

**RAQUEL GALVÃO SILVA**

**DETECCÃO DE EXPANSÕES CGG NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO  
E VERIFICAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DO X FRÁGIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da  
Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do grau de  
Mestre em Genética.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Maurício da Silva**

**Co-Orientadora: Paula Stelita Cruz de Arruda - MSc**

**RECIFE**

**2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO DE

**RAQUEL GALVÃO SILVA**

**“Detecção de Expansões CGG na População do Estado de Pernambuco e  
Verificação de sua Relação com a Síndrome do X Frágil”**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA MOLECULAR

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata RAQUEL GALVÃO SILVA aprovada.

Recife, 02 de março de 2004.

---

Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva, (Doutor, UFPE)

---

Dra. Tânia Tassinari Rieger, (Doutora, UFPE)

---

Dra. Rosilda dos Santos Silva, (Doutora, UFPE)

**Aos meus pais, Inês e Pedro, que  
sempre me apoiaram em todas as  
etapas da minha vida, me  
oferecendo dedicação, confiança,  
amor, respeito, amizade ...**

## **Agradecimentos**

Meu obrigada a todos aqueles que me incentivaram, me deram força, em todas as etapas da minha vida, sejam aqueles que estiveram presente em todos os momentos ou aqueles que mesmo sem perceber com um pequeno gesto de carinho me ajudaram bastante.

Meu muito obrigada:

Aos meus pais, pois sem a ajuda e o incentivo oferecidos, a realização deste trabalho não seria possível, dedico a vocês toda minha admiração, respeito, amor, confiança...

A minhas queridas irmãs, Fabiana e Catarina, que eu sei que apesar de tudo sempre torceram e torcerão por mim, de forma explícita ou não.

A toda minha família, meus tios e primos, pelo apoio na minha formação como ser humano, obrigada pelo carinho, respeito... Especialmente para os primos Anginha, Adriana, Andréa, Valéria, Fred, Cida, Paulo, Renatinho e Alexandre que sempre torceram por mim e acompanharam tudo de perto. E as tias Stela, Lenita e Salomé, muito obrigada!

A meu orientador Professor Dr. Luiz Maurício pela confiança em mim depositada.

A minha co-orientadora Dra. Paula Arruda pela idéia e pela força que me foi dada desde o início.

A Edileine por toda ajuda nos trabalhos do laboratório, e a Professora Rosilda por também ter me recebido. Obrigada!

A todos do Laboratório de Genética Molecular Humana, D. Luzinete, Patrícia, Henrique, Simone, Camila, Cláudio, Glorinha, Marcela, a prima e amiga Germana, Deni, Ana Cláudia, Ramiro, Germano e em especial a Rodrigo, Jeymesson pela amizade.

Meu muito obrigada a todos os amigos da UERJ, Beth, Flávia, Karla, Socorro, Jussara, Aline, Cláudia, Raquel e Stênio, em especial a Dra. Márcia e a Dra. Cíntia, não poderiam ter me recebido melhor.

Um obrigada especial a Maria Antônia uma nova, mas grande amiga, amizade construída na minha estada no Rio de Janeiro durante a realização deste curso, obrigada por ter me recebido em sua casa, pelas nossas conversas e pela confiança.

A todos os meus colegas da turma de mestrado, por terem sofrido e sobrevivido junto comigo, em especial para Alessandra, Christian e Amaro.

A todos os amigos que sempre torceram por mim, em especial a Nathaly que me acompanha desde a infância. Nathy obrigada por tudo!

A amiga Marise eu agradeço, por toda força desde a época da graduação onde foi minha co-orientadora, “minha tia da genética molecular”.

A minha sempre professora Maria do Carmo, pois foi ela quem me deu a oportunidade de trabalhar no meu primeiro laboratório de genética molecular, e a “Tia” Cris, obrigada!

As minhas amigas Catarina, Bianca, Cláudia Crasto, Jemima, Soraya, Gerlane, Mônica, Cecília, Keila, Cláudia e Neuza Jannuzzi, aos amigos, Felipe Gomes, Henrique, Thiago Salazar, Isaac, Rodrigo Lebre, Luciano Benevides, André Ribeiro e Carlinhos que mesmo sem perceber me ajudaram na realização desse trabalho, me incentivando, com palavras ou gestos de carinho ou simplesmente me dedicando um tempinho de suas vidas. Obrigada!

A uma pessoa que teve um papel especial na minha vida Alex Silva.

A CAPES e LGMH, pelo apoio financeiro.

A todos vocês meu muito obrigada!

## Sumário

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DA LITERATURA.....	14
O GENE FRAXA E A PROTEÍNA FMRP.....	15
PADRÃO DE HERANÇA DA SÍNDROME DO X FRÁGIL.....	15
RETARDO MENTAL LIGADO AO CROMOSSOMO X.....	16
EXPANSÃO DE TRINUCLEOTÍDEOS.....	18
SEQÜÊNCIAS INTERCALANTES ENCONTRADAS NAS REPETIÇÕES CGG.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ARTIGO.....	28
ABSTRACT.....	40
CONCLUSÕES.....	42
ANEXOS.....	44

## Lista de Tabelas e Figuras

ILUSTRAÇÃO 1: Esquema representativo do cromossomo X	17
TABELA 1: Diferentes classes de desordens associadas a repetições de trinucleotídeos	19
ILUSTRAÇÃO 2: Esquema representativo do fenômeno de derrapagem, “slippage”	23
FIGURA 1: Esquema representativo do gel com todos os padrões de bandas visualizados em nossa amplificação por PCR	33
GRÁFICO 1: Gráficos da frequência alélica da população de Pernambuco	34
FIGURA 2: Foto do gel de poliacrilamida desnaturante da população normal de Pernambuco	35
FIGURA 3: Foto do gel de poliacrilamida desnaturante mostrando a expansão da mutação quando transmitida de mãe para filho	35
FIGURA 4: Foto de um gel de poliacrilamida desnaturante com amostras de pacientes com algum grau de retardo mental e seus familiares	36
FIGURA 5: Heredograma baseado no estudo de uma família onde o neto foi diagnosticado FRAXA positivo	37
FIGURA 6: Heredograma baseado no estudo de uma família com um dos filhos diagnosticado FRAXA positivo e a filha mosaico para a mutação	37



## **RESUMO**

A síndrome do X frágil é causada por uma mutação no gene FMR1, que origina a expansão do trinucleotídeo CGG inativando o gene e impedindo a síntese da proteína FMRP. Diversos estudos mostram que o número médio dessa repetição é geralmente (CGG)<sub>30</sub>. A partir de relatos médicos há um grande número de crianças portadoras de retardo mental em Pernambuco sem causa conhecida e devido a isso resolvemos estudar essa mutação. Foram analisados 386 indivíduos da população geral (mãe e filho), 24 pacientes com algum grau de retardo mental e 32 indivíduos das famílias desses pacientes (mãe, pai, irmãos). Foi realizada a extração de DNA e amplificação por PCR, do gene FMR1 utilizando três *primers* específicos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelados por precipitação de nitrato de prata. Foi possível observar que na população de Pernambuco a média da repetição em pessoas normais é de 20 trinucleotídeos, (CGG)<sub>20</sub>. Em um dos casos em que foi observada expansão, a mãe apresentou (CGG)<sub>10</sub> e o filho (CGG)<sub>43</sub>, sem o fenótipo da síndrome. Dos 24 pacientes encaminhados, 4 são portadores da síndrome do X frágil, e os demais apresentaram em sua maioria 20 repetições CGG.

## **INTRODUÇÃO**

A síndrome do X frágil, está associada à presença de um sítio frágil situado no braço longo do cromossomo X (Xq27.3). É a segunda causa genética mais importante de retardo mental, sendo apenas menos freqüente que a síndrome de Down e a mais freqüente causa de retardo mental herdado (Oostra e Halley, 1995). Na população geral esta síndrome é encontrada em aproximadamente 1 a cada 4.000 homens e em 1 a cada 6.000 mulheres (Turner *et al*, 1996). É causada pela expansão do trinucleotídeo CGG (Citosina, Guanina, Guanina).

Os sinais clínicos gerais desta síndrome são: retardo mental, face alongada e estreita, frontal alto e proeminente, orelhas grandes em abano, queixo proeminente, palato alto, estrabismo, além de alterações comportamentais como hiperatividade, agressividade e estereotípias. Os indivíduos afetados possuem aparência normal ao nascimento, mas são hipotônicos. Só após 6 meses de idade é que são notadas alterações, como atraso global no desenvolvimento motor, atrofia e fraqueza muscular, atraso na sustentação da cabeça e andar desajeitado. Apresentam também um atraso generalizado na aquisição da fala (Oostra e Halley, 1995).

Pessoas clinicamente normais, de outras populações, apresentam geralmente de 6 a 40 repetições em tandem do trinucleotídeo CGG, pessoas com a pré-mutação apresentam de 61 a 200 repetições e pacientes com a mutação total, ou seja, portadores da síndrome do X frágil, apresentam mais de 200 repetições (Murray *et al.*, 1996).

Nas mulheres heterozigotas quanto ao gene da síndrome do X frágil, 35% têm comprometimento mental, na maioria das vezes, menos grave que o encontrado em homens afetados devido ao processo natural de inativação de um dos cromossomos X (de Vries *et al.*, 1996).

Estudos cromossômicos ou moleculares são necessários para o diagnóstico da síndrome do X frágil, pois são variáveis as manifestações clínicas desta síndrome (Glover *et al.*, 2001). Os homens portadores da pré-mutação, mas com inteligência normal não manifestam sítio frágil citogeneticamente, demonstrando a ineficiência do estudo cromossômico para detectar homens portadores da pré-mutação, pois a análise cromossômica só detecta casos com mutação total onde há presença do sítio frágil. Para a detecção das mulheres assintomáticas, portadoras do gene mutado, o estudo cromossômico é ineficaz devido às baixas freqüências de expressão ou ausência de manifestação na maior parte delas (Willemsen e Oostra, 2000).

Alterações moleculares presentes nos afetados pela síndrome do X frágil foram identificadas como um fragmento de DNA de tamanho variável, sugerindo que esta ocorrência se dava pelo fato de haver uma elevação no número de cópias de seqüências repetidas, ricas em citosina e guanina.

Foi observado também que o alelo mutado não estava metilado nos homens transmissores normais, mas somente no cromossomo X inativo em suas filhas, e se apresentava totalmente metilado nos afetados, concluindo que a expressão fenotípica resultava de uma amplificação do DNA associada às alterações no padrão de metilação. Portanto para a detecção de mutações completas e pré-mutações é necessária a análise do DNA.

Os métodos utilizados para o diagnóstico da síndrome do X frágil são: PCR (Reação de Cadeia Polimerase) e a hibridação por *Southern blotting*, para os quais é utilizado o DNA dos leucócitos periféricos. Outros testes imunocitoquímicos têm sido descritos e são baseados na detecção da proteína FMRP. Em famílias de indivíduos afetados é importante a análise do DNA, principalmente em suas mães e irmãs, já que estas podem ser portadoras de pré-mutações. Nas mães de afetados que são portadoras de pré-mutações, pode ocorrer um segundo evento mutacional, durante o início do desenvolvimento embrionário, que acarretará na sua prole uma mutação completa, detectada pela análise citogenética. Portanto, a análise molecular é decisiva para o aconselhamento genético das mães, e das irmãs e seria importante para determinar o risco de suas futuras proles (Willemsen e Oostra, 2000).

Como já foi dito, esta síndrome está associada ao grande número de repetições da seqüência CGG, superior a 200 unidades, cuja expansão ocorre através de processos mutacionais, geralmente resultando na hipermetilação tanto dos sítios CpG como da seqüência repetida no gene FMR-1. Desta forma o gene FMR-1 não é transcrito não produzindo a proteína FMRP. Se esta proteína estiver ausente nas células do paciente este indivíduo será portador da síndrome do X frágil, pois a ausência de FMRP no cérebro é a causa do retardo mental. O diagnóstico de mulheres afetadas é menos específico quando comparado com o de pacientes do sexo masculino, pois o processo de inativação do cromossomo X, em mulheres com mutação total, pode resultar na expressão da FMRP em seus linfócitos em variada porcentagem.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivos:

- Registrar a frequência de repetições CGG no gene FMR-1 na população em geral criando um banco de dados para futuras referências, com isso definir o diagnóstico molecular para a síndrome do X frágil no Estado de Pernambuco.
- Comparar o número de repetições CGG em pacientes FRAXA positivos, pacientes portadores da síndrome do X frágil, com o da população normal analisando sua distribuição, calculando os riscos e compondo um banco de dados para estudos futuros.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

Em 1943, Martin e Bell estudaram a primeira família com vários indivíduos do sexo masculino com retardo mental, na qual o heredograma era sugestivo de herança recessiva ligada ao cromossomo X, mas foi em 1969, que essa forma de retardo mental foi caracterizada, no estudo de uma determinada família, cujos portadores apresentavam uma falha na porção distal do braço longo do cromossomo X (OMIM acesso 309550).

## **O gene FRAXA e a proteína FMRP**

O gene da síndrome do X frágil (gene FRAXA), FMR-1, está localizado no cromossomo X, na região Xq27.3. Tem um comprimento de 38 kb possui 17 exons (Eichler *et al.*, 1993) e dele é transcrito um RNA mensageiro de 4,8 kb sendo este constituído principalmente por íntrons. À partir de seu seqüenciamento foi observado que na sua porção 5' havia uma repetição em tandem do trinucleotídeo CGG que não era traduzida. A síndrome do X frágil ocorre quando há mutações no gene FMR-1 de modo que este gene não sintetize a proteína FMRP. Através da genética molecular foi possível a clonagem do gene (Verkerk *et al.*, 1991) e desta forma compreender melhor a natureza da mutação.

A proteína FMRP é encontrada no citoplasma das células (Oostra e Chiurazzi, 2001) e em uma variedade de tecidos fetais e de adultos com níveis altos nos órgãos alvos da doença, o que inclui o cérebro e os testículos (Verkerk *et al.*, 1991), está associado a um QI inferior à média normal e ao macroorquidismo observados nos homens pós-púberes afetados.

## **Padrão de Herança da Síndrome do X frágil**

O padrão de herança da síndrome do X frágil é dominante ligado ao cromossomo X com penetrância incompleta, sendo esta de 80% nos homens e de 30% nas mulheres. Estudos de segregação mostram que 20% dos homens, obrigatoriamente portadores da pré-mutação, não são afetados pela síndrome, são clínica e citogeneticamente normais e por isto designados machos normais transmissores (Sherman *et al.*, 1984).

Todas as mães de homens com X frágil são portadoras da pré-mutação do gene FMR1, tendo assim transmitido o X pré-mutado para seu filho onde ocorreu a expansão dessa mutação no início do desenvolvimento embrionário originando uma mutação total. As filhas de homens portadores da

pré-mutação não sofrem o processo de expansão dessa repetição. Assim os homens com a pré-mutação podem ter netos portadores da mutação total mas não filhas (Sherman *et al.*, 1985).

## **Retardo Mental Ligado ao Cromossomo X**

O retardo mental é caracterizado por um funcionamento intelectual significativamente inferior a média, apresentando limitações em duas ou mais habilidades adaptativas como: comunicação, convivência, habilidades sociais, orientação, faculdades funcionais, saúde e segurança, lazer e trabalhos (Curry *et al.*, 1997).

O número de homens com retardo mental supera em, aproximadamente, 30% o número de mulheres em pesquisas realizadas em vários países (Lehrke, 1974; Herbst e Miller, 1980; Stevenson *et al.*, 2000). Os genes do cromossomo X têm sido os maiores responsáveis por este excesso. Existem várias doenças ligadas ao cromossomo X, cuja principal característica é o retardo mental (Chiurazzi *et al.*, 2001).

Alguns genes associados ao retardo mental foram identificados no cromossomo X (ILUSTRAÇÃO 1). Dentre eles estão os genes FMR1, FMR2, o OPHN1, o PAK3, o ARHGEF6, o IL1RAPL, o TM4SF2 e o RSK2. Segundo Toniolo (2000), o número de genes para o retardo mental ligados ao cromossomo X é duas a quatro vezes maior que o esperado.



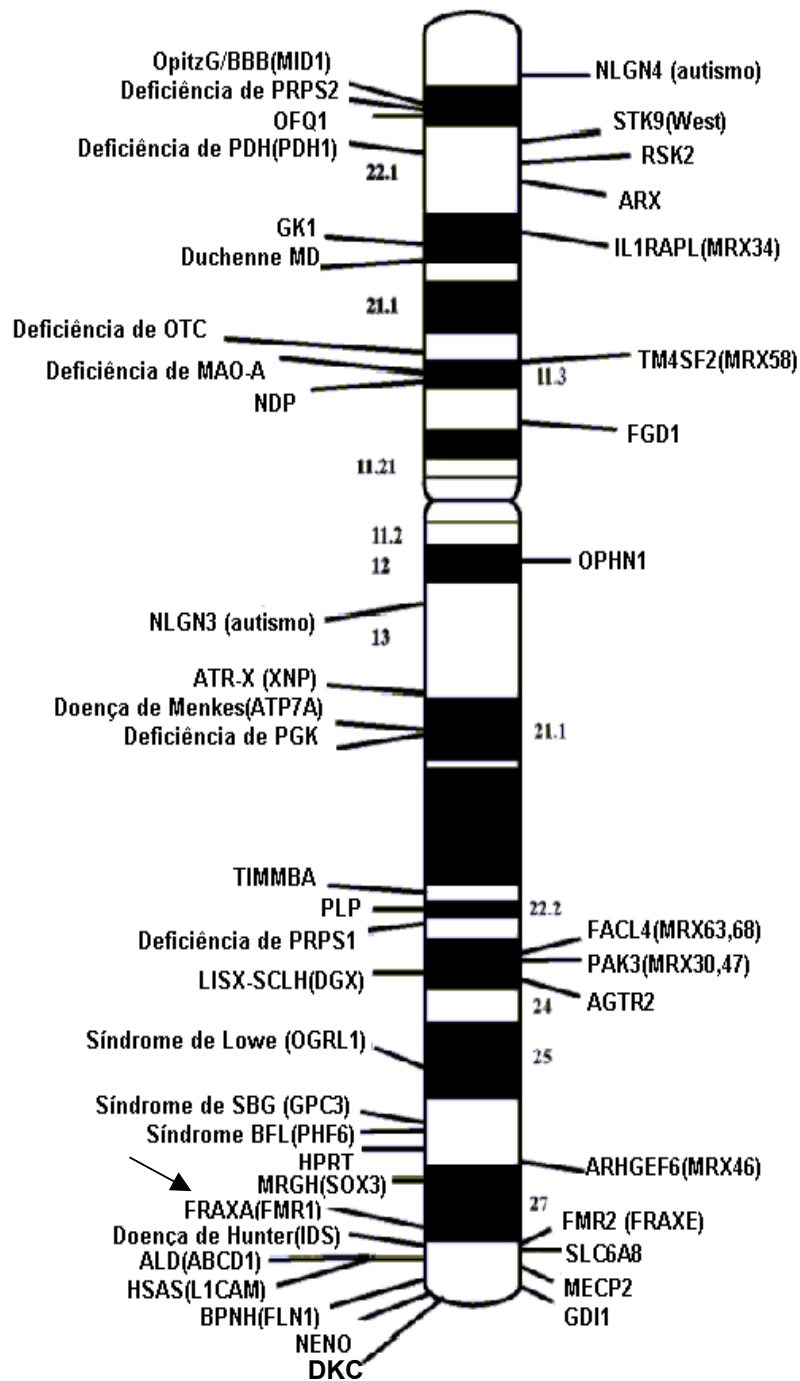


ILUSTRAÇÃO 1: Esquema representativo dos genes mapeados no cromossomo X, associados com retardo mental entre os quais encontra-se o gene FMR1 situado na região Xq27.3 na extremidade do braço longo do cromossomo (Chiurazzi *et al.*, 2001).

## **Expansão de Trinucleotídeos**

As mutações causadas por expansões trinucleotídicas pertencem à classe das mutações dinâmicas, nas quais quando uma região de seqüências de trinucleotídeos é expandida, pode gerar uma instabilidade no DNA que aumenta muito a probabilidade de uma nova expansão na geração seguinte (Richard e Sutherland, 1992), originando diferentes distúrbios de expansão como no caso da síndrome do X frágil.

Pessoas normais e saudáveis têm um número particular de cópias CGG no gene FMR1 que pode variar em diferentes populações, nas populações estudadas em outros países foram observadas em sua maioria 30 repetições, (CGG)<sub>30</sub>, mulheres podem ter números diferentes de repetições em seus alelos maternos e paternos. As pessoas afetadas por uma doença causada por distúrbio de expansão têm um súbito aumento do número de cópias das repetições trinucleotídicas (Fu *et al.*, 1991) este aumento favorece a metilação das ilhas CpG o que pode estar associado com a desacetilação das histonas (Coffee *et al.*, 1999) ocorrendo assim a inativação do gene. A TABELA 1 mostra algumas diferentes classes dessas desordens, o loco e o gene onde se encontra a repetição, o tipo de repetição.

**TABELA 1: Diferentes classes de desordens associadas a repetições de trinucleotídeos, o gene responsável e sua proteína (dados coletados a partir de pesquisas no OMIM).**

Classe	Distúrbio	Loco	Gene	Proteína	Repetição	Faixa Normal	Faixa Anormal	Ganho/Perda da Função
<b>Sítios frágeis</b>								
	Síndrome do X frágil ou retardo mental FRAXA	Xq27.3	FMR1	FMRP	CGG	6-54	60-200 (pré-mutação) >200 (mutação completa)	Perda
	Retardo mental FRAXE	Xq28	FMR2	fmr2	CCG	6-31	61-200 (pré-mutação) >200 (mutação completa)	Perda
<b>Distrofia Miotônica</b>		19q13	DMPK	Proteína quinase (DMPK)	CTG	5-37	>50	? perda e ganho
<b>CAG/doenças Poliglutamina</b>								
	Doença de Huntington	4p16.3	HD	Huntingtina	CAG	6-35	36-121	Ganho
	Atrofia dentatorubral-palidoluisina (síndrome de Haw River)	12p13.3 1	DRPL A	Atrofina-1	CAG	6-35	49-88	Ganho
	Atrofia Muscular Espinobulbar (doença de Kennedy)	Xq13-21	AR	Receptor de androgênio (AR)	CAG	9-36	38-62	Ganho
	Ataxia espinocerebelar tipo 1	6p23	SCA1	Ataxina-1	CAG	6-44	39-82	Ganho

Continua...

Classe	Distúrbio	Loco	Gene	Proteína	Repetição	Faixa Normal	Faixa Anormal	Ganho/Perda da Função
<b>CAG/doenças Poliglutamina</b>	Ataxia espinocerebelar tipo 2	12q24.1	SCA2	Ataxina-2	CAG	15-31	36-63	Ganho
	Ataxia espinocerebelar tipo 3 (Doença de Machado Joseph)	14q23.1	SCA3 (MJD1)	Ataxina-3	CAG	12-40	55-84	Ganho
	Ataxia espinocerebelar tipo 6	19p13	SCA6	Subunidade de canal de cálcio voltagem dependente $\alpha$ 14	CAG	4-18	21-33	Ganho
	Ataxia espinocerebelar tipo 7	3p12-13	SCA7	Ataxina-7	CAG	4-35	37-306	Ganho
	Ataxia espinocerebelar tipo 8	13q21	SCA8	?	CTG	16-37	110-<250?	?Perda ou Ganho
	Ataxia espinocerebelar tipo 12	5q31-33	SCA12	PP2A-PR55 $\beta$ (PPP2R2B)	CAG	7-28	66-78	? Perda
	Ataxia espinocerebelar tipo 17	6q27	SCA17	ptn de ligação ao TATA Box (TBP)	CAG	29-42	47-55	? Perda ou Ganho
<b>Ataxia de Friedreich</b>		9q13-21.1	X25	frataxina	GAA	7-34	37-80 (pré-mutação) >100 (mutação completa)	Perda

Continua...

Classe	Distúrbio	Loco	Gene	Proteína	Repetição	Faixa Normal	Faixa Anormal	Conclusão
								Ganho/Perda da Função
<b>Doenças Polialaninas</b>								
	Simpolidactilia	2q31-q32	HOXD13	HOXD13	GCG/A/T	15	22-29	Ganho
	Displasia cleidocranial	6p21	CBFA1	Ptn de ligação ao elemento cis-atuante	GCG/CGT	17	27	?Perda e Ganho
	Distrofia muscular óculo-faríngea	14q11.2-q3	PABPE	Ptn de ligação à poli-A	GCG	6	8-13	?Ganho
<b>Doenças Polialaninas</b>								
	Simpolidactilia	2q31-q32	HOXD13	HOXD13	GCG/A/T	15	22-29	Ganho
	Displasia cleidocranial	6p21	CBFA1	Ptn de ligação ao elemento cis-atuante	GCG/CGT	17	27	?Perda e Ganho
	Distrofia muscular óculo-faríngea	14q11.2-q3	PABPE	Ptn de ligação à poli-A	GCG	6	8-13	?Ganho

## **Seqüências Intercalantes encontradas nas repetições CGG**

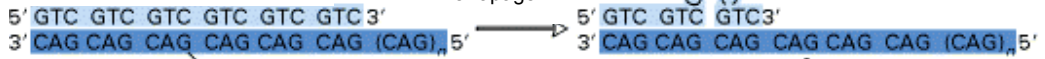
As seqüências CGG não são puras, elas são interrompidas a cada 9 ou 10 repetições por trincas AGG (Adenina, Guanina, Guanina), o que interfere na estabilidade do alelo (Eichler *et al.*, 1994). Como o número médio de repetições CGG na população normal é de aproximadamente 30 (Fu *et al.*, 1991), a grande maioria dos alelos FRAXA, tem duas interrupções AGG. A perda dessas seqüências intercalantes pode ser o evento determinante da instabilidade das repetições trinucleotídicas, que leva ao desenvolvimento da síndrome do X frágil. Esta perda está atrelada ao fenômeno de derrapagem (“*slippage*”), da DNA polimerase durante o processo de replicação (ILUSTRAÇÃO 2), gerando estruturas secundárias anômalas em forma de grampos, que interferem na progressão das enzimas, fazendo com que algumas bases das repetições CGG pareiem com outras da mesma fita. Desta forma pode-se dizer que as seqüências intercalantes têm um efeito protetor na estabilidade genética (Sinden *et al.*, 1999).

**Replicação normal do DNA**



Giro Simples

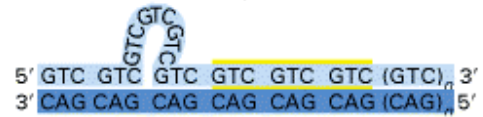
**Erro na replicação do DNA**



Derrapagem

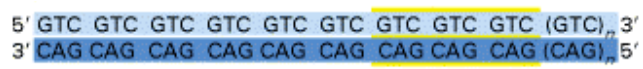
Filamento Molde

Síntese Completa



Segunda Replicação

**DNA Mutante**



+

**DNA selvagem**

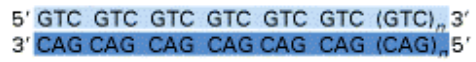


ILUSTRAÇÃO 2 – Esquema representativo de derrapagem (“*slippage*”), de repetições CAG responsáveis pela doença de Huntington, onde podemos observar a replicação normal do DNA e comparar com um esquema de erro na replicação; devido as repetições em tandem CAG, são formadas estruturas em forma de grampo e a enzima não consegue completar a replicação originando um DNA mutante. Esse mesmo mecanismo é sugerido para as repetições CGG observadas na síndrome do X frágil (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>).

Atualmente toda criança com dificuldade de aprendizado ou retardo mental de etiologia desconhecida deve ser avaliada para a presença da mutação no gene FMR1 (Oostra *et al.*,1993). Porém, apesar de muito freqüente, a síndrome do X frágil ainda é pouco conhecida e estudada na região Nordeste do Brasil, pois não há relatos de outros centros que estejam desenvolvendo pesquisas relacionadas a este distúrbio de expansão nesta região.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Chiurazzi P, Hamel BCJ and Neri G (2001) XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet.*, 9:71-81.
- Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D (1999) Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat. Genet.*, 8:2317-2323.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D *et al.* (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet.*, 72:468-477.
- de Vries BB, Jansen CC, Duits AA, Verheij C, Willemsen R, van Hemel JO, van den Ouweland AM, Neirmeijer MF, Oostra BA, Halley DJ (1996) Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *J Med Genet.*, 33:1007-1010.
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL (1993) Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Molec. Genet.*, 2:1147-1153.
- Eichler EE, Holden JJA, Popovych BW, Reiss AL, Snow K, Tribodeau SN, Richards S, Ward PA, Nelson DL (1994) Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genet.*, 8:88-94.
- Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH, Holden JJA, Fenwick RGJr, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.*, 67:1047-1058.
- Glover G, Bernabé MJ, Carbonell P (2001) Diagnóstico del síndrome X frágil. *Rev Neurol.*, (Supl 1): S 6-S 9.
- Herbst DS, Miller JR (1980) Nonspecific X-linked mental retardation II: The frequency in British Columbia. *Am J Med Genet.*, 7:461-469.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

Lehrke RG (1974) X-linked mental retardation and verbal disability. *Birth Defects Orig Artic Ser.*,10:1.

Martin JP, Bell J (1943) A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psychiat.*, 6:154-157.

Murray A, Conway GS and Jacobs PA (1996) Premature ovarian failure and fragile X. *Am. J. Med. Genet.*, 64: 15-20.

Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>)

Oostra BA, Halley DJ (1995) Complex Behavior of Simple Repeats: The Fragile X Syndrome. *Pediatres.*, v.38, p.629-637.

Oostra BA, Jacky PB, Brown WT, Rousseau F (1993) Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. *J Med Genet.*, 30:410-413.

Oostra BA, Chiurazzi P (2001) The fragile X gene and its function. *Clin. Genet.*, 60: 399-408.

Richards RI, Sutherland GR (1992) Fragile X syndrome: the molecular picture comes into focus. *TIG.*, 8:249-255.

Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G (1984) The marker (X) syndrome: A cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet*, 48: 21-37.

Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington MW, Sutherland GR, Turner G, Watson M (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.*, 69: 289-299.

Sinden RR, Hashem VI and Rosche WA (1999) DNA-directed mutations. Leading and lagging strand specificity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 870, 173–189.

---

Stevenson RE, Schwartz CE, Schroer RJ (2000) X-Linked Mental Retardation. *Oxford Univ Press.*, pp 385-8.

Toniolo D (2000) In Search of the MRX Genes. *Am J Med Genet.*, v.97, p.221-227.

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H (1996) Prevalence of Fragile X Syndrome. *Am J Med Genet.*, v.64, p.196-197.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, Van Ommen GJ, Blonden LA, Riggins GJ, Chastain L, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson BA and Warren ST (1991) Identification of a Gene (FMR-1) Containing a CGG Repeat Coincident with a Breakpoint Cluster Region Exhibiting Length Variation in Fragile X Syndrome. *Cell.*, v.65, p.905-914.

Willemsen R, Oostra BA (2000) FMRP Detection Assay for the Diagnosis of the Fragile X Syndrome. *Am J Med Genet.*, v.97, p.183-188.

**ARTIGO**

---

**DETECÇÃO DE EXPANSÕES CGG NA POPULAÇÃO DO  
ESTADO DE PERNAMBUCO E VERIFICAÇÃO DE SUA  
RELAÇÃO COM A SÍNDROME DO X FRÁGIL**

**Manuscrito a ser submetido à revista**

***Genetics and Molecular Biology* para**

**publicação**

**Recife, PE**

**2004**

---

# DETECÇÃO DE EXPANSÕES CGG NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO E VERIFICAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DO X FRÁGIL

Silva, RG.; Dellalibera, E.; Pimentel, MMG.; Santos, CB.; Silva, RS.; Arruda, PSC.;  
Maurício-da-Silva, L.

Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

---

## Resumo

A síndrome do X frágil é causada por uma mutação no gene FMR1, que origina a expansão do trinucleotídeo CGG inativando o gene e impedindo a síntese da proteína FMRP. Diversos estudos mostram que o número médio dessa repetição é geralmente (CGG)<sub>30</sub>. A partir de relatos médicos há um grande número de crianças portadoras de retardo mental em Pernambuco sem causa conhecida e devido a isso resolvemos estudar essa mutação. Foram analisados 386 indivíduos da população geral (mãe e filho), 24 pacientes com algum grau de retardo mental e 32 indivíduos das famílias desses pacientes (mãe, pai, irmãos). Foi realizada a extração de DNA e amplificação por PCR, do gene FMR1 utilizando três *primers* específicos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelados por precipitação de nitrato de prata. Foi possível observar que na população de Pernambuco a média da repetição em pessoas normais é de 20 trinucleotídeos, (CGG)<sub>20</sub>. Em um dos casos em que foi observada expansão, a mãe apresentou (CGG)<sub>10</sub> e o filho (CGG)<sub>43</sub>, sem o fenótipo da síndrome. Dos 24 pacientes encaminhados, 4 são portadores da síndrome do X frágil, e os demais apresentaram em sua maioria 20 repetições CGG.

**Palavras Chave:** X frágil, FMR1, PCR, População Pernambucana, Brasil.

02 de março de 2004, Recife – Brasil (ISSN 1415-4757)

---

## 1. Introdução

A síndrome do X frágil é causada pela expansão do trinucleotídeo polimórfico CGG (citosina, guanina, guanina), no gene FMR1, é a principal causa de retardo mental herdado (Sutherland,1993).

Com base no padrão de metilação e no tamanho das repetições, os alelos podem ser classificados em normais (6-40 cópias), intermediários (41-60 cópias), pré-mutados (61-200 cópias) ou mutados (mais de 200 cópias). Nos portadores de alelos intermediários e pré-mutados não ocorre o silenciamento transcricional e, desta forma, eles não expressam as características da síndrome (Murray *et al.*,1996).

Os indivíduos afetados apresentam uma grande variabilidade fenotípica além do retardo mental. Podem apresentar macroorquidismo nos pós-púberes e uma variedade de dismorfias que incluem face alongada, frontal alto, orelhas grandes e pés planos. Alterações comportamentais também foram observadas como hiperatividade, autismo e movimento estereotipado das mãos. Mulheres afetadas apresentam um fenótipo mais leve, devido à inativação do cromossomo X (de Vries *et al.*, 1996). Após a clonagem do gene FMR1 (Verkerk *et al.*,1991) pôde-se realizar a caracterização precisa do tipo de mutação responsável pela desordem (Oberlé *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1991; Yu *et al.*,1991).

O principal evento responsável pela síndrome é de fato a expansão do número de cópias do trinucleotídeo CGG que se encontram em repetições em tandem no gene FMR1 (Fu *et al.*,1991; Oberlé *et al.*,1991; Verkerk *et al.*, 1991). Porém, existem casos raros nos quais a desordem é decorrente de deleção total ou parcial do gene (Wöhrle *et al.*, 1992; Quan *et al.*,1995). Na sua grande maioria os indivíduos são afetados pelo mesmo tipo de mutação (expansão do trinucleotídeo CGG), o que facilita o diagnóstico molecular.

O padrão de transmissão da mutação segue um processo de amplificação intergerações de múltiplos passos, através dos quais a pré-mutação evolui para a mutação completa (Oberlé *et al.*,1991).

Desta forma, detectar e registrar a frequência de repetições CGG na população do Estado de Pernambuco é de grande importância tanto para definir o diagnóstico quanto para prevenir novos casos através do aconselhamento genético.

## 2. Materiais e Métodos

Este trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco e, mediante sua aprovação, a análise da população foi realizada com amostras disponíveis em nosso laboratório a partir de coletas realizadas para diferentes estudos. Os indivíduos portadores de retardo mental, ou de deficiência de aprendizado, foram encaminhados por médicos geneticistas ou neurologistas do Estado de Pernambuco com a autorização dos pais para a realização do exame, mediante termo de consentimento, e responderam a um questionário estruturado (ver ANEXOS).

A amostra foi constituída por 386 indivíduos da população em geral (mãe e filho) e 24 pacientes com retardo mental e 32 parentes (mãe, pai, irmãos) desses pacientes, todos da população de Pernambuco. Desses indivíduos foram coletados 5ml de sangue venoso utilizando o anticoagulante ACD (Ácido Cítrico 0,038M, Citrato de Sódico Tribásico 0,075M; Dextrose 0,0133M). Foi utilizado em nosso estudo um paciente com diagnóstico positivo para a síndrome do X frágil, realizado na Universidade de São Paulo, como controle positivo para compararmos o padrão de bandas observado nele com o padrão de bandas da nossa população e dos pacientes que constituem nossa amostra, comprovando assim o nosso resultado.

O DNA foi extraído pelo método *mini salting out* (Miller *et al.*, 1988) que envolve digestão com proteinase K e em seguida foi realizada a PCR (Reação de Cadeia da Polimerase).

A amplificação do DNA foi realizada para um volume final de 25µl nas seguintes condições: 2µl de DNA genômico (100ng); 0,32µl de *taq* DNA polimerase (5U/µl); três *primers* segundo Haddad *et al.*, 1996: 0,08µl do *primer* 1: Eag L 5'cgctgctgggtgtaaactgaaaccacgctc3' (100pMoles/µl), 0,3µl do *primer* 2: Eag U 5'cgacctgtcaccgcccttcagccttcc3' (100pMoles/µl), 0,2µl do *primer* 3: Oligo f 5'agccccgcacttccaccaccagctcctcca 3' (100pMoles/µl); 0,5µl de dATP, dCTP, dTTP (10mM); 0,13µl de dGTP; 0,75µl de 7-deaza dGTP (5mM); 2,5µl de tampão de PCR 10x (KCl 500mM, Tris-HCl (pH9,0) 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM-Pharmacia); 2,5µl de DMSO (dimetil sulfóxido-10% na reação); 14,72µl de água ultra-pura.

A PCR foi realizada em um termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research Inc), nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos; 35 ciclos com 1,5 minuto a 94°C para a desnaturação, 1 minuto 65°C para o pareamento e 2 minutos a 72°C para a extensão; e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Após a amplificação, os produtos da PCR foram mantidos a 4°C até o momento da aplicação no gel.



Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% contendo uréia 7M e TBE 10x (tris-borato-EDTA). A eletroforese foi realizada com aplicação de 2000V durante 2 horas, à 60wats, temperatura ambiente, utilizando seqüenciador manual *Hoefler SQ3 Sequencer* (Hoefler Pharmacia Biotech, São Francisco, CA). Em seguida os géis foram revelados por precipitação de nitrato de prata (FIGURA 1).

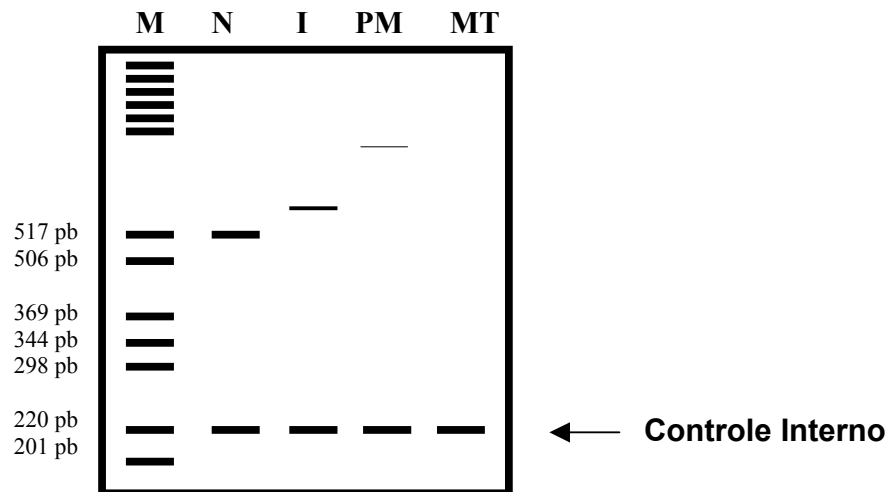


FIGURA 1 - Esquema representativo do gel com todos os padrões de bandas visualizados em nossa amostra. **M**: Marcador Ladder de 1kb; **N**: Normal; **I**: Intermediário; **PM**: Pré-mutado; **MT**: Mutação Total. Todos apresentam a amplificação da banda controle, região do gene FMR1 sem as repetições CGG, na extremidade inferior. Sem ela não seria possível afirmar que houve amplificação na reação de PCR dos pacientes pré-mutados e com a mutação total.

### 3. Resultados e Discussão

Este é o primeiro estudo utilizando a técnica de PCR realizado sobre a síndrome do X frágil na população do Nordeste brasileiro.

Segundo Kremer *et al.* (1991), pessoas normais apresentam de 25 a aproximadamente 40 cópias CGG no cromossomo X. No nosso estudo foi observado que na população normal de Pernambuco a moda é de 20 repetições, como podemos observar no Gráfico 1. Dos 386 indivíduos analisados (mãe e filho), 357 eram homozigotos, 334 apresentaram 20 repetições CGG (CGG)<sub>20</sub>; foram observados ainda 18 indivíduos com 10 repetições (CGG)<sub>10</sub> e 05 indivíduos com 43 repetições (CGG)<sub>43</sub> no gene FMR1; 29 apresentaram-se heterozigotos (mães), destes, 21 indivíduos apresentaram um de seus cromossomos X com (CGG)<sub>10</sub> e o outro com (CGG)<sub>20</sub>, 03 apresentaram

um com  $(CGG)_1$  e o outro com  $(CGG)_{20}$ , 05 indivíduos com  $(CGG)_{20}$  em um de seus cromossomos X e o outro com  $(CGG)_{43}$ . Em um caso em que o filho apresentou expansão, a mãe apresentou  $(CGG)_{10}$ , e uma única banda. Portanto ela é homocigota (seus dois cromossomos X têm o mesmo número de repetições CGG) e o cromossomo X do seu filho possui  $(CGG)_{43}$ , sem o fenótipo da síndrome.

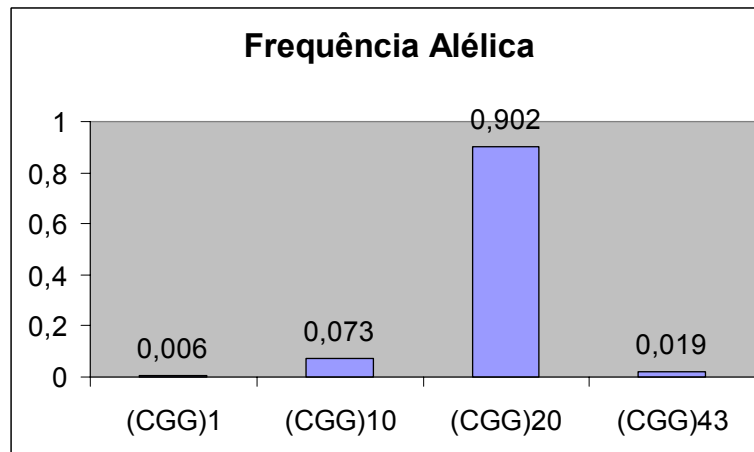


Gráfico 1: Frequências alélicas da população de Pernambuco, onde podemos observar que o alelo mais freqüente é o alelo com 20 repetições do trinucleotídeo CGG,  $(CGG)_{20}$  Sendo mais de 90% da população, e o menos freqüente tem apenas uma repetição CGG,  $(CGG)_1$

Na FIGURA 2 podemos observar um padrão de bandas bastante homogêneo da nossa população com bandas que variam de 470pb  $(CGG)_1$  a 600pb  $(CGG)_{43}$ , a maioria das amostras apresentou bandas de 550pb, padrão que mostrou-se bem estável no decorrer dos estudos da população de Pernambuco, já que se manteve o mesmo na maioria das amostras quando analisada a amostra do filho, correspondendo a um número de 20 repetições em tandem do trinucleotídeo,  $(CGG)_{20}$ .

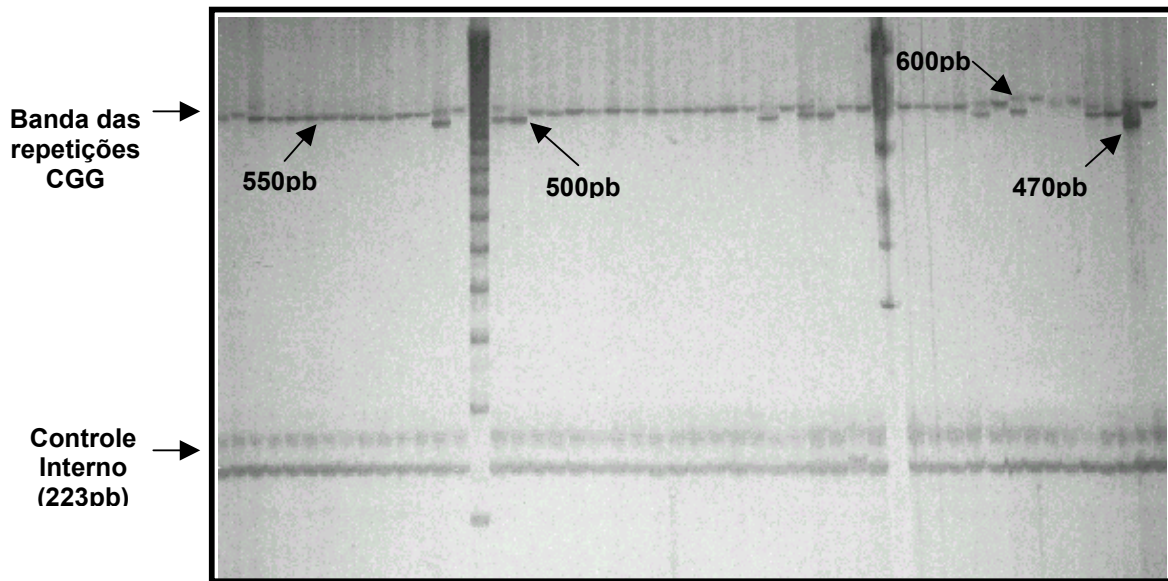


FIGURA 2 – Foto de um gel de poli-acrilamida desnaturalante onde podemos observar um padrão de bandas bastante homogêneo. A maioria dos indivíduos apresentaram 550pb ou (CGG)<sub>20</sub>, 10 indivíduos com bandas de 500pb ou (CGG)<sub>10</sub>, um indivíduo com uma banda de 470pb ou (CGG)<sub>1</sub> e 02 indivíduos com 600pb ou (CGG)<sub>43</sub>.

Fu *et al.* (1991) estudou o aumento do número de repetições CGG durante a ovogênese, e demonstrou que o fenômeno de antecipação, no qual a pré-mutação se expande para mutação total só ocorre quando é transmitido de mãe para filho. Na FIGURA 3 podemos visualizar uma expansão observada onde a mãe se mostrava homocigota, com uma banda de 500pb e seu filho apresentou uma banda de 600pb confirmando o fenômeno do aumento do número de repetições CGG (expansão da mutação). Apesar da mãe apresentar seus alelos considerados normais, onde o risco de expansão na geração seguinte é baixo, pois geralmente são herdados de forma estável (Murray *et al.*, 1996), houve a expansão.

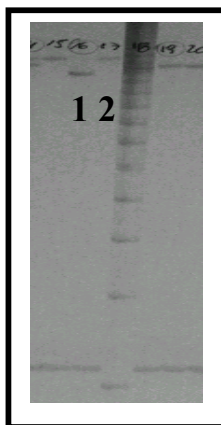


FIGURA 3 – Gel de poli-acrilamida onde observamos a expansão das repetições CGG transmitida da (1): mãe, (CGG)<sub>10</sub>, para (2): filho (CGG)<sub>43</sub>.

Dos 24 pacientes, um já chegou até nós com diagnóstico molecular positivo para a síndrome (realizado na Universidade de São Paulo), este nós usamos como controle para uma melhor análise dos demais. Foram diagnosticados como FRAXA positivos, portadores da síndrome do X frágil, 4 pacientes do sexo masculino e uma menina foi diagnosticada como mosaico para a síndrome do X frágil (FIGURA 4).

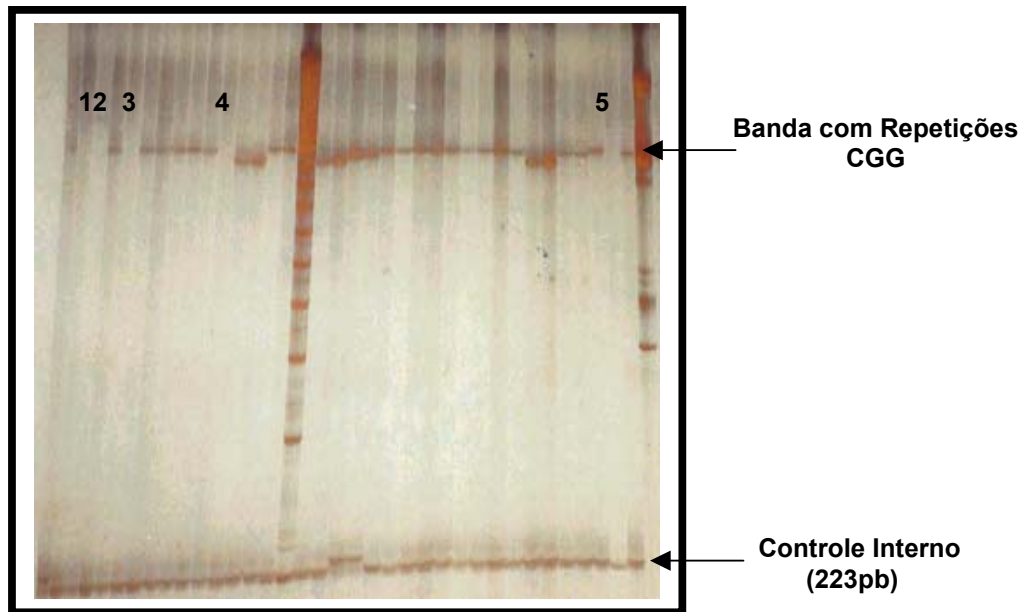


FIGURA 4 - Gel de poliacrilamida mostrando o padrão de bandas observado em todos os pacientes que apresentam algum grau de retardo mental, e seus familiares **1**: Paciente usado como controle positivo; **2, 3, 4 e 5**: Pacientes portadores da mutação completa. Na extremidade inferior do gel podemos observar a banda controle, constatando a amplificação.

Na FIGURA 5 pode-se observar o padrão de bandas apresentado por um paciente FRAXA positivo, onde foram analisados o gene FMR1 da sua mãe e de seus avós maternos. Foram observadas expansões do trinucleotídeo CGG, o evento que transformou a pré-mutação observada em um cromossomo X da avó para a mutação total em seu neto, demonstrando que a expansão ocorre no gene transmitido de mãe para filho ou filha (Fu *et al.*, 1991; Rosseau *et al.*, 1991).

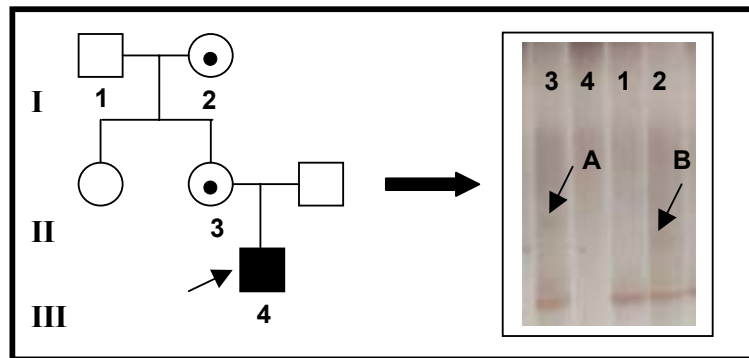


FIGURA 5 – Heredograma baseado na foto ao lado, que mostra a amplificação por PCR da região do gene FMR1 onde estão localizadas as repetições CGG, de uma família estudada, onde houve expansão da mutação no decorrer de duas gerações. **3**: Mãe portadora de um X pré-mutado; **4**: Filho com mutação total; **1**: Avô materno normal; **2**: Avó materna portadora de um X pré-mutado; **A**: Primeira expansão; **B**: Pré-mutação.

Na FIGURA 6 pode-se observar a análise de uma família onde um dos filhos apresenta a mutação completa e a filha é mosaico para a mutação.

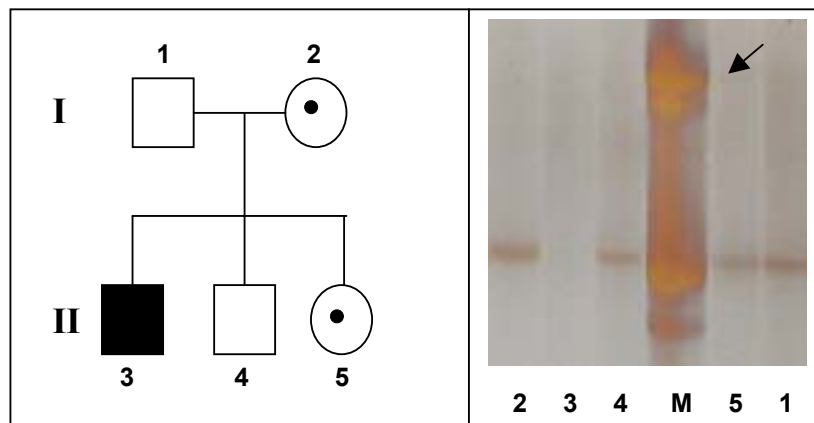


FIGURA 6 – Heredograma baseado na foto ao lado, onde podemos observar o padrão das bandas através da amplificação por PCR da região onde estão localizadas as repetições CGG do gene FMR1. Este gel mostra uma família da nossa população. **1**: Mãe portadora de um de seus cromossomos X pré-mutado ou com a mutação completa; **2**: Primeiro filho, diagnosticado como FRAXA positivo em nosso estudo; **3**: Segundo filho normal; **M**: Marcador Ladder de 1kb; **4**: Terceira filha portadora de um X normal e outro mutado, mosaico; **5**: Pai normal. A seta mostra a segunda banda da filha com a mutação.

#### 4.Referências Bibliográficas

- de Vries BB, Jansen CC, Duits AA, Verheij C, Willemsen R, van Hemel JO, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, Oostra BA, Halley DJ (1996) Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *J Med Genet.* Dec; 33(12):1007-10.
- Fu, Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk A. JMH, Holden JJA, Fenwick RGJr, Warren ST, Oostra BA, Nelson D L, Caskey CT (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.*, 67:1047-1058.
- Haddad LA, Mingroni-Neto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ (1996) A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum genet.*, v. 97, p. 808-812.
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RL (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)n. *Science* 252:1711-1714.
- Miller AS, Dykes DD, Olesky HF(1988) A simple salting-out procedure for extract DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16:1255.
- Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Linehan P, McKechnie N, Macpherson J, Pound M, Jacobs P (1996) Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet.*, 5(6):727-35.
- Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252: 1097-1102.

- Quan F, Zonana J, Gunter K, Peterson KL, Magenis RE, Popovich BW (1995) An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 56:1042-1051.
- Rousseau F, Heitz D, Oberle I, Mandel J-L (1991) Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation. *J. Med. Genet.*, 28: 830-836.
- Sutherland GR (1993) Personal Communication. Adelaide, Australia, 11/3/1993, in [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIN) ID : 309550
- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, van Ommen G-J B, Blonden, LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, Warren ST (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.*, 65: 905-914.
- Wohrle D, Kotzot D, Hirst MC, Manca A, Korn B, Schmidt A, Barbi G, Rott H-D, Poustka A, Davies KE, Steinbach P (1992) A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 299-306.
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.*, 252: 1179-1181.

## **ABSTRACT**



The fragile X syndrome is caused by a mutation in the FMR1 gene and it causes an expansion of the trinucleotide CGG inactivating and blocking the FMRP protein synthesis. Many articles show that the average of repetitions is generally (CGG)<sub>30</sub>. There are a great number of children with mental problems in Pernambuco that the causes are unknown and in consequence of this, we have studied this mutation. 386 subjects were analyzed in the population (mother and son) and 24 patients with some mental problem degree and 32 of this patients relatives (mother, father and brothers). The DNA extraction and the amplification by PCR of the FMR1 gene were done using three specific primers. The PCR products were separated by electrophoresis in polyacrylamide gel and they were showed by silver nitrate precipitation. We could observe that in Pernambuco population the average of repetition in normal people is 20 trinucleotides (CGG)<sub>20</sub>. In one of the cases, where we observed the expansion, the mother showed (CGG)<sub>10</sub> and the son (CGG)<sub>43</sub>, without the syndrome phenotype. From the 24 patients directioned, four have the X fragile syndrome and the others showed, in general, 20 CGG repetitions.

## **CONCLUSÕES**

- Os métodos atuais descritos na literatura usando PCR e eletroforese são suficientes para o diagnóstico da síndrome do X frágil no Estado de Pernambuco, com a utilização desse método foi possível observar que o alelo mais freqüente é o alelo com 20 repetições CGG diferente de relatos encontrados na literatura em estudos realizados com outras populações, onde geralmente são encontradas 30 repetições CGG no gene FMR1.
- Para o paciente ser considerado FRAXA positivo, portador da síndrome do X frágil, apresentando os sinais e sintomas, é necessário que ele seja portador da mutação total, mais de 200 cópias do trinucleotídeo CGG, uma vez que na população pernambucana o alelo mais freqüente é o com 20 repetições e que esse se mantém bem estável quando transmitido de mãe para filho, não ocorrendo a expansão, desta forma o risco de ocorrer expansão nessa população é ainda menor do que nas populações onde o alelo mais freqüente é o com 30 repetições.

**ANEXOS**

## **ANEXO 1**

## Aprovação do Comitê de Ética na Universidade Federal de Pernambuco

230

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comitê Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (versão outubro/99)**

1. Projeto de Pesquisa: <b>IDENTIFICAÇÃO DE EXPANSÕES CGG EM PACIENTES COM RETARDO MENTAL NO ESTADO DE PERNAMBUCO E VERIFICAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DO X FRÁGIL</b>					
2. Área do Conhecimento (Ver relação ao verso) <b>CIÊNCIAS BIOLÓGICAS</b>		3. Código: <b>5.0.3</b>	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4) <b>D</b>		
5. Área(s) Temática(s) Especial (a) (Ver fitograma do verso) <b>GENÉTICA I</b>		6. Código(s): <b>1.1</b>	7. Faixa (Só área temática 3) I ( ) II ( ) III ( ) IV ( )		
8. Uniformes: (3 opções) <b>CRONOSSCHO X - MUTAÇÃO - SÍNDROME DO X FRÁGIL</b>					
<b>SUJEITOS DA PESQUISA</b>					
9. Número de sujeitos No Contrato:      Total:		10. Grupos Especiais: <21 anos ( ) Particular de Deficiência Mental (X) Embrão/Feto ( ) Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidários, etc) ( ) Outros ( ) Não se aplica ( )			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>					
11. Nome: <b>LUZ MAURÍCIO DA SILVA</b>					
12. Identidade: <b>13.14837 SSP/PE</b>		13. CPF: <b>5 93389018-24</b>		19. Endereço (Rua, nº, R. P. R. RUAZIO DE CASTRO CAVALCANTE Nº 49 SERRA B	
14. Nacionalidade: <b>BRASILEIRO</b>		15. Profissional: <b>PROFESSOR</b>		20. CEP: <b>5 2210-010</b>	
16. Melhor Titulação: <b>DOCTOR</b>		17. Cargo: <b>PROFESSOR</b>		21. Cidade: <b>RECIFE</b>	
18. Instituição a que pertence: <b>UFPE</b>		22. Fone: <b>3 2719512</b>		23. UF: <b>PE</b>	
				24. Fax: <b>3 2719512</b>	
				25. E-mail: <b>mauricio@luppe.br</b>	
<p><b>Termo de Compromisso:</b> Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Asspto. de responsabilidade pela conduta científica do projeto próprio.</p> <p>Data: <b>22/10/2002</b> _____ Assinatura <b>Dr. Luz Maurício da Silva</b> Prof. Adj. Dep. de Genética CCB/UFPE</p>					
<b>INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO</b>					
26. Nome: <b>UFPE</b>		29. Endereço (Rua, nº, R. PROFESSOR MURAIS REGO Nº 1400 CIDAD. UNIVERSITARIA			
27. Unidade/Órgão: <b>LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA DEPARTAMENTO DE GENÉTICA</b>		30. CEP: <b>5 2222</b>		31. Cidade: <b>RECIFE</b>	
28. Participação Futuramente: Sim ( ) Não (X)		32. Fone: <b>3 271</b>		33. UF: <b>PE</b>	
35. Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não ( ) Nacional ( ) Internacional ( ) (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)					
<p><b>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição)</b> Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p> <p>Nome: <b>JOSE FERREIRA DOS SANTOS</b> Cargo: <b>Chefe Departamento</b></p> <p>Data: <b>23/10/2002</b> _____ Assinatura <b>Prof. José Ferreira dos Santos</b> Chefe Depto. de Genética CCB, UFPE</p>					
<b>PATROCINADOR</b>					
36. Nome: _____		39. Endereço			
37. Responsável:		40. CEP:		41. Cidade:	
38. Cargo/Função:		43. Fone:		42. UF:	
44. Fax:					
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP</b>					
45. Data do Estudo: <b>31/10/2002</b>		46. Registro no CEP: <b>230/2002 CE PECS</b>		47. Conselho: Aprovado (X)	
				48. Não Aprovado ( )	
		49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para:		Data: <b>28/02/2004</b>	
Enviado a CONEP: 50. Os dados acima para registro ( ) Si. O projeto para aprovação ( )		51. Coordenador Nome: <b>Qualberto</b>		Anexar o parecer consultoria	
52. Data: _____		53. Assinatura do Coordenador: <b>Qualberto</b>			
		54. Coordenador da Comissão da <b>COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA CONEP</b>			
54. Nº Expediente:		56. Data Recebimento:		57. Registro na CONEP:	
55. Processo:					
58. Observações: <b>Exigências atendidas em 16/02/2004.</b>					

Dr. José Ferreira dos Santos  
Chefe Departamento de Genética  
CCB/UFPE

## **ANEXO 2**

Abordagem realizada com as mães dos pacientes, para a sua participação na entrevista

Bom dia, senhora!

Sou estudante do Curso de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, e estamos desenvolvendo um trabalho no Laboratório de Genética Molecular Humana. Para a realização desse trabalho é necessário fazermos entrevistas com as mães dos pacientes que apresentem algum grau de retardo mental. O nosso objetivo é saber, se vocês mães sabem qual a causa do retardo de seus filhos. Se vocês não têm conhecimento da causa, então queremos saber se querem saber o porquê deles serem assim.

A senhora gostaria de participar, respondendo às nossas perguntas, ou seja, colaborando com o nosso trabalho? Seria muito importante para nós sua participação.

A senhora deve sentir-se livre para não participar, se essa for a sua vontade. Aquelas mães que participarem do nosso estudo terão garantido o segredo do conteúdo de suas respostas, ninguém além dos pesquisadores terão acesso a suas respostas.

Obrigada, por sua atenção!



## **ANEXO 3**

## **Termo de consentimento livre e esclarecido para participação da pesquisa**

Qualquer dúvida fique a vontade para perguntar, que nós teremos o prazer de esclarecer.

**Título: “DETECÇÃO DE EXPANSÕES CGG NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO E VERIFICAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM A SÍNDROME DO X FRÁGIL”**

**Investigadores:** Raquel Galvão Silva - Telefone: (81) 2126 8512

Luiz Maurício da Silva

Paula Arruda

**Local da Pesquisa:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Laboratório de Genética Molecular Humana – LGMH

Departamento de Genética

**End:** Rua Professor Moraes Rêgo. Sem número - Cidade Universitária – Recife – PE

CEP: 50 732-970

**Introdução e Objetivos:** A síndrome do X frágil (FRAXA) é uma doença causada por uma mutação no cromossomo X, o que ocasiona retardo mental no paciente dentre outras características físicas, sendo a causa mais comum de retardo mental herdado. Esse projeto tem como justificativa a implantação do diagnóstico molecular da síndrome do X frágil no Estado de Pernambuco pelo Laboratório de Genética Molecular Humana que se apóia no fato de que as observações clínicas em Pernambuco apontam para uma elevada incidência de pacientes com retardo mental. Com o diagnóstico molecular será possível um estudo de pacientes FRAXA positivos em comparação com pacientes FRAXA negativos a nível das repetições  $CGG_n$  (mutação) encontradas no gene FMR-1 do cromossomo X e uma conseqüente tomada de posição com relação a ações de assistência aos afetados e suas famílias.

**Duração do Estudo:** Início: março/2002 – Término: fevereiro/2004

**Descrição do Estudo:** A família de todos os pacientes com retardo mental encaminhados para nosso estudo será inicialmente esclarecida de todo nosso propósito estando livre para se negar a participar. Uma vez que a família concorde terá que responder a algumas perguntas que compõem o nosso questionário, e permitir a coleta de 5ml de sangue do paciente e de sua mãe.

**Riscos e Desconfortos:** Todo o procedimento para participação em nosso trabalho possui riscos mínimos para o paciente e sua família. O único risco é no momento da coleta de sangue.

**Confidencialidade:** Só terão acesso às informações desta pesquisa os seus pesquisadores. Toda e qualquer informação fornecida pelo paciente e sua família será mantida em sigilo absoluto.

**Participação voluntária/retirada:** O paciente que se dispuser a participar de nosso estudo estará livre para desistir a qualquer momento, caso esta seja a sua vontade.

**Análise Crítica:** É importante que a família, mãe e pai, saibam o que originou o problema de seu filho. Ter um diagnóstico é necessário, para saber qual a melhor forma de educar, de estimular o seu desenvolvimento, e até ter o conhecimento do risco de terem outro filho com o mesmo problema.

**Riscos:** O único risco, se é que podemos considerar assim, é a coleta de 5 ml sangue do paciente e de sua mãe, necessária para a realização do exame diagnóstico da síndrome do X frágil. Nossa sala de coleta dispõe de todo o material necessário para o procedimento, tendo este o mesmo risco existente na coleta de sangue realizada para diferentes exames. A coleta de dados não submeterá os sujeitos deste estudo a qualquer tipo de constrangimento, seja na entrevista, ou no momento da coleta de sangue.

**Benefícios:** Os pacientes portadores de qualquer grau de retardo mental que serão incluídos em nosso estudo podem ser de fato portadores da síndrome do X frágil o que seria uma explicação para os sinais observados no mesmo. Com a inclusão deste paciente em nosso trabalho será possível o diagnóstico positivo ou não para a síndrome do X frágil. Sendo o diagnóstico positivo esse paciente pode receber os cuidados necessários para um portador da síndrome do X frágil, e futuramente se engajar em uma associação para portadores dessa síndrome. Além disso, o diagnóstico é de extrema importância em um aconselhamento genético para a família, já que a síndrome do X frágil é a causa mais freqüente de retardo mental herdado.

Declaro que estou ciente e que concordo em participar da pesquisa acima referida, fornecendo amostra de sangue minha e do meu filho. Declaro também, que desejo ser informado dos resultados dos testes realizados.

**Responsável:**

---

**Testemunha:**

---

**Pesquisador:**

---

## **ANEXO 4**

### Questionário estruturado para entrevista

PERGUNTAS	RESPOSTAS	ORIENTAÇÕES AO ENTREVISTADOR
1. Qual o seu nome completo?		Preencha com letra legível
2. Qual o nome do seu filho (completo)?		Preencha com letra legível
3. Quantos anos a senhora tem?	<input type="text"/> <input type="text"/>	Confira a idade com os dados do documento de identidade
4. Quantos anos seu filho tem?	<input type="text"/> <input type="text"/>	Confira a idade com os dados do documento de identidade
5. Quando a senhora tomou conhecimento do problema do seu filho?		Escreva exatamente como ela relatar
6. Onde a senhora e seu filho nasceram?	Mãe: Filho:	Cidade e Estado
7. Onde a senhora mora atualmente? Qual o seu telefone para contato?	Rua: Bairro: Cidade: Estado: CEP: Telefone:	Anote o endereço completo, incluindo CEP, se possível.
8. A senhora sabe ler?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Assinale uma alternativa. Caso não passe a questão 11
9. Qual a última série que completou?	Série: Grau: <input type="checkbox"/> Completa    Incompleta <input type="checkbox"/>	Tenha calma para que a entrevistada possa se lembrar
10. Na época do colégio a senhora sentia dificuldades em aprender? O que?		Escreva exatamente como ela relatar
11. Qual o seu estado civil atualmente?		Escreva exatamente como ela relatar
12. Qual a sua ocupação?		Escreva exatamente como ela relatar
13. Com quem seu filho se parece?		Tenha calma para que a entrevistada possa se lembrar
14. Você tem algum parente com as mesmas características do seu filho?		Tenha calma para que a entrevistada possa se lembrar
15. A senhora tem outros filhos? Quantos?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="text"/> <input type="text"/>	Se a resposta for não pule para a questão 17

16. Você nota algo diferente no comportamento de seu (s) outro (s) filho(s)?		Preencha da maneira que a entrevistada falar
17.A senhora pretende ter mais filhos? Mesmo sabendo que eles podem nascer com o mesmo problema?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
18.Qual sua religião?	<input type="checkbox"/> Católica <input type="checkbox"/> Protestante <input type="checkbox"/> Evangélica <input type="checkbox"/> Outras <input type="checkbox"/> Sem Religião	Marque um X na opção correta
19. O que a senhora faz para evitar gravidez?		No caso de ligação de trompas, pular para a questão 22
20.Por que a senhora escolheu esse método?		Preencha da maneira que a entrevistada falar
21.No caso da mulher não ter as trompas ligadas: A senhora ligaria as trompas?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
22.Algum médico já chegou a uma possível causa do retardo de seu filho?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Se a resposta for não desconsidere as últimas perguntas
23.O que ele supôs?		Preencha da maneira que a entrevistada falar
24. Ele chegou a lhe explicar o por que dessa conclusão?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
25.O que ele lhe disse?		Preencha da maneira que a entrevistada relatar