

ARTIGO ORIGINAL

# Investigação molecular por PCR da Síndrome do Cromossomo X Frágil em homens com transtornos invasivos do desenvolvimento

## Molecular investigation by PCR of Fragile X Syndrome in men with pervasive developmental disorders

Adriana Barbosa de Oliveira<sup>1</sup>, Carina Tatiana Giunco<sup>2</sup>, Andréa Borduchi Carvalho, Franco Salles<sup>3</sup>, Agnes Cristina Fett Conte<sup>4</sup>

Estagiária de Iniciação Científica do Serviço de Genética da FAMERP<sup>1</sup>, Doutoranda em Genética pela UNESP – Câmpus de S. J. do Rio Preto<sup>2</sup>, Responsável pelo Serviço de Biologia Molecular – Hemocentro/FUNFARME<sup>3</sup>, Docente e Chefe do Serviço de Genética da FAMERP<sup>4</sup>

**Resumo** Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento afetam cerca de 2-5 a cada 1.000 crianças, interferem no desenvolvimento emocional e cognitivo e caracterizam-se por prejuízo severo do desenvolvimento, comportamento estereotipado, interesses e atividades restritas. Incluem cinco diagnósticos: Transtorno Desintegrativo da Infância, Transtornos Invasivos do Desenvolvimento Sem Outra Especificação, Síndrome de Rett e de Asperger e Autismo. Tais transtornos têm sido associados a várias doenças genéticas, com destaque para a Síndrome do Cromossomo X Frágil, que resulta de mutações no gene *FMR-1* e é a maior causa de retardo mental em meninos. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença da mutação completa do gene *FMR-1*, com a utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em homens portadores de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento. Entre os 25 indivíduos estudados, um apresentou a mutação completa. A frequência de 4% da síndrome corrobora os dados da literatura e reforça o conceito de que esta doença representa um fator etiológico importante e deve ser investigada em todo indivíduo com estes distúrbios comportamentais, inclusive por suas implicações no processo de Aconselhamento Genético das famílias.

**Palavras-chave** Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, Síndrome do X Frágil, Autismo.

**Abstract** Pervasive Developmental Disorders occur in about 2-5 out of every 1,000 children. They interfere in the emotional and cognitive development and are characterized by severe impairment of the development, stereotyped behavior and restricted interests and activities. There are five diagnoses: Pervasive Developmental Disorder, Pervasive Developmental Disorder – Not Otherwise Specified, Rett's Disorder, Asperger's Syndrome and Autism. These disorders have been associated with genetic diseases in particular with Fragile X Syndrome resulting in mutations in the *FMR-1* gene, which is the greatest cause of mental retardation in boys. This work aimed at investigating the presence of full mutations of the *FMR-1* gene using Polymerase Reaction Chain (PCR) in male carriers of Pervasive development Disorders. Out of the 25 individuals studied, one presented with a full mutation. The frequency of 4% of full mutations within the syndrome confirms published data and reinforces the concept that this disease represents an important etiological factor which should be tested in all individuals with these behavioral disorders, thereby providing screening for genetic counseling of the families involved.

**Keywords** Pervasive developmental disorders; Fragile X Syndrome; Autism

### Introdução

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (Pervasive Developmental Disorders-PDDs) são doenças psiquiátricas graves que interferem no desenvolvimento emocional e cognitivo. Caracterizam-se por prejuízo severo das áreas do desenvolvi-

mento, pela presença de comportamento estereotipado e interesses e atividades restritas<sup>1,2</sup>. Compõem um grupo de cinco doenças: o Transtorno Desintegrativo da Infância, os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento Sem Outra Especificação [Pervasive Developmental Disorders, Not Otherwise Specified (PDD-

NOS)], as síndromes de Rett e de Asperger e o Autismo<sup>1,2,3</sup>. São doenças de etiologia complexa, heterogênea e pouco conhecida, cujos tratamentos são apenas paliativos e sintomáticos. Dentre elas se destaca o autismo, pela sua precocidade e maior frequência na população<sup>1,3</sup>.

Os PDDs em geral e especialmente o autismo têm sido associados a algumas doenças gênicas e aberrações cromossômicas autossômicas e de cromossomos sexuais, entre as quais se destacam a Síndrome do cromossomo X frágil (FRA X) e a Esclerose Tuberosa (ET)<sup>1,3,4,5,6</sup>.

A síndrome do FRA X é a forma mais comum de retardo mental hereditário, afeta cerca de 1:1000 indivíduos da população<sup>7</sup>. A incidência da síndrome do FRA X na população autista varia de 0 a 20%<sup>8,9</sup>. As manifestações físicas e cognitivas variam e incluem macroorquidismo, orelhas grandes e em abano, mandíbula proeminente, retardo mental moderado a severo e comportamento autístico<sup>4,7,10,11,12</sup>.

A patogenia molecular desta doença envolve uma expansão repetida de trinucleotídeos (CGG)<sub>n</sub>, localizada na porção 5' não traduzida do primeiro exon do gene *FMR-1* (Fragile Mental Retardation 1)<sup>4,5,11,13</sup>, levando a uma hipermetilação do promotor e reprimindo a expressão do mesmo<sup>14</sup>. Isto reduz efetivamente ou impede a produção da proteína FMRP, essencial para a função cerebral normal<sup>15</sup>. O nível desta proteína entre os afetados varia e influencia na gravidade do retardo mental<sup>16</sup>. Quando a hipermetilação ocorre, a enzima necessária para a transcrição está impossibilitada de se ligar à região promotora e iniciar este processo. O resultado final é que o RNA mensageiro não é produzido, uma condição que leva ao silenciamento transcricional do gene<sup>17,18</sup>.

O número de repetições CGG no gene *FMR-1*, na população normal, varia de 6 a 50 repetições, sendo considerado como polimorfismo. Em portadores não afetados, esta seqüência está repetida entre 60 e 200 vezes, um evento conhecido como pré-mutação. Os indivíduos afetados, contudo, possuem mais de 200 repetições, ou seja, mutação completa<sup>18</sup>.

É provável que a Síndrome do FRA X ocorra devido à incapacidade da proteína FMRP ligar-se a RNAs, porque o fenótipo pode surgir de uma mutação no sentido errôneo (missense), modificando o seu centro ativo<sup>19</sup>.

Vários centros de diagnóstico molecular de todo o mundo usam as técnicas de PCR e Southern blotting para diagnosticar e caracterizar a presença e o tamanho da repetição CGG, pois a expansão está associada, na maioria dos casos, com alterações fenotípicas<sup>20</sup>.

Haddad e colaboradores (1996)<sup>21</sup> descreveram uma técnica que permite a identificação de homens com a mutação completa pela falta do produto de amplificação, que é detectado apenas em homens portadores da pré-mutação e em indivíduos normais.

A avaliação molecular da Síndrome do FRA X nos casos de PDDs, portanto, pode elucidar a etiologia genética desses transtornos e auxiliar na conduta terapêutica dos casos e no aconselhamento genético das famílias.

## Material e Métodos

Após a aprovação pelo CEP (FAMERP) e CONEP (processo nº 25000.112886/2001-53) e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução 196/96), foram estudados 25 indivíduos do sexo masculino, com idades entre 05 e 24 anos (x=12,12 ou 12 anos), com diagnóstico de Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, segundo os critérios do DSM-IV<sup>2</sup>, provenientes da Escola Municipal do Autista "Maria Lúcia de

Oliveira" (EMA) de São José do Rio Preto, da Associação Amigos dos Autistas (AMA) de Barretos e de clínica particular. Os diagnósticos foram realizados por psiquiatras e psicólogos especialistas em PDDs.

O DNA genômico de cada indivíduo foi obtido a partir de leucócitos de sangue venoso periférico, segundo a técnica descrita por Abdel-Rahman *et al* (1994)<sup>22</sup>, com modificações.

A investigação do polimorfismo de repetições de trinucleotídeos, presente no gene *FMR-1*, responsável pela síndrome do X frágil, foi realizada segundo a técnica descrita por Haddad *et al.* (1996)<sup>21</sup>, com modificações. Tal técnica consistiu na amplificação da região do gene que contém as repetições CGG, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Tal protocolo baseia-se no fato de que as mutações completas não sofrem amplificação sob as condições da técnica, que é, portanto, indicativa da presença ou ausência da mutação. Para tanto, foram utilizados três primers, de seguintes nomes e seqüência:

*f* = 5' agccccgactccaccaccagctcctcca 3'

Eag-U = 5' cgacctgtcaccgccttcagcctcc 3'

Eag-L = 5' cgctgctgggtgtaaacactgaaaccagtc 3'

O resultado da amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de poli-acrilamida não-desnaturante a 7,5% e o gel corado segundo o método descrito por Santos *et al.* (1993)<sup>23</sup>, com modificações,

Os indivíduos portadores da síndrome do FRA X foram identificados pela ausência da banda polimórfica, de cerca de 550pb, revelando a presença da mutação completa. A exclusão do falso-positivo foi definida pela presença do controle interno (banda de 223pb). Os primers Eag-U e *f* flanqueiam a região de polimorfismo das repetições CGG, produzindo um fragmento de amplificação de 550pb nos indivíduos normais. Quando ocorre a mutação completa, esse fragmento não é obtido, pois as condições da reação de PCR são ineficientes para a amplificação de seqüências longas de DNA. Um fragmento de 223pb é resultante da amplificação da região não-polimórfica flanqueada pelos primers Eag-U e Eag-L, interna ao segmento de interesse e que serve como controle da reação de PCR para cada caso.

## Resultados

Os resultados da análise molecular por PCR mostraram 24 indivíduos com a banda polimórfica de 550pb e a banda controle de 223pb. Portanto, estes foram considerados normais.

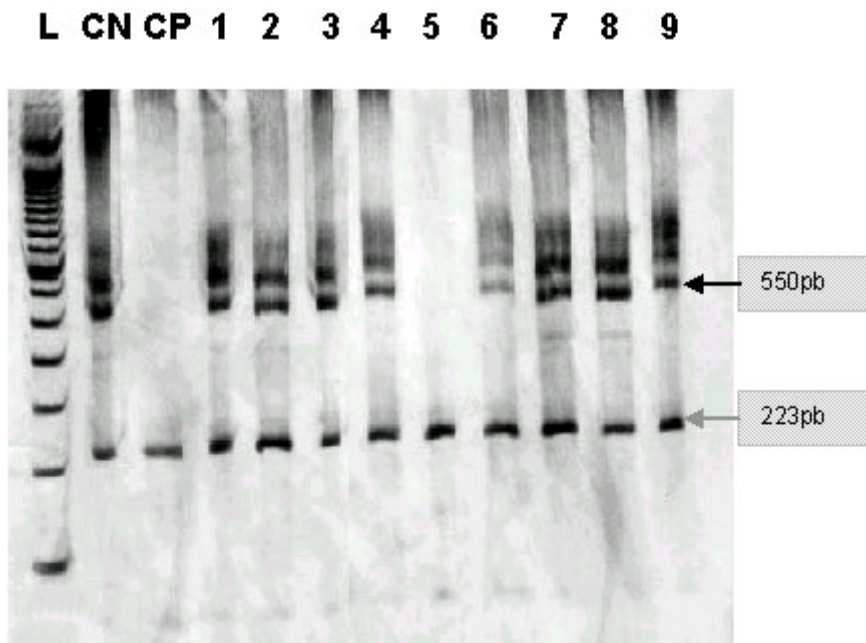
Contudo, um caso não apresentou a banda polimórfica, apenas a controle, evidenciando a falta de amplificação da região alvo. Este, portanto, mostra padrão eletroforético compatível com a mutação completa do gene *FMR-1* e foi considerado afetado pela síndrome do FRA X (Figura 1).

## Discussão

As frequências de autismo e de outros PDDs associados a outras doenças genéticas e ambientais variam de 10 a 37%. A identificação dessas patologias é de extrema importância e depende de um trabalho multidisciplinar que envolve psicólogos, psiquiatras, pediatras, geneticistas, entre outros profissionais da área de saúde. A identificação de subgrupos de PDDs, baseada nestas associações e nos padrões neuropsicológicos, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos patológicos envolvidos no fenótipo comportamental e no aconselhamento genético<sup>7,24,25</sup>.

Ainda não está esclarecido se o comportamento autístico é parte do espectro da síndrome ou se o X frágil é parte do espectro autista, ou se são dois distúrbios distintos com aumento da

**Figura 1.** Amplificação por PCR na região do X frágil. Fotografia de uma corrida em gel de poliacrilamida 7,5% não desnaturante, mostrando amplificação de DNA de homens normais (*linhas 1,2,3,4,6,7,8,9*) e um indivíduo afetado (*linha 5*). A banda inferior de 223pb (seta cinza) constitui o controle interno da reação de PCR. A banda superior com 550pb (seta preta) representa a amplificação do produto contendo repetições (CGG)<sub>n</sub> em indivíduos normais. A linha *L* representa o Ladder, DNA marcador de peso molecular de 100pb. A linha *CN* indica o uso de um controle negativo e a linha *CP* indica o uso de um controle positivo.



comorbidade<sup>26</sup>. As pesquisas têm se limitado a correlacionar ou comparar estas duas patologias e não têm examinado a relação entre a expressão da proteína e o comportamento autista, estendendo a questões sobre quais destas variáveis interagem ou estão correlacionadas<sup>27</sup>.

O X frágil (FRAXA) resulta da expansão repetida de trinucleotídeos CGG em Xq27.3, o que reprime a produção da proteína FMRP, essencial para a função cerebral normal e pode explicar o fenótipo comportamental<sup>9,28</sup>. Próximos a esta região estão mapeados o gene FRAXE (*FMR-2*), associado com deficiência mental e o gene que codifica a subunidade alfa 3 do receptor GABA-

A O GABA é o neurotransmissor inibitório mais importante em mamíferos e uma alteração das subunidades poderia alterar a atividade do receptor e, conseqüentemente, a atividade cerebral<sup>28</sup>.

Portanto, a presença de 4% de portadores de FRA X entre os pacientes estudados neste trabalho corrobora os dados da literatura, reforça o conceito de que esta doença representa um dos fatores etiológicos mais importantes em PDDs e que deve ser investigada em todo indivíduo com estes distúrbios comportamentais.

## Referências bibliográficas

1. CID 10. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas; 1994.
2. APA (American Psychiatric Association): Diagnostic and statistical manual of mental retardation. 4ª ed. Washington: American Psychiatric Press; 1994.
3. Steiner CE, Guerreiro MM, Marques-de-Faria AP. Genetic and neurological evaluation in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2003;61(2A):176-80.
4. Boy R, Correia OS, Llerena JC, Machado-Ferreira MC, Pimentel MMG. Síndrome do X Frágil: Estudo caso-controlado envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2001;59(1):83-8.
5. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics* 2004; 113(5):e472-86.
6. Tanguay P. Pervasive developmental disorders: a 10 year review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000;39(9):1079-95.
7. Veiga MF, Toralles MBP. Neurological manifestation and genetic diagnosis of angelman, rett and fragile-X syndromes. *J Pediatr* 2002;78(Supl 1):S55-62.
8. Lotspeich LJ. Autism and pervasive developmental disorders. 2001. Disponível em: URL: <http://www.acnp.org/G4/GN401000160/CH.html>.
9. Song FJ, Barton P, Sleightholme V, Yao GL, Fry-Smith A. Screening for fragile X syndrome: a literature review and modelling study. *Health Technol Assess* 2003; 7(16):1-106.
10. Eliez S, Reiss AL. Development and neurobiology: genetics of childhood disorders: fragile x syndrome. *J Am Acad Child Psychiatry* 2000;39(2):264-6.

11. Weinhäusel A, Haas OA. Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum Genet* 2001;108:450-8.
12. Oostra BA, Bontekoe CJM, Bakker CE, Niewenhuizen LM, Van der Linde H, Lans H et al. Instability of a (CGG)<sub>98</sub> repeat in the *FMR1* promoter. *Hum Mol Genetics* 2001;10(16):1693-9.
13. Arrieta I, Penafarikano O, Telez M, Ortega B, Flores P, Criado B et al. The *FMR-1* CGG repeat and linked microsatellite markers in two Basque valleys. *Heredity* 2003;90(3):206-11.
14. O'Donnell WT, Warren ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Ann Rev Neurosci* 2002;25:315-38.
15. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9(6):901-8.
16. May TS. Evidence of altered synaptic plasticity found in fragile X syndrome. *Lancet Neurol* 2002;1(3):141.
17. Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. The fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull* 2001;56(3,4):375-82.
18. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A et al. Expansion of the fragile X CGG in females with permutation of intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003;72:454-64.
19. Reyniers E, Wolf G, Tariverdian G, De Bouille K, Storm K, Kooy RF et al. Severe mental retardation and macroorchidism without mutation in the *FMR-1* gene. *Am J Med Genet* 1996;64:408-12.
20. Rife M, Mallolas J, Badenas C, Tazon B, Mígueles MR, Pampols T, et al. Pilot study for neonatal screening of fragile X síndrome. *Prenat Diagn* 2002;22(6):459-62.
21. Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. A PCR based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet* 1996;97:808-12.
22. Abdel-Rahram SZ, Nouraldeen AM, Ahamed AE. Molecular interaction of [2,3 14C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *Biochem Toxicol* 1994;9(4):191-8.
23. Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopique. *Hum Genet* 1993;90:655-6.
24. Miles JH, Hadden LL, Takahashi TN, Hillman RE. Head circumference is an independent clinical finding associated with autism. *Am J Med Genet* 2000;95(4):339-50.
25. Bodier C, Lenoir P, Malvy J, Batherlemy C, Wiss M, Sauvage D. Autism and associated pathologies. Clinical study of 295 cases involving developmental disorders. *Presse Med* 2001;1:1199-1203.
26. Bailey DB Jr., Hatton DD, Skinner M, Mesibov G. Autistic behavior, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. *J Autistic Dev Disord* 2001;31(2):165-7.
27. Giunco CT. Avaliação genético-clínica e citogenética molecular das regiões 7q31-q33 e 15q11-q13 em transtornos invasivos do desenvolvimento [dissertação]. São José do Rio Preto: UNESP/IBILCE; 2002.
28. D'Antonuoono D, Merlo D, Abolí M. Involvement of cholinergic and fabaergic systems in the fragile X knockout mice. *Neuroscience* 2003;19:9-13.

---

### Correspondência

Adriana Barbosa de Oliveira  
Rua Borba Gato, 444 Bairro: Maceno  
São José do Rio Preto – SP  
CEP: 15060-180  
Telefone: (17) 210-5000 ramal 1931  
E-mail: [genetica@famerp.br](mailto:genetica@famerp.br)

---