamente a dor ou reagir fortemente a algo que apenas motiva desconforto ligeiro.

Observações:

X - MEDO OU ANSIEDADE

1 - Medo ou ansiedade normais.

O comportamento da criança é adequado à idade e à situação.

2 - Medo ou ansiedade ligeiramente anormal.

Revela ocasionalmente medo ou ansiedade que é ligeiramente desajustada,

3 - Medo ou ansiedade moderadamente anormal.

A resposta de mesmo desencadeada é excessiva ou inferior ao esperado em idêntica situação mesmo por uma criança mais nova.

Pode ser difícil de entender o que a desencadeou sendo também difícil de a confortar.

4 - Medo ou ansiedade severamente anormal.

Os medos persistem mesmo após repetidas experiências com situações ou objectos desprovidos de perigo. Pode parecer amedrontada durante toda a consulta sem qualquer motivo. Pelo contrário pode não mostrar qualquer receio a situações como cães desconhecidos ou tráfego, que crianças da mesma idade evitam.

Observações:

XI - COMUNICAÇÃO VERBAL

1 - Normal em relação com a idade e situação.

2 - Comunicação verbal ligeiramente anormal.

Atraso global da linguagem. Muita linguagem tem sentido. Contudo, ecolálias e troca de pronomes ocorrem ocasionalmente quando já ultrapassada a idade e quem isso normalmente ocorre. Muito ocasionalmente são utilizadas palavras peculiares e jargon.

3 - Comunicação verbal moderadamente anormal.

A linguagem pode estar ausente. Se presente, pode ser uma mistura de alguma linguagem com sentido e outra peculiar como o jargon, ecolália a troca de pronomes. Alguns exemplos incluem repetição sem fins comunicativos, de reclames de TV, reportagens do tempo e jogos. Quando é utilizada linguagem com sentido pode incluir peculiaridades como questões frequentes ou preocupação com tópicos particulares.

4 - Comunicação verbal severamente anormal.

Não é utilizada linguagem com sentido. Em vez disso pode ter gritos, sons esquisitos ou parecidos com animais ou barulhos complexos simulando linguagem. Pode mostrar uso persistente e bizarro de palavras ou frases reconhecíveis.

Observações:

XII - COMUNICAÇÃO NÃO VERBAL

1 - De forma adequada à idade e situação.

2 - Uso ligeiramente anormal da comunicação não verbal.

A comunicação não verbal utilizada é imatura. Pode apontar, por exemplo, vagamente para o que pretende, em situações em que uma criança normal da mesma idade aponta mais especificamente.

3 - Uso moderadamente anormal da comunicação não verbal.

É geralmente incapaz de exprimir as suas necessidades ou desejos de um modo não verbal, e é geralmente incapaz de entender a comunicação não verbal dos outros. Pode levar o adulto pela mão ao objecto desejado, mas é incapaz de exprimir o seu desejo por gesto ou apontando.

4 - Uso severamente anormal da comunicação não verbal.

Usa somente gestos peculiares e bizarros sem significado aparente e não parece compreender o significado dos gestos e expressões faciais dos outros.

Observações:

XIII – NÍVEL DE ATIVIDADE

1 - Normal em relação com a idade e circunstâncias.

A criança não é nem mais nem menos activa do que uma criança normal, da mesma idade, e nas mesmas circunstâncias.

2 - Nível de atividade ligeiramente anormal

Pode ser ligeiramente irrequieta ou lenta. O nível de actividade desta só interfere ligeiramente com a sua realização. Geralmente é possível encorajar a criança a manter o nível de actividade adequado.

3 - Nível de atividade moderadamente anormal

Pode ser muito activa e muito difícil de conter. À noite parece ter uma energia ilimitada e não ir rapidamente para a cama.

Pelo contrário, pode ser uma criança completamente letárgica, sendo necessário um grande esforço para a fazer mobilizar. Podem não gostar de jogos que envolvam actividade física parecendo muito preguiçosos.

4 - Nível de atividade severamente anormal

Mostra-se extremamente activa ou inactiva, podendo transitar de um extremo para outro. Pode ser muito difícil orientar a criança. A hiperactividade quando presente ocorre virtualmente em todos os aspectos da vida da criança, sendo necessário um controle constante por parte do adulto. Se é letárgica é extremamente difícil despertá-la para alguma actividade e o encorajamento do adulto é necessário para que inicie a aprendizagem ou execute alguma tarefa.

Observações:

XIV - NÍVEL E CONSISTÊNCIA DA RESPOSTA INTELECTUAL

1 - Inteligência normal e razoavelmente consistente nas diferentes áreas.

Tem uma inteligência sobreponível às outras da sua idade e não apresenta uma incapacidade invulgar ou outro problema.

2 - Função intelectual ligeiramente anormal

Não é tão desperta como as da sua idade e as suas capacidades parecem do mesmo modo atrasadas em todas as áreas.

3 - Função intelectual moderadamente anormal

No global a criança não é tão esperta como as da sua idade; contudo em uma ou mais áreas pode funcionar próximo do normal.

4 - Função intelectual severamente anormal

Enquanto a criança não é tão esperta como as outras da sua idade, pode funcionar melhor que uma criança da sua idade em uma ou mais áreas. Pode ter capacidades invulgares como talento especial para a música, arte ou facilidade particular com os números.

Observações:

XV - IMPRESSÃO GLOBAL

1 - Sem autismo

A criança não mostra qualquer sintoma característico do autismo.

2 - Autismo ligeiro

A criança revela poucos sintomas ou somente um grau ligeiro de autismo.

3 - Autismo moderado

A criança mostra alguns sintomas ou um grau moderado de autismo.

4 - Autismo severo

A criança revela muitos sintomas ou um grau extremo de autismo.

ANEXO II



Rights & Permissions

Certificate of Limited-use License

License #:

70084231

Date:

August 10, 2015

Principal Investigator's name and title:

Aparecido Divino da Cruz, PhD

Name of the Assessment:

Autism Diagnostic Interview- Revised (ADI-R)

Permitted number of uses:

100

Description of the study:

Examining children with autism spectrum.

Ref. terms dated 29July'15.

Method of administration:

Via paper-based administration with hand-scoring.

The required copyright notice that must be affixed in its entirety to each reprint/viewing of the assessment:

Material from the ADI-R copyright © 2003 by Western Psychological Services. Authorized research translation reprinted by A. Cruz, Research Center Replicon, for specific, limited research use under license of the publisher, WPS, 625 Alaska Avenue, Torrance, California 90503, U.S.A. (rights@wpspublish.com). No additional reproduction, in whole or in part, by any medium or for any purpose, may be made without the prior, written authorization of WPS. All rights reserved.

WPS Rights & Permissions

625 Alaska Avenue, Torrance, CA 90503 t 800.648.8857 or 424.201.8800 f 424.201.6950 rights@wpspublish.com