



Ana Sofia Pereira Costa Silva Vitorino

Mestranda da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Perfil genómico e caracterização clínica de crianças com Síndrome do X-frágil

Artigo científico

Orientadora: Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira

Co-orientadora: Professora Doutora Guiomar Gonçalves Oliveira

Email: anocas.vitorino@gmail.com

Março/2013

RESUMO

A mutação do gene *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)* está envolvida em três síndromes clínicas distintas: Síndrome do tremor/ataxia associado ao X-frágil (STAXF), Falência Ovárica Precoce (FOP) e Síndrome do X-frágil (SXF). A SXF é uma patologia ligada ao X, responsável por 30% das causas de deficiência intelectual hereditária, que pode afetar os dois géneros, mas é mais frequente e tem uma deficiência intelectual mais severa nos homens. Selecionaram-se 100 doentes que em 2011 foram enviados para o Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, para realizarem o estudo do gene *FMR1*, no sentido de identificar os indivíduos portadores da mutação ou premutação. A análise dos fragmentos do ácido desoxirribonucleico (ADN) foi feita em sequenciador automático, utilizando a técnica *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e o *Triplet Repeat Primed PCR*.

Com base nos resultados, determinou-se a frequência das formas alélicas e do número de repetições CGG. Constatou-se que a maioria apresentava o alelo normal, pelo que conclui-se que são outras as etiologias responsáveis pelo quadro clínico dos doentes estudados. Curiosamente nesta amostra a maior incidência da mutação completa ocorre nas mulheres. Também foram reportados dois casos familiares. Graças ao estudo familiar é possível alertar as mulheres com alelo premutado para o risco aumentado de terem filhos com SXF e de desenvolverem POF, oferecendo diagnóstico pré-natal nas gestações futuras. Deste modo, é possível prevenir o aparecimento de crianças com SXF e fazer uma abordagem dirigida a cada elemento familiar de risco.

Palavras-chave

Síndrome do X-frágil, Mutação gene *FMR1*, Número de repetições CGG, Deficiência intelectual.

ABSTRACT

The *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)* gene mutation is involved in three distinct clinic syndromes: Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (STAXF), Premature Ovarian Failure (FOP) and Fragile X syndrome (SXF). The SXF is an X-linked disorder, responsible for 30% of all cases of hereditary mental retardation, which can affect both genders, but it is more frequent and has a more severe mental retardation on males. There were selected 100 patients in 2011 which were sent to the Laboratory of Cytogenetic and Genomics in the Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal, to conduct a study of the *FMR1* gene, to identify individuals carrying the mutation or premutation. The analysis of deoxyribonucleic acid (ADN) fragments was made with an automatic sequencer using the *Polymerase Chain Reaction (PCR)* and the *Triplet Repeat Primed PCR* technics.

Based on the results, it was determined the frequency of allelic forms and the number of CGG repeats. It was found that most had normal allele, concluding that are other etiologies responsible for clinical state of the studied patients. Curiously the higher incidence of full mutation in this sample occurs on females. There were also reported two familial cases. Due to family study, it is possible to warn women with premutation alleles for increased risk of having children with SXF and develop FOP, offering prenatal diagnosis for future pregnancies. Thus, it is possible to prevent the occurrence of children with SXF and make an approach directed to each familial element at risk.

Keywords

Fragile X syndrome, *FMR1* gene mutation, Number of CGG repeats, Mental retardation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Gene *FMRI* – Gene *Fragile X Mental Retardation 1*

UTR – *Untranslated region*

STAXF – Síndrome do Tremor e Ataxia associado ao X-Frágil

FOP – Falência ovárica precoce

SXF – Síndrome do X-frágil

CDC – Centro do Desenvolvimento da Criança

HP – Hospital Pediátrico, Carmona da Mota

CHC – Centro Hospitalar de Coimbra

MBB – Maternidade Bissaya Barreto

LCG-FMUC – Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina

PCR – *Polymerase chain reaction*

ISCN – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

ADPM – Atraso no desenvolvimento psicomotor

MLPA – *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

CGH – *Comparative Genomic Hybridization*

del – Deleção

dup – Duplicação

DPN – Diagnóstico pré-natal

PNDA – Perturbação do neurodesenvolvimento e autismo.

PHDA – Perturbação com hiperatividade e défice de atenção

AUT – Autismo

AD – Atraso no desenvolvimento

INTRODUÇÃO

Em 1991 no gene *FMRI* (Fragile X Mental Retardation 1)^{1,2} foi identificada uma mutação no locus de fragilidade Xq27.3 que consiste em múltiplas repetições polimórficas do trinucleótido CGG na região 5'UTR (untranslated region)^{3,4}, estando envolvido em três síndromes clínicas distintas: Síndrome do tremor/ataxia associado ao X-frágil (STAXF), Falência Ovárica Precoce (FOP) e Síndrome do X-frágil (SXF)⁵. Consoante o número de repetições do trinucleótido CGG do gene *FMRI* podem definir-se quatro formas alélicas distintas: normal, intermédia, premutação e mutação⁶. Num alelo normal, o número de repetições CGG pode variar entre 6 a 40 repetições^{3,7,8}. O alelo intermédio apresenta entre 41 a 54 repetições^{6,8-10} e o premutado entre 55 a 200¹¹. Quando o valor estiver acima de 200 repetições designa-se por mutação completa, encontrando-se normalmente o gene hipermetilado e causando SXF^{6,9,10}.

A SXF é uma patologia ligada ao X que resulta do défice ou ausência da proteína *FMRI*^{12,13}, importante na plasticidade e no funcionamento sináptico^{14,15}, sendo responsável por 30% das causas de deficiência intelectual hereditária¹⁶. Pode surgir nos dois géneros, mas é mais frequente e afeta mais severamente os homens (1/4000) em relação às mulheres (1/8000), que tendem a ter uma deficiência intelectual mais moderada^{6,17}. O diagnóstico puramente clínico é difícil de estabelecer pois são várias as alterações fenotípicas associadas, tais como: face alongada, proeminência das orelhas, macroorquidia pós-pubertária (volume testicular superior a 30 ml no adulto), pé chato, palato alto e hiperextensibilidade das metacarpofalângicas^{1,16} e vários graus de deficiência intelectual¹². As alterações cognitivas e do comportamento manifestam-se nestas crianças por hiperatividade, défice de atenção e autismo^{1,18}.

A FOP e a STAXF ocorrem em indivíduos com alelo premutado, estando associado ao aumento dos níveis do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) do gene *FMRI*. A FOP ocorre em cerca de 20% das mulheres com alelo premutado e resulta da perda dos folículos ovários antes dos 40 anos (menopausa precoce). A função cognitiva geralmente encontra-se normal, contudo algumas poderão apresentar dificuldades de aprendizagem e problemas emocionais, como ansiedade ou labilidade do humor⁵. A STAXF afeta sobretudo o homem idoso, 1/3 dos indivíduos do género masculino aos 50 anos¹⁹, com o aparecimento de uma patologia neurodegenerativa¹⁴. Clinicamente desenvolve-se progressivamente tremor intencional, ataxia cerebelosa, parkinsonismo e disfunção autonómica^{2,19}, assim como perda de memória, instabilidade emocional e défice cognitivo²⁰.

A transmissão geracional da premutação para mutação completa das mães saudáveis para os filhos com SXF é explicada pela expansão progressiva da repetição CGG na região 5'UTR do gene *FMRI*³. Através do estudo do gene *FMRI* é possível identificar o grau de expansão do gene *FMRI* em indivíduos assintomáticos, ajudando no estudo familiar²¹.

Este trabalho tem por objetivo determinar a incidência das formas alélicas numa amostra de 100 doentes que foram enviados do Centro do Desenvolvimento da Criança (CDC), do Serviço de Genética Médica do Hospital Pediátrico (HP) Carmona da Mota do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC) e da Maternidade Bissaya Barreto (MBB) para o Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina (LCG-FMUC), Universidade de Coimbra, Portugal. Também é objetivo deste trabalho realizar o estudo das famílias de crianças com SXF, de forma a alertar as mães para o risco de poderem ter outros filhos com SXF e para o risco aumentado de desenvolverem FOP. Deste modo, pode-se oferecer um diagnóstico pré-natal a gestações futuras de todos elementos familiares portadores da forma alélica premutada do género feminino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Foram selecionados os primeiros 100 doentes que em 2011 foram enviados do CDC e Serviço de Genética Médica do HP do CHC e MBB para o LCG-FMUC, Portugal, para realizarem o estudo do gene *FMRI*, no sentido de identificar os indivíduos portadores da mutação ou premutação.

Esta amostra foi dividida em dois grupos, consoante o género:

I – 62 homens, com idades compreendidas entre 2 e 33 anos, dos quais 5 apresentavam história familiar de deficiência intelectual e os restantes apresentavam alterações do desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem, alterações comportamentais e/ou dimorfismos.

II – 38 mulheres, com idades compreendidas entre 21 meses e 45 anos, das quais 4 com história familiar de deficiência intelectual e estavam grávidas, 3 tinham um filho com SXF, 2 com antecedentes familiares de défice cognitivo e as restantes com alterações do desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem, alterações comportamentais e/ou dimorfismos.

Citogenética convencional

A citogenética convencional foi feita a partir de culturas sincronizadas de linfócitos de sangue periférico, de acordo com os procedimentos de rotina do laboratório e os protocolos adaptados a partir do manual *Current Protocols in Human Genetics*²².

Os cromossomas com um padrão de bandas GTG foram analisados com um nível de resolução de 550 a 700 bandas, seguindo a nomenclatura estabelecida pelo *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*²³.

Em cada paciente foram analisadas 10 a 15 metafases utilizando um microscópio de *Nikon Eclipse* (Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, Holanda), acoplado a um sistema de *Cytovision* (Applied Imaging International Lda, Newcastle upon Tyne, UK).

Extração de ADN

Para o estudo das formas alélicas do gene *FMRI* foi necessário realizar a extração do ADN genómico a partir de linfócitos do sangue periférico. Esta foi realizada por um método de extração em colunas (*Jetquick DNA Midi Spin kit – Genomed*, Alemanha) em concordância com o protocolo recomendado pelo fabricante.

O ADN extraído foi quantificado e foi determinado o seu grau de pureza utilizando um espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific, USA*).

Análise de fragmentos no estudo do gene *FMRI*

A determinação do número de repetições do trinucleótido CGG do gene *FMRI* foi feita por análise de fragmentos de *Polymerase chain reaction* (PCR) utilizando um par de *primers* específicos para o gene *FMRI*²⁴. A análise dos fragmentos de ADN foi feita com o *software* GeneScan num sequenciador *ABI PRISM TM 3130* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*), para determinar a sua dimensão e o número de repetições do trinucleótido CGG. O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com o padrão de peso molecular *ROX 500* (*Applied Biosystems, Foster City, USA*).

De forma a esclarecer os resultados obtidos pela análise de fragmentos da PCR, quando não se verificou amplificação nas amostras do género masculino ou quando se obteve apenas um fragmento em amostras do género feminino, de forma a distinguir entre mulheres homocigóticas normais e mulheres com mutação completa, utilizou-se a técnica de *AmplideX*

® *FMRI PCR* (Asuragen, Inc., Austin, USA), que se baseia num *Triplet Repeat Primed PCR*²⁵.

RESULTADOS

Os dados completos da amostra em estudo encontram-se no anexo 1.

Determinação da incidência das formas alélicas e do número de repetições CGG

Os resultados numéricos (número de repetições CGG) foram enquadrados em 4 formas alélicas, que se apresentam de seguida:

Alelo normal – de 6 a 40 repetições.

Alelo intermédio – de 41 a 54 repetições.

Alelo premutado – de 55 a 200 repetições.

Alelo mutado – valor superior a 200 repetições: doentes com SXF.

No total, encontram-se 89/100 indivíduos com alelo normal, 5/100 com alelo intermédio, 3/100 com alelo premutado e 3/100 com alelo mutado.

Na figura 1, os gráficos A e B mostram a incidência das formas alélicas nos grupos I (62 homens com idades compreendidas entre 2 e 33 anos) e II (38 mulheres, com idades compreendidas entre 21 meses e 45 anos), respetivamente.

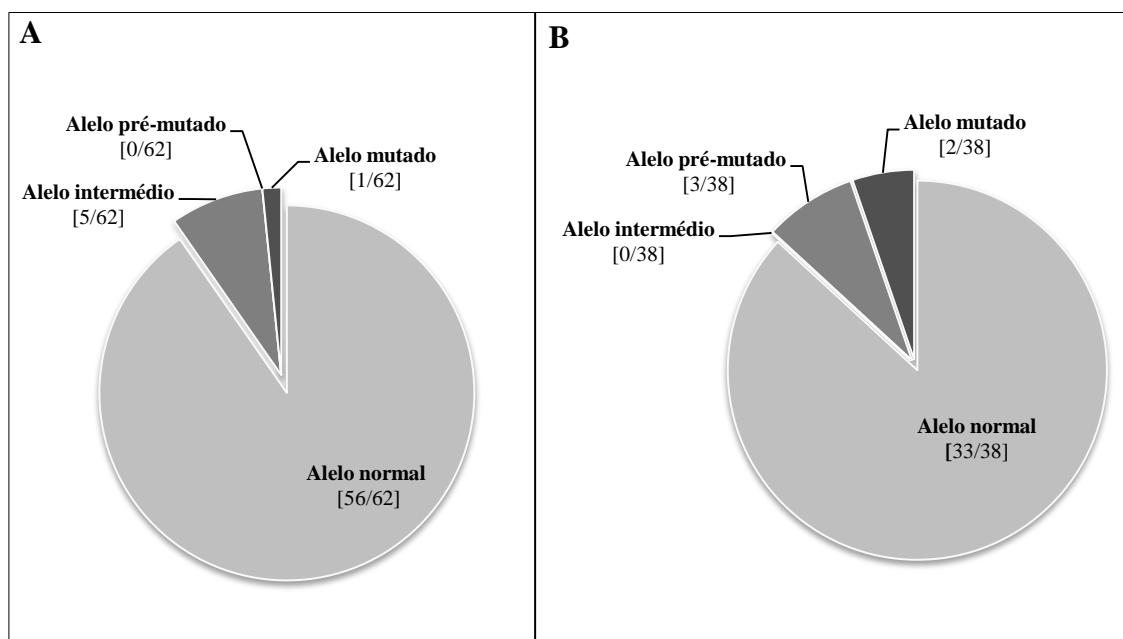


Figura 1. Incidência das formas alélicas em (A) grupo I e (B) grupo II.

A figura 2 mostra a frequência do número de repetições CGG em cada um dos grupos.

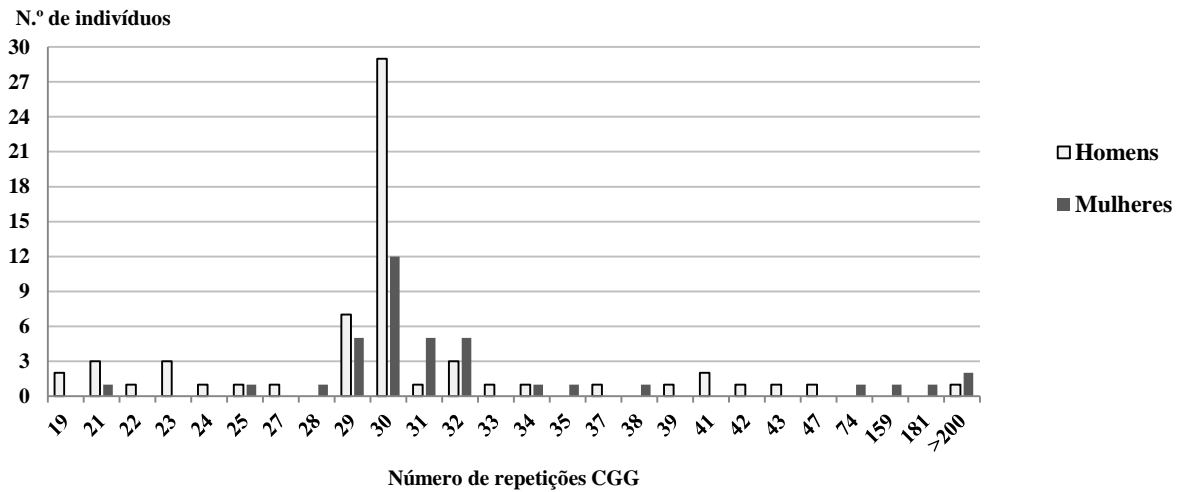


Figura 2. Frequência do número de repetições CGG nos grupos I e II da amostra.

Motivo para a realização do estudo do gene *FMRI* nos doentes da amostra

Na coluna 5, do anexo 1, são referidas as causas que motivaram a realização do estudo no gene *FMRI* nos doentes da amostra, incluindo também algumas características clínicas presentes nestes indivíduos.

Estudo familiar

Numa análise mais pormenorizada da amostra verificou-se que foram estudados quatro indivíduos de duas famílias diferentes.

Na família 1, o estudo iniciou-se por uma menina de 5 anos (III4; caso 1, anexo 1), com ADPM moderado, sem dimorfismos e com magreza constitucional, pelo que tinha indicação para realizar estudo do gene *FMRI*. Após a identificação da mutação em III4, foi feito o estudo molecular à mãe (II5; caso 50, anexo 1) e aos dois irmãos (III 2 e III3; casos 67 e 69, anexo 1). O resultado mostrou que a mãe é portadora do alelo premutado (159 repetições CGG num dos cromossomas X), mas que os irmãos tinham o alelo normal (um com 23

repetições CGG e outro com 21 e 30 repetições, porque tem 2 cromossomas X – Síndrome Klinefelter). Não foram estudados mais elementos familiares. O heredograma encontra-se na figura 3.

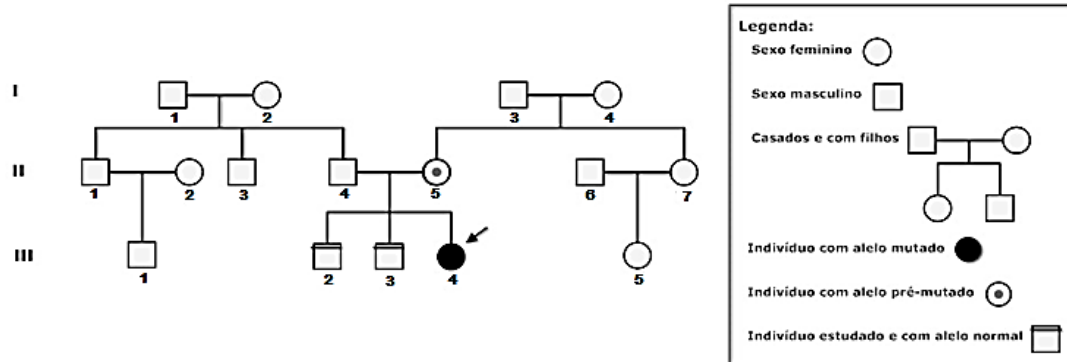


Figura 3. Heredograma da família 1.

Na família 2, o estudo familiar também se iniciou por uma menina, de 9 anos de idade, com ADPM global moderado, sem dimorfismos (III1; caso 3, anexo 1), cujo resultado revelou mutação no gene *FMRI*. Como a mãe (II2; caso 9, anexo 1) se encontrava grávida de gémeos no período em que se realizou o teste genético à menina, foi de imediato realizado o mesmo estudo à mãe, que revelou que é portadora do alelo premutado (74 repetições num dos cromossomas X). Também foram estudados o tio (II3; caso 16, anexo 1) e o primo (III4; caso 17, anexo 1) da menina (este último com ADPM), que apresentaram alelos normais (30 e 21 repetições CGG, respetivamente). O heredograma encontra-se na figura 4.

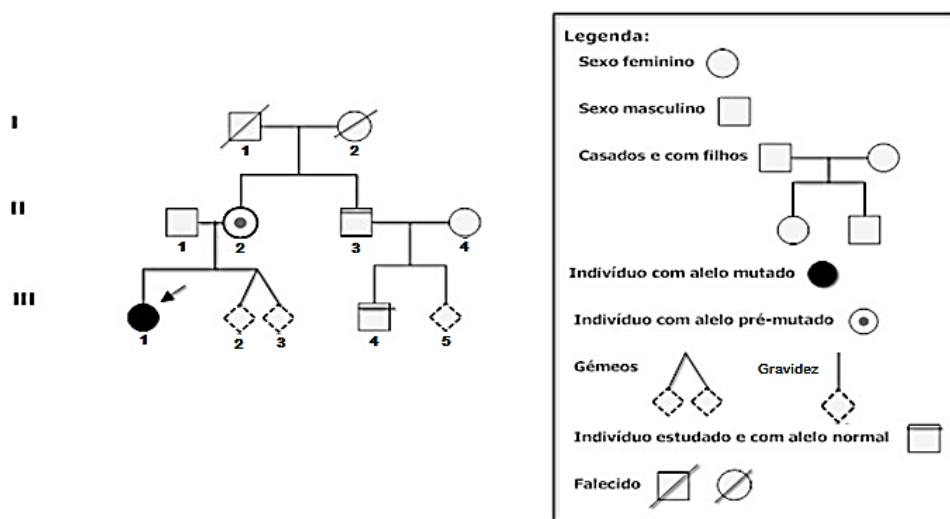


Figura 4. Heredograma da família 2.

DISCUSSÃO

Com a análise da amostra constatou-se que o alelo mutado existe em 2/38 mulheres e só em 1/62 homens, pelo que a maior incidência encontra-se no grupo II, o que não era esperado⁶. Por muitos anos acreditou-se que a mulher não teria SXF porque o mecanismo de inativação do cromossoma X inativaria preferencialmente o cromossoma mutado, pelo que naturalmente muitas destas meninas não devem ter sido estudadas, e portanto, tratava-se de uma situação subdiagnosticada. Atualmente, a metodologia de seleção já inclui meninas com deficiência intelectual. No entanto, e de acordo com a literatura, era espectável que neste trabalho a incidência do alelo mutado fosse superior nos homens, o que não se observou, provavelmente por se tratar de uma amostra de 100 doentes, cujo diagnóstico de SXF só foi feito em três doentes. As três crianças que foram diagnosticadas com SXF apresentavam clinicamente em comum deficiência intelectual de etiologia desconhecida, que é uma das características associadas a estes doentes, assim como diversas alterações comportamentais e físicas¹⁶. O menino apresentava deficiência intelectual severa enquanto nas duas meninas esta era moderada, o que está concordante com outros estudos⁶ porque nas mulheres afetadas o fenótipo é modulado pelo *ratio* da ativação com o cromossoma X normal¹⁸.

Verificou-se que os únicos três elementos da amostra com alelo premutado foram do grupo II (3/38), que realizaram o estudo do gene *FMRI* por terem um filho com SXF e não por apresentarem FOP, que seria outra das indicações para a realização desta análise⁶. No entanto, duas destas mulheres ainda estavam em idade de risco porque a FOP é uma patologia associada à perda precoce dos folículos ováricos, antes dos 40 anos de idade⁵. Também se verificou que como as três mulheres com alelo premutado têm 1 filho com SXF, não se pode deduzir se há uma maior ou menor probabilidade de aparecimento de filhos com SXF consoante o número de repetições CGG. No entanto, segundo a literatura, o caso 9 da amostra

teria 31% de probabilidade de ter um filho com SXF, porque tem 74 repetições CGG, já os casos 47 e 48 teriam 98% de probabilidade de terem um filho com SXF, por apresentarem mais de 100 repetições CGG²⁶.

Pelo contrário, no grupo I não existem indivíduos com alelos premutados e portanto, não foram identificados indivíduos com STAXF. Isto porque os elementos que tinham indicação para realizar o estudo no gene *FMRI* por terem na família uma criança com SXF (III1 da figura 4 e III4 da figura 3) não foram porque faleceram (I1 e I2 da figura 4) ou não foram informados do possível risco genético (I3, I4, II7 e III5 da figura 3). Também, como os restantes homens da amostra têm no máximo 33 anos de idade e a clínica desta patologia surge mais tarde¹⁹, não poder-se-ia encontrar algum indivíduo nesta amostra com clínica semelhante à da STAXF. Para isso, poder-se-ia alargar este estudo para indivíduos com mais de 50 anos e com tremor intencional, ataxia cerebelosa, parkinsonismo e disfunção autonómica^{2,19}. Sendo doenças de manifestação tardia, é importante que estes indivíduos de risco sejam referidos a consultas de aconselhamento genético prévias à realização dos testes.

Constatou-se que 5/62 homens que apresentavam clinicamente ADPM ligeiro, dificuldades de aprendizagem e/ou défice cognitivo eram portadores do alelo intermédio. Ou seja, pode-se concluir com estes resultados que um número de repetições CGG superiores ao normal se associa a uma clínica similar, embora muito mais suave, de SXF, como também já se tinha verificado em outros estudos clínicos⁸.

Nas duas famílias analisadas (heredogramas nas figuras 3 e 4), os primeiros elementos a serem estudados foram meninas com ADPM moderado, cujo resultado revelou serem portadoras do alelo mutado para o gene *FMRI*. Este foi transmitido pelas mães, que eram portadoras do alelo premutado (159 e 74 repetições CGG, respetivamente). Como as filhas têm alelos com um número de repetições CGG superior ao das mães conclui-se que ocorreu via transmissão meiótica materna uma expansão da premutação para mutação

completa²⁴. Mães portadoras da premutação têm 50% de probabilidade de transmitir o cromossoma X com o alelo premutado aos filhos do gênero masculino, podendo na descendência surgir uma criança com a premutação ou com a mutação completa, caso ocorra a expansão do número de repetições CGG. Os alelos premutados da descendência também podem ter um maior número de repetições CGG pelo mesmo mecanismo. Se tiverem filhos do gênero feminino, as probabilidades são iguais, mas devido ao mecanismo de inativação aleatória do cromossoma X¹⁸, as alterações genotípicas poderão não se refletir no fenótipo ou surgir de forma mais ligeira⁶. No entanto, estudos afirmam que esta expansão não se verifica quando a transmissão é paterna²⁴. Mas, nesta amostra não se pode confirmar este dado porque o indivíduo que poderia fornecer essa informação (II3, figura 4) é portador do alelo normal. O III4 (figura 4) também foi estudado porque tinha ADPM, mas não apresentava risco de ter uma alteração do gene *FMRI* porque o pai (II3, figura 4) era portador do alelo normal. Todavia, se eventualmente apresentasse o alelo premutado, poderia transmitir às filhas, mas nunca aos filhos, pois estes recebem o cromossoma Y paterno.

Deste modo, como II5 (figura 3) e II2 (figura 4) têm risco de terem crianças com SXF e de desenvolverem FOP é importante realizar um aconselhamento genético para que possam tomar as decisões mais adequadas face à condição de portadoras.

Na família 1, a senhora II5 (figura 4) tinha mais dois filhos, além da III4 com SXF, pelo que o III2 e III3 tinham indicação para realizar o estudo ao gene *FMRI*, até porque apresentavam ambos dificuldades de aprendizagem e o III3 também tinha epilepsia. O resultado revelou que eram ambos portadores do alelo normal, pelo que a sua clínica terá outra etiologia. Dever-se-ia então prosseguir o estudo genético destes elementos, no sentido de encontrar outra alteração que justificasse o fenótipo. Assim conclui-se que dos três filhos de II5, foi na menina que surgiu a mutação completa, e não nos meninos, como seria mais provável com base em outros estudos⁶.

Na família 2, a mãe (II2) estava grávida de gêmeos, pelo que realizou diagnóstico pré-natal. O resultado revelou que um dos filhos era uma menina (III2) portadora do alelo premutado e o outro filho era um menino (III3) com alelo normal. Assim conclui-se que II2 transmitiu o seu cromossoma X normal a III3 e o seu cromossoma X com alelo premutado às duas filhas (III1 e III2), sendo que ocorreu uma expansão para mutação completa em III1. Assim conclui-se que nesta família a II2 tem os três filhos com os três tipos de alelos distintos: alelo mutado (III1), premutado (III2) e normal (III3). Deste modo, a filha III2 também deve ser aconselhada geneticamente dada a sua condição de portadora.

Como são as mães que transmitem o alelo premutado, os elementos da parte materna de cada família deveriam ser estudados, dado o risco de existirem mais elementos familiares com alelos premutados (como a II7, figura 3) e, portanto, de virem a ter descendência com SXF. Também para entender melhor como ocorreu a transmissão nas famílias e devido ao risco de desenvolvimento da FOP nos elementos femininos e STAXF nos elementos masculinos das famílias, os indivíduos I3 e I4 (figura 3) e os indivíduos I1 e I2 (figura 4) deviam ser estudados. No entanto, a II5 (figura 3) da família 1 recusou revelar a sua condição genética, mesmo sabendo o risco dos seus familiares. Na família 2, o I1 e I2 já tinham falecido, pelo que não foi possível prosseguir com o estudo familiar até aos avós da família. Deste modo, conclui-se como é tão difícil realizar um estudo completo de uma família que apresenta uma mutação genética.

Nos grupos I e II da amostra, o número de repetições CGG mais frequente é o 30, seguido do 29 (ambos enquadrados no alelo normal), o que está concordante com estudos anteriores²⁴. Também o alelo normal foi o que se encontrou em maior frequência, surgindo em 89/100 indivíduos da amostra. Apesar de a maioria apresentar ADPM, não foi feita a correlação laboratorial com SXF, pelo que conclui-se que existem outras etiologias associadas à clínica destes indivíduos. O Colégio Americano de Genética Médica recomenda o estudo

genético de todos os indivíduos com deficiência intelectual de etiologia desconhecida, mesmo sem estar presente uma história familiar positiva²⁷. Então, no presente estudo e perante um fenótipo de ADPM e resultado de X-frágil normal, prosseguiu-se com outros estudos moleculares, nomeadamente: cariótipo em 45 indivíduos; *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) das regiões subteloméricas em 23 indivíduos; MLPA da região proximal do cromossoma 15 em 15 indivíduos; MLPA das microdeleções em 13 indivíduos; *Array Comparative Genomic Hybridization* (CGH) em 35 indivíduos; e em 11 casos não se realizou mais nenhum estudo complementar. Destes estudos complementares, observou-se que um indivíduo apresentava Síndrome de Klinefelter (47,XXY) e outro era portador de uma duplicação (dup) na região subtelomérica do braço curto dos cromossomas X/Y. Pelo Array-CGH identificaram-se 13 indivíduos com alterações cromossômicas (deleções e duplicações), sendo 6 de origem materna, 3 de origem paterna, 2 *de novo* e 6 de etiologia desconhecida, uma vez que não foi possível o estudo dos progenitores. Dos indivíduos que realizaram Array-CGH constatou-se que a extensão das deleções/duplicações é superior nas mutações *de novo*, que atingem 2,2Mb. Nas mutações familiares, as suas extensões apresentam habitualmente valores de 220-260Mb, sendo que o valor mais alto é de 1,6Mb. Também se verificou que em 5 destes indivíduos estudados foram identificadas 2 alterações cromossômicas concomitantes: uma deleção e uma duplicação em dois cromossomas diferentes; ou duas duplicações no mesmo cromossoma ou em cromossomas diferentes. Dos casos em que as alterações têm origens familiares e assumindo que o fenótipo dos pais é normal, pode-se concluir que estas alterações genéticas nos filhos não são a causa para a clínica que apresentam e, portanto, não se estabeleceu uma relação causal genótipo/fenótipo ou então pode-se concluir que estamos perante situações de penetrância variada. Os casos que apresentam uma mutação *de novo*, esta deve ser muito provavelmente a causa associada à clínica, pelo que se estabelece a causa do fenótipo.

Com este trabalho constatou-se que a avaliação de um fenótipo tão complexo como o ADPM obriga à aplicação de diferentes testes laboratoriais, uma história clínica completa e objetiva e a interpretação conjunta de todos os dados para se estabelecer uma relação genótipo/fenótipo.

CONCLUSÃO

Quando se trata de uma patologia hereditária, é essencial o estudo familiar para a identificação dos portadores da mutação e/ou premutação e para identificar quais os elementos suscetíveis de transmitirem à geração futura o alelo mutado, oferecendo-lhes o diagnóstico pré-natal e a interrupção voluntária da gravidez quando a mutação é identificada. Também permite identificar indivíduos portadores dos alelos associados à FOP e STAXF, fazendo uma abordagem dirigida a estes elementos familiares. Com o estudo familiar das duas famílias da amostra constatou-se que quando é o indivíduo do género feminino a transmitir o cromossoma X com a premutação pode ocorrer o mecanismo de expansão do número de repetições CGG, surgindo na descendência filhos com a premutação ou a mutação completa. No entanto, tal não se verifica quando a transmissão é feita pelo género masculino.

Apesar de a maioria dos elementos da amostra apresentarem ADPM, só em três crianças foi estabelecida a relação laboratorial com SXF, tendo tido os restantes indivíduos alelos normais, intermédios ou premutados. Este resultado reflete a multiplicidade de etiologias associadas ao ADPM. Logo, na avaliação de um fenótipo tão complexo como este, devem-se aplicar diferentes testes genéticos para se estabelecer a relação genótipo/fenótipo e estes laboratórios devem ter diversa tecnologia para tentar identificar ao máximo uma relação genética nos indivíduos com clínica de causa desconhecida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Isabel Marques Carreira por toda a dedicação, acessibilidade, amizade e interesse demonstrados durante a realização deste trabalho final do 6º Ano Médico com vista à atribuição do grau de mestre no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina.

À Professora Doutora Guiomar Gonçalves Oliveira, pela disponibilidade e auxílio na correção do trabalho.

À Susana Isabel Canas Ferreira, do LCG-FMUC, Portugal, por todo o apoio, disponibilidade para esclarecimento de dúvidas e tempo despendido na discussão dos resultados.

A todos os colegas do LCG-FMUC, Portugal, pela ajuda e por tudo que me ensinaram do funcionamento e das técnicas praticadas no Laboratório.

Aos meus pais, Abílio Vitorino e Celeste Pereira, por sempre me terem apoiado em todas as circunstâncias e pelas palavras de apoio durante todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, Nuno Araújo, pelo amor, carinho, motivação e ajuda prestada ao longo da realização da tese, em especial no tratamento dos dados estatísticos.

Aos meus amigos, em especial à Andrea Machado, por todo o apoio, amizade e auxílio na discussão do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hagerman RJ. Fragile X syndrome. Molecular and clinical insights and treatment issues. *The Western journal of medicine*. 1997;166(2):129-37.
2. Hagerman PJ, Hagerman RJ. The fragile-X premutation: a maturing perspective. *American journal of human genetics*. 2004;74(5):805-16.
3. Turk J. Fragile X syndrome. *Archives of disease in childhood*. 1995;72(1):3-5.
4. Goodrich-Hunsaker NJ, Wong LM, McLennan Y, Tassone F, Harvey D, Rivera SM, et al. Adult Female Fragile X Premutation Carriers Exhibit Age- and CGG Repeat Length-Related Impairments on an Attentionally Based Enumeration Task. *Frontiers in human neuroscience*. 2011;5:63.
5. Oostra BA, Willemsen R. A fragile balance: FMR1 expression levels. *Human molecular genetics*. 2003;12 Spec No 2:R249-57.
6. Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2005;7(8):584-7.
7. de Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile X syndrome. *Journal of medical genetics*. 1998;35(7):579-89.
8. Aziz M, Stathopulu E, Callias M, Taylor C, Turk J, Oostra B, et al. Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2003;121B(1):119-27.
9. Bodega B, Bione S, Dalpra L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, et al. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod*. 2006;21(4):952-7.

10. Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod.* 2010;25(5):1335-8.
11. Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *American journal of medical genetics Part A.* 2008;146A(8):1009-16.
12. McLennan Y, Polussa J, Tassone F, Hagerman R. Fragile x syndrome. *Current genomics.* 2011;12(3):216-24.
13. de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *American journal of human genetics.* 1997;61(3):660-7.
14. Loesch DZ, Churchyard A, Brotchie P, Marot M, Tassone F. Evidence for, and a spectrum of, neurological involvement in carriers of the fragile X pre-mutation: FXTAS and beyond. *Clinical genetics.* 2005;67(5):412-7.
15. Kronk R, Bishop EE, Raspa M, Bickel JO, Mandel DA, Bailey DB, Jr. Prevalence, nature, and correlates of sleep problems among children with fragile X syndrome based on a large scale parent survey. *Sleep.* 2010;33(5):679-87.
16. Ridaura-Ruiz L, Quinteros-Borgarello M, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C. Fragile X-syndrome: literature review and report of two cases. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal.* 2009;14(9):e434-9.
17. Hagerman PJ. The fragile X prevalence paradox. *Journal of medical genetics.* 2008;45(8):498-9.
18. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Human molecular genetics.* 2000;9(6):901-8.

19. Tassone F, Iwahashi C, Hagerman PJ. FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA biology*. 2004;1(2):103-5.
20. Amiri K, Hagerman RJ, Hagerman PJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: an aging face of the fragile X gene. *Archives of neurology*. 2008;65(1):19-25.
21. Smits AP, Dreesen JC, Post JG, Smeets DF, de Die-Smulders C, Spaans-van der Bijl T, et al. The fragile X syndrome: no evidence for any recent mutations. *Journal of medical genetics*. 1993;30(2):94-6.
22. Bangs CD, Donlon TA. Metaphase chromosome preparation from cultured peripheral blood cells. *Curr Protoc Hum Genet*. 2005;Chapter 4:Unit 4 1.
23. Shaffer L SM, Campbell L. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009 - Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.
24. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 1991;67(6):1047-58.
25. Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, et al. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *Journal of medical genetics*. 1996;33(12):1022-6.
26. ACOG Committee Opinion No. 469: Carrier screening for fragile X syndrome. *Obstetrics and gynecology*. 2010;116(4):1008-10.
27. Wattendorf DJ, Muenke M. Diagnosis and management of fragile X syndrome. *American family physician*. 2005;72(1):111-3.

ANEXOS

Anexo 1: Amostra de 100 doentes que realizaram estudo genético em 2011.

Caso	Género	Idade (anos)	Serviço	Motivo para estudar o gene <i>FMRI</i>	Repetições CGG
1	M	5	HP Genética	Atraso desenvolvimento psicomotor (ADPM) global moderado	31, >200
2	H	2	HP Genética	ADPM severo, macrocâneo	> 200
3	M	9	HP Genética	ADPM global moderado, sem dimorfismos, mãe grávida de 15 semanas (caso 9)	29, > 200
4	H	4	CDC	Perturbação do neurodesenvolvimento e autismo (PNDA)	29
5	M	3	CDC	Autismo (AUT)	32, 32
6	H	6	CDC	AUT	30
7	M	2	HP Genética	ADPM, principalmente na linguagem. Dimorfismos inespecíficos.	21,29
8	M	9	CDC	AUT	29, 30
9	M	34	HP Genética	Filha com mutação (caso 3) e agora está grávida	30,74
10	H	2	HP Genética	ADPM, problemas comportamentais, dimorfismos. Manchas cutâneas. Má progressão estato-ponderal e macrocefalia	32
11	H	9	HP Genética	Défice cognitivo e de linguagem	21
12	H	14	CDC	Défice cognitivo, sem dimorfismos, exames neurológicos sem alterações, história familiar de défice de aprendizagem	30
13	H	11	CDC	Défice cognitivo e dimorfismos	19
14	M	6	HP Genética	ADPM, dimorfismos, ligeira surdez de transmissão, antecedentes familiares com défices de aprendizagem	29, 30
15	H		HP Genética	ADPM, lábios finos, epicanto	30
16	H	31	HP Genética	Tio do caso 3	30
17	H	16	HP Genética	ADPM, Primo do caso 3	21
18	M	35	MBB Genética	Grávida de 21 semanas e com sobrinha de 35 anos com défice cognitivo grave	21, 30
19	M	33	MBB Genética	Grávida de 16 semanas e com antecedentes familiares de défice cognitivo	30,32
20	M	12	HP Genética	Dificuldade de aprendizagem, alterações comportamentais graves	21,35
21	M	9	HP Genética	Dificuldade de aprendizagem, atresia das veias umbilicais	29,31
22	H	5	HP Genética	ADPM ligeiro, microcefalia, AUT	47
23	H	2	CDC	ADPM, dimorfismos	21

24	H	11	CDC	Défice cognitivo ligeiro, dimorfismos compatível com X-frágil	23
25	M	7	HP Genética	Hirsutismo, ADPM	29, 30
26	H	4	CDC	AUT	30
27	H	5	HP Genética	ADPM ligeiro, dimorfismos minor	43
28	H	11	CDC	AUT	22
29	H	9	HP Genética	ADPM, manchas hipocrómicas	30
30	M	12	HP Genética	Défice cognitivo	23, 30
31	H	12	HP Genética	Surdez de causa genética (heterozigoto), défice cognitivo, problemas de comportamento, dimorfismos	30
32	H	5	HP Genética	Perturbação com hiperatividade e défice de atenção (PHDA) e ADPM	29
33	M	28	HP Genética	Antecedentes familiares de défice cognitivo	29
34	H	4	CDC	AUT	30
35	H	3	HP Genética	ADPM	31
36	H	7	CDC	AUT	30
37	H	11	HP Genética	ADPM e história familiar presente	30
38	M	34	MBB Genética	Casal consanguíneo com sobrinho com atraso no desenvolvimento (AD)	22,31
39	H	33	MBB Genética	Casal consanguíneo com sobrinho com AD	30
40	M	4	HP Genética	ADPM	23,25
41	H	6	HP Genética	AD e alteração comportamental	30
42	M	4	HP Genética	ADPM global, estrabismo, miopia, PHDA	29, 30
43	H	2	CDC	ADPM	30
44	M	6	HP Genética	Epilepsia, cifose dorsal, pés varos, dimorfismos e ADPM. História familiar materna e paterna de doença psiquiátrica.	29,32
45	H	10	CDC	ADPM	30
46	H	7	HP Genética	Dificuldade de aprendizagem, macrocefalia, relativa obesidade	30
47	M	8	CDC	Défice cognitivo	24,28
48	M	10	CDC	Cognição borderline em contexto de história familiar positiva	21,31
49	H	8	HP Genética	Irmão com mutação completa do X-frágil	24
50	M	45	HP Genética	Mãe de caso 1	24, 159
51	M	31	HP Genética	Mãe do caso 2	21, 181
52	H	4	HP Genética	ADPM ligeiro, macrocefalia	42
53	M	33	HP Genética	Irmã com decide cognitivo e epilepsia	21, 30
54	H	3	HP Genética	ADPM	30
55	M	2	HP Genética	ADPM e macrocefalia	28,29
56	H	4	CDC	AUT	30
57	H	4	HP Genética	ADPM	30
58	M	3	CDC	ADPM e fâcies dismórfica	29, 30
59	H	12	HP Genética	Défice de aprendizagem, diminuição estatura, pés diminuídos de tamanho, macrocefalia, problemas articulares	30

60	H	4	HP Genética	ADPM, imunodeficiência relativa	39
61	H	3	CDC	AUT	29
62	H	11	HP Genética	ADPM, microcefalia	30
63	H	11	HP Genética	Dificuldades escolares	30
64	M	4	HP Genética	Macrossomia, AUT, atraso na linguagem	30,31
65	M	9	HP Genética	ADPM familiar, sem dimorfismos significativos	30,34
66	H	5	CDC	Défice cognitivo	41
67	H	10	HP Genética	Irmão do caso 1	23
68	M	17	HP Genética	Défice cognitivo	29,32
69	H	13	CDC	Crises matinais de náuseas, vômitos, ataxia e cefaleias. Dificuldades de aprendizagem. Conformação corporal gineóide. Irmão do caso 1	21,30
70	H	3	HP Genética	ADPM, dimorfismos semelhantes a familiares	27
71	H	5	HP Genética	ADPM	29
72	H	8	HP Genética	Défice cognitivo ligeiro e AD	30
73	M	21	HP Genética	Dificuldades de aprendizagem, obesidade, amnorreia, dimorfismos craneofaciais	21,38
74	M	14	CDC	Dificuldade de aprendizagem em irmão com duplicação 15. Mãe com duplicação 15	30, 30
75	H	4	HP Genética	ADPM, macrocefalia, obesidade, macrossomia	30
76	H	12	HP Genética	ADPM, voz nasalada, nariz troncular	25
77	H	2	CDC	Macrocefalia e défice cognitivo, mais evidente na linguagem	19
78	H	11	HP Genética	Dificuldades de aprendizagem e relativa macrocefalia	30
79	H	5	HP Genética	ADPM, macrocefalia, alterações do comportamento	33
80	H	4	HP Genética	ADPM com hipotonia dos membros inferiores	30
81	H	6	HP Genética	ADPM, pé boto bilateral, bronquiolites de repetição, hérnia inguinal, miopia, dimorfismos	29
82	M	37	HP Genética	Grávida de 13 semanas, com antecedentes familiares de défice cognitivo	30,31
83	H	5	HP Genética	ADPM sem dimorfismos	32
84	M	4	HP Genética	ADPM global, dimorfismos, mas crescimento normal	23, 30
85	M	11	HP Genética	ADPM ligeiro e hirsutismo	15, 21
86	H	11	CDC	Dificuldades de aprendizagem e obesidade	41
87	H	13	CDC	Encefalopatia epilética com comportamento autista e dificuldades de aprendizagem	32
88	H	10	CDC	Síndrome Asperger - AUT	29

89	H	10	HP Genética	ADPM, face longa, estrabismo	34
90	H	5	CDC	AUT sem défice cognitivo	30
91	H	3	CDC	AUT clássico	30
92	M	21 meses	CDC	Hipotonia axial, AD a nível motor	29, 30
93	M	7	HP Genética	AD predominantemente na linguagem com história familiar, QI no limite inferior	23, 30
94	H	13	HP Genética	ADPM com voz nasalada.	30
95	M	5	HP Genética	ADPM global.	30,32
96	H	9	CDC	Dificuldades de aprendizagem. Irmão com clínica semelhante.	29
97	H	15	CDC	Epilepsia e défice cognitivo.	37
98	M	10	CDC	ADPM	23, 29
99	H	5	CDC	AUT	23
100	M	14	HP Genética	Défice cognitivo e motor grave, AUT, epilepsia.	20, 29