

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE - FACES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ISABEL CRISTINA CORRÊA MERINO FABIANO SOARES

**ASPECTOS GENÉTICOS E CONDUTA DIAGNÓSTICA DA SÍNDROME DO X
FRÁGIL**

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo elaborado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da professora Dra. Fernanda Costa Vinhaes de Lima.

BRASÍLIA
2019

Agradecimentos

A Deus pelas oportunidades, ensinamentos e bênçãos que recebi até aqui.

À minha família, em especial, minha mãe Irene e meu pai Julio que sempre entenderam minhas ausências de forma paciente e amorosa, me apoiando e incentivando durante toda a minha jornada acadêmica.

À minha irmã, Paula Cristina, por ser o modelo de inspiração e motivação no qual me espelho para alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos avós, Paulo, Elza, Maria Lúcia e Heni pelo carinho e apoio recebido.

À minha tia Gracinda, que mesmo distante, está sempre me acompanhando e incentivando.

Aos meus amigos Giovanna e Ian que me acompanharam durante os 4 anos de curso, demonstrando amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos professores do curso de Biomedicina pelo aprendizado, em especial, à professora Fernanda, que me orientou, durante a realização desse projeto, de forma tão atenciosa e paciente, constantemente disposta a me auxiliar.

Aspectos Genéticos e Conduta Diagnóstica da Síndrome do X Frágil

Isabel Cristina Corrêa Merino Fabiano Soares¹
Fernanda Costa Vinhaes de Lima²

Resumo

A Síndrome do X Frágil (SXF) é uma desordem genética resultante da expansão da tríade CGG, no gene FMR1, localizado no cromossomo X. Essa expansão faz com que a proteína FMRP, codificada por esse gene e envolvida com a repressão de RNA's mensageiros específicos, não seja expressa, o que causa alterações no desenvolvimento dos neurônios. O objetivo desse trabalho foi apresentar os aspectos genéticos responsáveis pela SXF, bem como apresentar a conduta diagnóstica utilizada para identificar os indivíduos portadores da síndrome, por meio de uma revisão bibliográfica em formato narrativo realizada no período de 2008 a 2019. Pesquisas indicam que existem três mecanismos propostos para o controle traducional realizado pela proteína FMRP. O primeiro deles se relaciona com a etapa de iniciação da tradução, o segundo se relaciona ao controle da tradução por meio da via dos micro RNA's e o terceiro envolve a parada de polirribossomos para regular a etapa de alongamento. O diagnóstico padrão-ouro consiste na associação das técnicas de PCR e "Southern blot". Não há cura para a SXF, logo o tratamento é apenas de suporte, com objetivo de proporcionar qualidade de vida para os indivíduos acometidos. Dessa forma, pesquisas com foco em amenizar os sinais e sintomas da síndrome devem ser incentivadas.

Palavras-chave: Gene FMR1, repetições CGG, mutação, proteína FMRP.

Genetic Aspects and Diagnostic Behavior of Fragile X Syndrome

Abstract

The Fragile X Syndrome (FXS) is a genetic disorder caused by an expansion of a CGG triplet, on the FMR1 gene, located on the X chromosome. This expansion causes the FMRP protein, encoded by this gene and associated with the repression of specific messenger RNA's, not to be expressed, leading to changes in neuron's development. The aim of this work was to present the genetic aspects responsible for FXS, as well as to present the diagnostic behavior used to identify the individuals with the syndrome, through a narrative bibliographic review, carried out from 2008 to 2019. Researches indicate that there are three proposed mechanisms for the translational control performed by the FMRP protein. The first one relates to the translation initiation step, the second one relates to translational control through the micro RNA's pathway and the third one involves the stalling of polyribosomes to regulate the elongation step. The gold-standard diagnosis uses a combination of PCR and Southern blot techniques. There is no cure for the FXS, therefore the treatment is only supportive, aiming to provide a better life condition for the affected individuals. Thus, researches focused on softening the signs and symptoms of the syndrome should be encouraged.

Key words: FMR1 gene, CGG-repeat, mutation, FRMP protein.

¹Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

²Doutora em Patologia Molecular. Professora do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1 Introdução

A Síndrome do X Frágil (SXF) é a forma mais comum de deficiência intelectual herdada e a principal causa monogênica de autismo (BANERJEE et al., 2018). Pode ser conhecida como Síndrome de Martin-Bell por ter sido descrita por J. Purdon Martin e Julia Bell ao analisarem uma família com histórico de deficiência mental ligada ao cromossomo X em 1943 (MARTIN; BELL, 1943; USDHHS, 2018). Além disso, também pode receber o nome de Síndrome FRAXA por se associar a um “locus” cromossômico instável, o sítio frágil FRAXA, presente em menos de 5% da população (FÉLIX, 2011; USDHHS, 2018).

As características clínicas da síndrome como desenvolvimento de fala e de linguagem, geralmente, se manifestam próximas ao segundo ano de vida do indivíduo afetado. Homens e mulheres podem ser acometidos, estima-se que a prevalência no sexo masculino seja de 1:4000 e no sexo feminino de 1:8000. A maior parte dos homens com SXF possui uma deficiência intelectual leve à moderada, enquanto que apenas um terço das mulheres afetadas possui algum déficit intelectual. Crianças com a SXF podem apresentar distúrbio do déficit de atenção com ansiedade, comportamento hiperativo e dificuldade de focar na realização de tarefas específicas. Além disso, um terço dos indivíduos com a síndrome apresenta características do espectro autista que afetam a comunicação e a interação social. Convulsões podem acontecer em, aproximadamente, 15% dos homens e 5% das mulheres (USNIH, 2019).

Essa síndrome possui um amplo espectro clínico, que, além de distúrbios intelectuais, engloba características físicas clássicas que podem ou não estar presentes em todos os doentes (MARTINS, 2013). De acordo com USNIH (2019), características físicas como macroorquidismo em homens após a puberdade, face longa e estreita, orelhas largas, prognatismo, testa proeminente, hiperextensibilidade dos dedos e pé achatado estão presentes na maioria dos homens acometidos e em mais ou menos metade das mulheres afetadas, sendo que esses traços físicos se tornam mais evidentes com o passar dos anos.

A SXF integra um grupo de condições clínicas conhecido como Desordens Relacionadas ao X Frágil juntamente com a Síndrome do X Frágil Associada ao Tremor/Ataxia (FXTAS) e a Insuficiência Ovariana Associada ao X Frágil (FXPOI). Todas essas desordens são resultado de alterações no gene associado ao Retardo Mental do X Frágil 1 (gene FMR1) localizado no braço longo do cromossomo X (Xq27.3). Na maioria dos casos, a SXF é causada por uma expansão incomum e instável da repetição de trinucleotídeos citosina-guanina-guanina (CGG) localizada

na região 5' não traduzida (UTR) do gene FMR1 (SALDARRIGA et al., 2014; HAYWARD; KUMARI; USDIN, 2017).

A herança dessa doença genética não segue o padrão mendeliano clássico, ela é dependente do número de repetições CGG presente no gene FMR1 (VERKERK et al., 1991). A repetição desses trinucleotídeos pode se tornar instável durante a transmissão materna e essa instabilidade, geralmente, resulta na expansão da tríade CGG para a próxima geração (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). Essa expansão não ocorre durante a transmissão do cromossomo X paterno (VERKERK et al., 1991).

De acordo com o número de repetições CGG, o gene FMR1 apresenta quatro formas alélicas. Alelos normais possuem até 44 repetições, alelos pré-mutados possuem entre 55 e 200 repetições e alelos com a mutação completa possuem mais de 200 repetições. Existe, por fim, um tipo de alelo que pode ser conhecido como alelo intermediário ou alelo de zona cinzenta que contém entre 45 e 54 repetições e é tido como precursor dos alelos pré-mutados (SALDARRIGA et al., 2014).

A expansão de 200 ou mais repetições da trinca de nucleotídeos CGG no gene FMR1 leva à metilação e à inativação gênica que, conseqüentemente, levam a uma não produção da proteína associada ao Retardo Mental do X Frágil (proteína FMRP), codificada pelo gene FMR1 (NELSON; ORR; WARREN, 2013). Essa proteína regula a produção de outras proteínas e participa da formação de sinapses que são de extrema importância para a propagação do impulso nervoso (USNIH, 2019). A proteína FMRP é uma proteína de ligação ao ácido ribonucleico (RNA) e age como um repressor de tradução de muitos RNA's mensageiros (mRNA's) alvos nas sinapses. Logo, sua ausência altera o funcionamento, a maturação e a plasticidade das sinapses desencadeando um grave efeito nas funções cerebrais (DARNELL; KLANN, 2013; TASSONE, 2015).

Homens e mulheres com a pré-mutação são intelectualmente normais, entretanto, em alguns casos, podem produzir uma quantidade menor que o normal dessa proteína e por isso podem apresentar características físicas leves da síndrome, problemas emocionais e dificuldade de aprendizado. Além disso, a pré-mutação se associa a um maior risco de desenvolvimento da FXTAS e FXPOI (USNIH, 2019).

O padrão-ouro em termos de diagnóstico para SXF consiste na combinação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a técnica de "Southern blot". A PCR é muito útil para o

dimensionamento do tamanho de sequências CGG que variam entre 50 e 200 repetições, ou seja, sequências que se encaixam, principalmente, no perfil de alelos com a pré-mutação. Já o “Southern blot” é utilizado para analisar alelos de tamanhos maiores e determinar seus estados de metilação (WELLS, 2009).

Não há cura para a SXF, entretanto vários tratamentos de suporte podem contribuir para melhorar a vida dos indivíduos afetados e de suas famílias. A orientação educacional, por exemplo, pode ser complementada com uma série de terapias que ajudam o indivíduo afetado a ser mais independente. Além disso, existem medicações que podem minimizar os sintomas da síndrome (USNIH, 2016; FRAXARF, 2019a).

O presente trabalho teve como objetivo apresentar os aspectos genéticos responsáveis pela Síndrome do X Frágil, bem como apresentar a conduta diagnóstica utilizada para identificar os indivíduos portadores da síndrome.

2 Metodologia

Trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa, que segundo Rother (2007), consiste em uma investigação na literatura a respeito de um determinado tema, seguida da interpretação e análise crítica particular do autor.

Para a pesquisa foram coletadas informações das bases de dados Scielo (Scientific Electronic Library Online), PubMed (Public Medline), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), Google Acadêmico, sites institucionais e livros. Para a busca foram utilizadas as palavras-chave: “gene FMR1”, “repetições CGG”, “mutação” e “proteína FMRP”, separadamente e aos pares com o auxílio do conector “AND/E”.

Foram selecionados 15 sites institucionais, 45 artigos científicos e 5 livros publicados entre 2008 e 2019 nos idiomas inglês e português, disponíveis com texto completo na íntegra. Alguns artigos científicos com data de publicação que antecedem esse período também foram incluídos no trabalho por serem considerados clássicos e relevantes para o tema.

3 Desenvolvimento

3.1 Histórico

A Síndrome do X Frágil foi descrita pela primeira vez por Martin e Bell (1943) ao estudarem uma família, durante 17 anos, que apresentava casos de deficiência intelectual em 11

indivíduos do sexo masculino em duas gerações (Anexo A). Todos os indivíduos eram filhos de mães normais. A mãe que introduziu o gene na família era normal, teve três filhos e uma filha. Nenhum dos filhos gerou indivíduos do sexo masculino com a deficiência, entretanto suas filhas saudáveis deram origem a netos deficientes na geração seguinte. Já a única filha gerou três crianças, das quais dois eram meninos e deficientes. De acordo com o que foi observado nessa família, os autores concluíram que um gene ligado ao sexo poderia ser o responsável pela deficiência.

Lubs (1969) estudou uma família com casos de deficiência mental em meninos. No probando desse estudo foi encontrado um cromossomo variante sem descrições prévias. Por meio de técnicas citogenéticas, o cromossomo variante foi encontrado em quatro meninos, que apresentavam deficiência mental, e em três meninas, porém essas sem quadro de deficiência presente. Os estudos indicaram a presença de uma constrição secundária incomum no braço longo de um cromossomo pertencente ao grupo C. De acordo com o tamanho e a proporção dos braços do cromossomo e também devido à presença do retardo apenas em indivíduos masculinos, levantou-se a possibilidade de tal cromossomo ser o cromossomo X. O estudo familiar demonstrou um padrão de herança para o retardo mental consistente com heranças ligadas ao sexo, o que poderia também ser consistente com a herança descrita, previamente, por Martin e Bell (1943).

Posteriormente, ao cultivar linfócitos no meio de cultura 199, Sutherland (1977) comprovou a existência de um sítio frágil no braço longo do cromossomo X, coincidente com a constrição encontrada por Lubs (1969), na posição Xq27 ou 8, que teria uma importância clínica relevante como marcador da SXF. Sítios frágeis são regiões do genoma propensas a instabilidades ou quebras e predispostas a formação de constrições (VICARI; NOGAROTO, 2017). Essas quebras ocorrem, provavelmente, devido à presença da expansão de uma tríade de nucleotídeos. E, *in vitro*, produzem fragmentos acêntricos, cromossomos com deleções ou outras anomalias (TFDF, 2019).

Krawczun, Jenkins e Brown (1985), com a técnica de bandeamento G de alta resolução conseguiram identificar a posição do sítio frágil como sendo Xq27.3. De acordo com o HCGN (2018), o símbolo oficial desse sítio é FRAXA. Mais tarde, foi relatada a presença de um gene expresso no cérebro que continha uma repetição da tríade de nucleotídeos CGG que coincidia

com o sítio frágil do cromossomo X e que possuía extensão variável. Esse gene foi nomeado como gene associado ao Retardo Mental do X Frágil 1 (gene FMR1) (VERKERK et al., 1991).

3.2 Aspectos genéticos

3.2.1 A Síndrome

A SXF é uma desordem genética resultante de mutações no cromossomo X (USNIH, 2019). É também a forma mais comum de deficiência intelectual herdada e autismo, principalmente, em indivíduos do sexo masculino (CHAUFFAILLE, 2017). O mecanismo genético da síndrome se resume a expansão instável de uma sequência de trinucleotídeos, citosina-guanina-guanina (CGG) no gene FMR1. Tal expansão desestabiliza a transcrição do gene mutado resultando em perda de função (NELSON; ORR; WARREN, 2013). Além disso, repetições extensas nessa região estão associadas com alterações epigenéticas, como hipermetilação, que também contribuem para silenciar o gene e, conseqüentemente, inibir a síntese de seu transcrito FMRP (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013; CHAUFFAILLE, 2017).

A SXF possui um padrão de herança dominante ligado ao X (NHGRI, 2016). Entretanto, a forma como é herdada é complexa devido às características instáveis da sequência de repetições de trinucleotídeos CGG. Em famílias com essa condição genética, a mutação costuma ocorrer em várias etapas de expansão que se dão, geralmente, através de mais de uma geração (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

3.2.2 Gene *FMR1* e seu transcrito

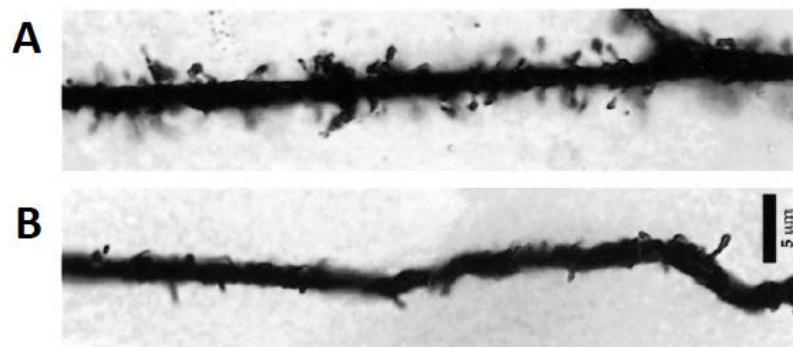
O gene FMR1 está localizado, precisamente, no braço longo do cromossomo X, na região 2, banda 7, sub-banda 3 (Xq27.3), possui 17 éxons, sendo que os éxons 12, 14, 15 e 17 podem sofrer “splicings” alternativos que resultarão em diferentes mRNA’s e proteínas isoformicas (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). A repetição da tríade de nucleotídeos CGG se localiza no exón 1, próximo a região 5’ não traduzida (UTR) (NELSON; ORR; WARREN, 2013; NCBI, 2019). Cerca de 99% dos casos relatados de SXF são causados por expansões dessa trinca de nucleotídeos. O 1% restante se deve a diversos outros tipos de mutações como deleções, duplicações, inserções e mutações de perda de sentido e de sentido trocado (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013; TASSONE, 2015). Deleções que variam em tamanho, desde um único

nucleotídeo até vários mega pares de bases, envolvendo todo o gene FMR1 ou apenas um de seus segmentos, já foram encontradas em pacientes com SXF (COFFEE et al., 2008).

Dentre as pessoas normais e as pessoas com a SXF, a sequência CGG varia de cinco até mais de 200 repetições. Em pacientes com a mutação completa, a sequência CGG possui mais de 200 repetições e geralmente é encontrada hipermetilada (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). A metilação se estende até a região promotora adjacente do gene FMR1 (OOSTRA; WILLEMSSEN, 2009). A metilação dessa sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) pode ser acompanhada por modificações na cauda das proteínas histonas e resulta no silenciamento do gene, ou seja, a deficiência de seu transcrito, a proteína FMRP, a qual é uma proteína de ligação ao RNA e é altamente expressa no cérebro e em órgãos reprodutivos (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011; CHEN; JOSEPH, 2015).

A ausência da FMRP leva a anormalidades de desenvolvimento no cérebro como neurônios com espinhas dendríticas imaturas, finas e altamente ramificadas, como pode ser visualizado na figura 1 (IRWIN; GALVEZ; GREENOUGH, 2000). Considera-se que essas alterações na morfologia se devem à falta de controle de tradução pela FRMP, o que leva a síntese excessiva de proteínas nas espinhas dendríticas. Além disso, acredita-se que essa seja a base molecular para a SXF (CHEN; JOSEPH, 2015).

Figura 1: Comparação de espinhas dendríticas de portadores da SXF (A) e de indivíduos normais (B).



Fonte: Adaptada de Irwin, Galvez e Greenough (2000).

Na deficiência de FMRP, a síntese global de proteínas no hipocampo é por volta de 15 a 20% acima do esperado. Essa produção elevada de proteínas significa que a ativação sináptica é incapaz de aumentar ainda mais a síntese proteica quando necessário. Essa ausência de produção

proteica induzida por estímulo sináptico compõe uma parte importante da fisiopatologia da SXF (RICHTER; BASSEL; KLANN; 2015).

A proteína FMRP contém diferentes domínios, dentre esses, dois domínios KH (KH1 e KH2) e a sequência arginina-glicina-glicina (RGG), os quais são domínios específicos de ligação ao RNA, sendo que os primeiros, principalmente KH2, se ligam a regiões que formam pseudo-nós e o último se liga a regiões que formam quadruplex de guanina (QG) no RNA alvo. Outras sequências presentes na estrutura dessa proteína são regiões de exportação nuclear (NES), região de localização nuclear (NLS) e dois domínios “tandem Agenet” que se ligam a resíduos de lisinas trimetilados das histonas (WILLEMSSEN; LEVINGA; OOSTRA, 2011; CHEN; JOSEPH, 2015). Esses domínios são considerados membros do domínio Tudor de ligação a lisinas metiladas (HE; GE, 2017). Proteínas do domínio Tudor funcionam como adaptadores moleculares, que se ligam a resíduos de lisinas metilados em seus substratos, para promover interações físicas e auxiliar na montagem de complexos de macromoléculas (PEK; ANAND; KAI, 2012).

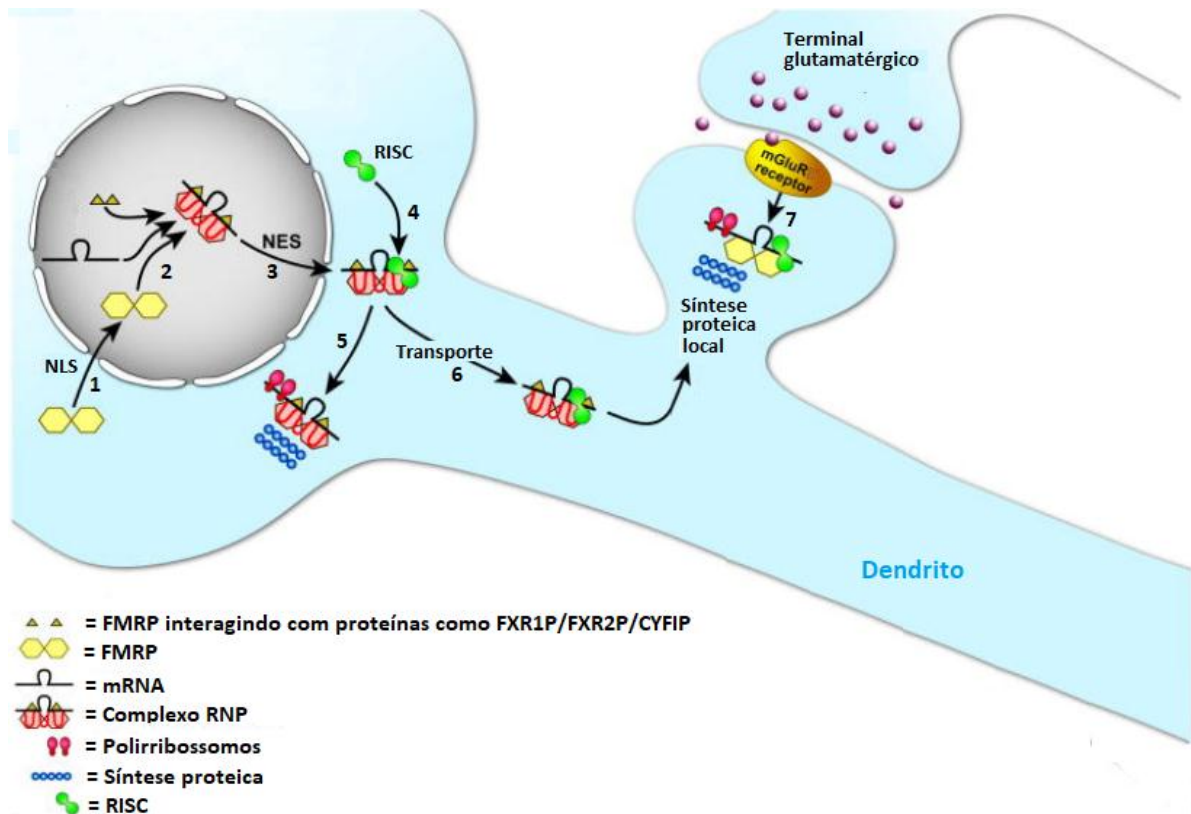
Essa proteína pode se ligar tanto a RNA's codificadores de proteínas, como os mRNA's, quanto a RNA's não codificadores, como os RNA's estruturais e os micro RNA's (miRNA's). Os mRNA's interagem com essa proteína se ligando, principalmente, a caixa RGG, já o domínio KH demonstrou ser importante para interação da proteína com RNA's sintéticos e polissomos (CAMPOS, 2014).

A presença das regiões NES e NLS permite que a proteína FMRP transite entre o núcleo e o citoplasma, o que faz com ela consiga transportar mRNA's para fora do núcleo. Durante esse deslocamento, o mRNA não é traduzido, possivelmente porque ele está revestido por proteínas de ligação ao RNA, as quais o tornam inacessível para o maquinário de tradução. Uma vez que o mRNA atinge sua destinação correta na célula, as proteínas responsáveis pela exportação de mRNA se dissociam e são recicladas. Entretanto, ainda não está claro se a FMRP também é liberada ou se ela permanece ligada ao mRNA para reprimir a sua tradução (CHEN; JOSEPH, 2015).

No tecido cerebral, a proteína FMRP está presente principalmente no corpo celular dos neurônios (CHRISTIE et al., 2009). Ela também pode ser encontrada em alguns grânulos nos dendritos e nos axônios (DARNELL; KLANN, 2013). É, inicialmente, sintetizada no citoplasma dessa célula, e, em seguida, dímeros são formados e entram no núcleo via domínio NLS (1), como pode ser visualizado na figura 2. Ao chegar ao núcleo, a proteína FMRP se liga aos

mRNA's alvos e a outras proteínas formando ribonucleoproteínas (RNP) (2). A RNP é transportada de volta para o citoplasma através do domínio NES (3). No citoplasma, essa partícula pode interagir com membros do Complexo Silenciador Induzido por RNA (RISC – “RNA-Induced Silencing Complex”) (4) e também pode se associar com ribossomos (5). O complexo RNP é responsável por regular a síntese de proteínas no corpo celular dos neurônios (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011).

Figura 2: Representação esquemática da síntese de FMRP, da formação de RNP, da interação da RNP-RISC e RNP-ribossomos, do transporte de RNP-RISC para os dendritos e da liberação da repressão traducional após o estímulo sináptico de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 1 (mGluR).



Fonte: Modificada de Willemsen, Levenga e Oostra (2011).

Quantidades significantes de RNP são transportadas para os dendritos, especialmente para as espinhas dendríticas, enquanto que uma minoria fica localizada nos axônios (6) (CHRISTIE et al., 2009). As partículas são transportadas em grânulos de mRNA. Durante esse transporte, a proteína FMRP exerce um papel de grande importância como repressor da tradução de mRNA's

específicos (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). Com a estimulação sináptica de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 1 (mGluR), a proteína permite a tradução de seus mRNA's alvos (7). As proteínas então transcritas parecem estar envolvidas com a internalização cíclica de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e com outros processos neuronais (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011).

Existem dois genes autossômicos parálogos ao FMR1, FXR1 e FXR2, que dão origem a duas proteínas designadas de proteínas relacionadas ao X Frágil 1 e 2 (FXR1P e FXR2P) (CHEN; JOSEPH, 2015). Genes parálogos são genes homólogos que se originaram a partir de uma duplicação gênica em uma mesma espécie (STRACHAN; READ, 2013). FXR1P e FXR2P são 60% idênticas à FMRP e são altamente expressas no cérebro. Essas proteínas podem formar dímeros como a FMRP ou podem associar-se umas com as outras e formar heterodímeros. A função da FXR1P parece ser distinta da função da FMRP, uma vez que ela é essencial para o desenvolvimento do esqueleto e do músculo cardíaco. A expressão alterada dessa proteína foi relacionada à distrofia muscular facioescapuloumeral, uma das formas mais prevalentes de distrofia muscular. Em camundongos, a ausência desse gene, resulta na morte do animal logo após o nascimento. Já a FXR2P, parece ter uma função parecida com a FMRP, entretanto, FXR2P não consegue compensar completamente a perda da FMRP. Em modelos animais, os camundongos com ausência dessa proteína sobrevivem, porém apresentam fenótipos comportamentais semelhantes àqueles observados em camundongos com ausência da FMRP. Logo, as três proteínas são essenciais para um desenvolvimento normal do ser humano (CHEN; JOSEPH, 2015).

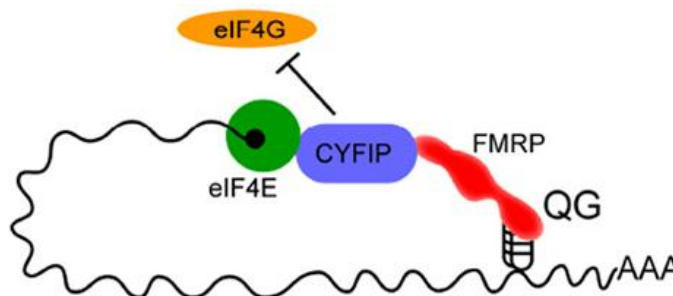
3.2.3 Mecanismo de repressão da tradução

A função primordial da FMRP é reprimir a tradução de mRNA's específicos, acredita-se amplamente que a perda desse controle traducional leve aos sintomas observados em humanos e em modelos animais com a síndrome (DARNELL; KLANN, 2013). A tradução em eucariotos pode ser dividida em três etapas: iniciação, alongamento e terminação. A iniciação começa com a associação do fator de iniciação de tradução 4F (eIF4F – complexo dos fatores eIF4E, eIF4G, eIF4A) com o resíduo 7-metil-guanosina na extremidade 5' do mRNA. Esse complexo ajuda a posicionar a subunidade 40S do ribossomo nessa extremidade. Com isso, a subunidade 40S escaneia o mRNA até o códon de iniciação ser reconhecido, quando então se juntará com a

subunidade 60S, e dará início a formação e ao alongamento da cadeia polipeptídica. Ao final, na etapa de terminação, as subunidades se dissociam do mRNA no códon de terminação, e dessa forma liberam a cadeia polipeptídica recém-formada (RICHTER; BASSEL; KLANN, 2015).

Existem três mecanismos propostos para o controle traducional realizado pela proteína FMRP. O primeiro deles se relaciona com a etapa de iniciação. A interação entre os fatores de tradução eIF4E e eIF4G é determinante para a formação do complexo 4F, o que é regulado por proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BP's) (CHEN; JOSEPH, 2015). Há também uma proteína de interação citoplasmática com FMRP 1 (CYFIP1), que possui um domínio estruturalmente parecido com o das 4E-BP's, que interage tanto com a FMRP quanto com eIF4E para reprimir o início da tradução (NAPOLI et al., 2008; RICHTER; BASSEL; KLANN, 2015). Nesse último modelo, a proteína FMRP se liga a mRNA's selecionados e recruta CYFIP1, que então se liga com o fator eIF4E na extremidade 5' e bloqueia a interação com o fator eIF4G, resultando na inibição da iniciação da tradução como está representado na figura 3 (CHEN; JOSEPH, 2015).

Figura 3: Mecanismo de inibição da iniciação da tradução mediado pela FMRP, onde CYFIP1 interage com o fator eIF4E, bloqueando sua interação com o fator eIF4G.



Fonte: Modificada de Chen e Joseph (2015).

A reversão da repressão traducional pode ocorrer quando as 4E-BP's são fosforiladas pelo alvo mamífero do complexo de rapamicina 1 (mTORC1), o que permite eIF4E se associar a eIF4G. Em contrapartida, o fator eIF4G recruta, indiretamente, a subunidade 40S do ribossomo para a extremidade 5' do mRNA. Quando associado ao fator eIF4G, o fator eIF4E pode ser fosforilado pela Map cinase que interage com a serina/treonina – proteína cinase 1 e 2 (MNK1 e MNK2) que modula a tradução. Já o complexo FMRP-CYFIP1-eIF4E responde a estimulação sináptica, ou seja, a síntese proteica pode ser desreprimida por diversos estímulos, por exemplo, pela sinalização do receptor metabotrópico de glutamato do tipo 1 (mGluR, como o mGluR5).

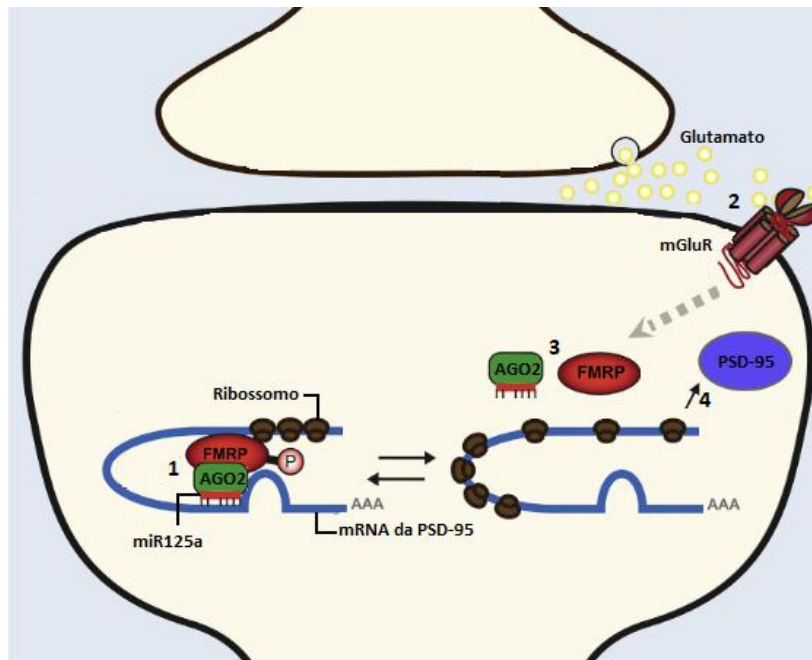
Esses estímulos fazem com que CYIFP1 se solte de eIF4E, mas não da FMRP, o que estimula a tradução (RICHTER; BASSEL; KLANN; 2015).

Uma das formas para se ativar o mTORC1 e sua via de sinalização é por meio da estimulação do mGluR5, por exemplo. Já para a Map cinase desempenhar sua função é necessária a estimulação de outro receptor que também se encontra na superfície celular, o receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) (BANERJEE et al., 2018; RICHTER; BASSEL; KLANN, 2015). Esse receptor é um dos tipos de receptores ionotrópicos de glutamato do cérebro e ajuda a mediar a neurotransmissão excitatória rápida (WILLEMSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). A estimulação desse receptor ativa a via de sinalização da cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Entre a estimulação do receptor e a ativação da Map cinase, existem diversas proteínas envolvidas na via de sinalização (RICHTER; BASSEL; KLANN, 2015).

Um segundo mecanismo proposto, representado na figura 4, é o de que a FMRP também consiga controlar a tradução pela via dos microRNA's (miRNA's) e componentes do RISC (CHEN; JOSEPH, 2015; BANERJEE et al., 2018). Os miRNA's são um mecanismo de controle pós-transcricional da expressão gênica, no qual pequenas sequências de RNA se ligam a sequências complementares presentes na região 3' UTR de mRNA's para inibir a tradução e/ou promover a degradação desses mRNA's. A FMRP se associa a componentes essenciais dessa via como as proteínas Dicer e Argonaute 2 (também conhecida como eIF2C2 ou AGO2), bem como com miRNA's específicos (CHEN; JOSEPH, 2015). Em camundongos, a FMRP está associada aos miRNA's que trabalham para regular a síntese proteica que é importante para determinar a morfologia da espinha dendrítica, como por exemplo, o miR125a, que tem como alvo a proteína 95 de densidade pós-sináptica (PSD-95) (MUDDASHETTY et al., 2010).

Demostrou-se que a FMRP promove a formação de um complexo inibitório da proteína PSD-95 (figura 4), o complexo AGO2-miR125a (1). A formação desse complexo no mRNA da PSD-95 depende da fosforilação da FMRP. De maneira interessante, a sinalização via mGluR (2) leva a uma diminuição no nível de fosforilação da FMRP que é seguida pela liberação do complexo de miRNA inibitório do mRNA da PSD-95 (3), ou seja, a desfosforilação da FMRP leva a uma ruptura na interação da proteína com a AGO2, liberando o mRNA da PSD-95, levando a ativação da tradução (4). Dessa forma, fica claro que a FMRP pode recrutar complexos específicos de miRNA's para inibir a tradução de mRNA's particulares de uma maneira que dependa da atividade sináptica (CHEN; JOSEPH, 2015; BANERJEE et al., 2018).

Figura 4: Mecanismo de controle da tradução pela FMRP em associação com miR125a, bloqueando a síntese proteica e a reversão desse bloqueio via sinalização mGluR.

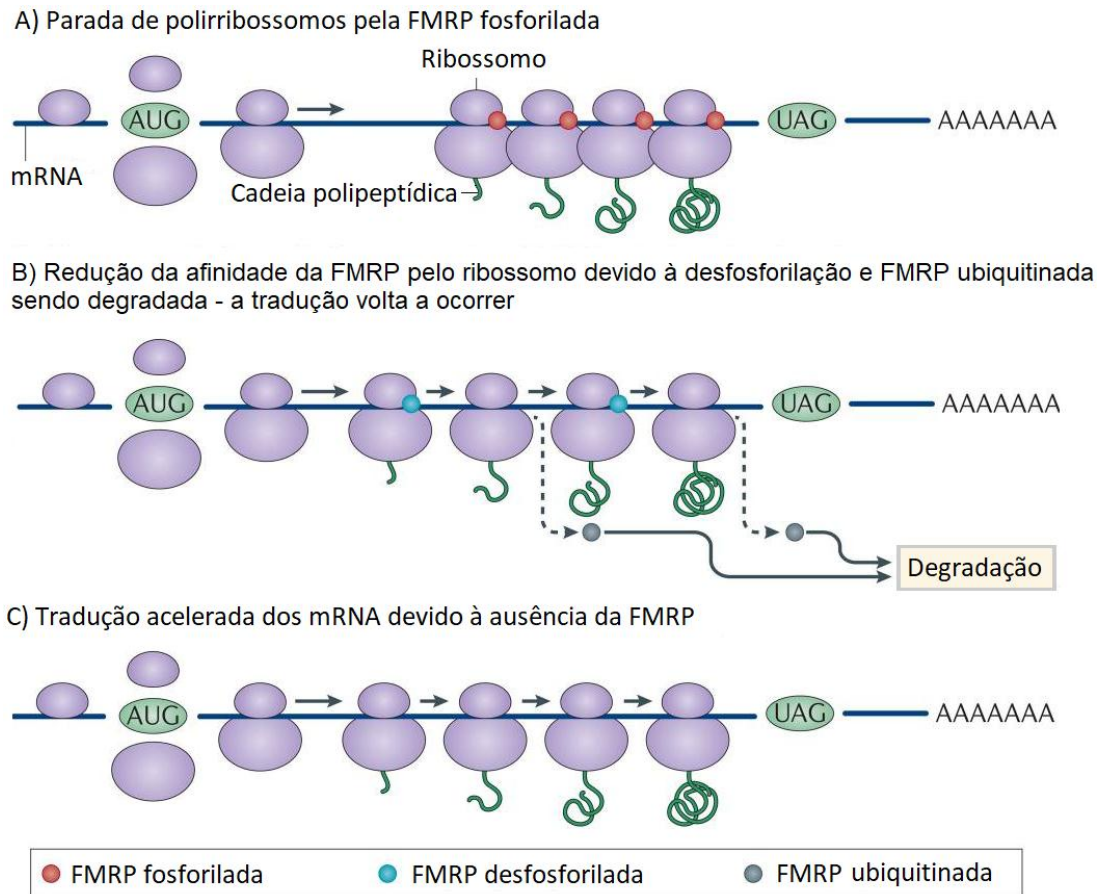


Fonte: Modificada de Banerjee et al. (2018).

A fosforilação e desfosforilação da FMRP não impactam na capacidade dessa proteína de se ligar diretamente a mRNA's alvos. Múltiplas cinases podem regular esse processo. Apesar de existirem vários modelos para a fosforilação da FMRP, sabe-se que o estado de fosforilação da FMRP é um mecanismo para que essa proteína recrute vias dependentes de miRNA para inibir a tradução de mRNA's alvos (BANERJEE et al., 2018).

Um terceiro mecanismo, representado na figura 5, envolve a parada de polirribossomos para regular a etapa de alongamento. A FMRP fosforilada se associa à ribossomos que estão ativamente traduzindo mRNA's fazendo com que eles parem, se acumulem na molécula de mRNA e desacelerem o alongamento. A FMRP bloqueia a ligação de RNA's transportadores (tRNA's). Não está claro como a FMRP é liberada do ribossomo para desinibir a tradução, uma das possibilidades é que em uma sinapse ativada, a FMRP é ubiquitinada e rapidamente degradada por proteossomos, outra possibilidade é que a desfosforilação da proteína module a sua afinidade pelo ribossomo, permitindo assim que a tradução aconteça (CHEN; JOSEPH, 2015). Na SXF, a ausência da FMRP resulta na tradução acelerada dos mRNA's alvos (RICHTER; BASSEL; KLANN, 2015).

Figura 5: Mecanismo de parada de polirribossomos mediado pela FMRP (A) para regular a etapa de alongamento, (B) liberação da FMRP ubiquitinada ou desfosforilada do ribossomo e (C) ausência de FMRP resultando na tradução acelerada.



Fonte: Modificada de Richter, Bassel e Klann (2015).

Embora três mecanismos tenham sido descritos, a FMRP não precisa, necessariamente, usar apenas um. Dependendo do mRNA, ela pode regular a tradução por múltiplos mecanismos. Por exemplo, a FMRP pode bloquear a etapa de iniciação recrutando a CYFIP1 enquanto o mRNA está sendo transportado do núcleo para os dendritos do neurônio. Uma vez que o mRNA alcança seu destino correto, a FMRP ligada ao mRNA pode interagir com o ribossomo para interromper a tradução. A atividade sináptica pode levar a modificações pós-traducionais da FMRP e aliviar a inibição da tradução pela FMRP. Essa proteína pode, então, usar a via dos miRNA's para ajustar a tradução de mRNA's específicos de maneira dependente da atividade sináptica (CHEN; JOSEPH, 2015).

3.2.4 Alelos

De acordo com o número de repetições CGG existentes no gene FMR1, quatro tipos alélicos podem ser descritos: alelos normais, alelos de zona cinzenta ou intermediários, alelos pré-mutados e alelos com a mutação completa (LYONS; KERR; MUELLER, 2015).

O número normal de repetições pode variar de cinco até 44 trincas, sendo que o número mais comum de repetições varia entre 29 e 30 trincas (YRIGOLLEN et al., 2012; MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Além disso, essas trincas costumam ser interrompidas, a cada nove ou dez repetições, por uma tríade adenina-guanina-guanina (AGG). Essa sequência AGG ancora as regiões de repetição e previne erros durante a replicação do DNA. O número e o espaçamento dessa tríade entre as repetições CGG ajudam a estimar o risco de expansões em até 100 repetições CGG (YRIGOLLEN et al., 2012). Alelos normais não apresentam instabilidade durante a meiose e mitose (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

Alelos que possuem número de repetições entre 45 e 54 são classificados como alelos de zona cinzenta ou alelos intermediários (CHAUFFAILLE, 2017). Para alelos com essa composição gênica, nem a taxa de expansão nem associações com doenças são bem compreendidas. Sabe-se, porém, que essa classe não é associada com a SXF e que também não há relatos de que alelos intermediários tenham se expandido em apenas uma geração para alelos com a mutação completa (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

Entre 55 e 200 repetições, os alelos são considerados pré-mutados (CHAUFFAILLE, 2017). Alelos dessa classe não são hipermetilados e não estão relacionados com a SXF (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Apesar de, geralmente, não se encontrarem metilados, uma pequena porcentagem de células pode conter alelos dessa classe metilados, especialmente alelos no limite superior da pré-mutação (PRETTO, 2014).

Eles são transmitidos de forma instável de pais para filhos, e expansões dessa classe para a classe de alelos com a mutação completa ocorrem principalmente durante a transmissão materna (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Em mulheres, a pré-mutação é suscetível à expansão para mais de 200 repetições nas ovogônias. Isso significa que portadoras femininas da pré-mutação têm um risco aumentado de gerar filhos com a SXF. O risco de expansão para mutação completa aumenta para quase 100% em mães com mais de 90 repetições CGG (NOLIN et al., 2014). Em contrapartida, em homens com a pré-mutação, o tamanho da repetição CGG se mantém ou é encurtado na geração seguinte (NHGRI, 2016).

A instabilidade da repetição pode estimular a formação de estruturas secundárias na sequência CGG como estruturas em grampo e tetra hélices. Essas estruturas fariam com que as DNA's polimerases pausassem suas atividades, o que aumentaria a chance de deslizamentos por essas enzimas. Quando estruturas em grampo se formam nos fragmentos de Okasaki da cadeia atrasada ("lagging strand"), o reanelamento pode acontecer em uma posição diferente, o que deixa um vazio para ser reparado, resultando em uma sequência ligeiramente maior do que a original. Alternativamente, quando as estruturas em grampo se formam na cadeia líder ("leading strand") isso resulta em uma sequência menor, uma vez que a DNA polimerase vai pular parte da sequência CGG (OOSTRA; WILLEMSSEN, 2002).

Alelos com a mutação completa apresentam mais de 200 repetições, variando de algumas centenas a alguns milhares. Hipermetilação costuma estar presente na maioria ou em todas as cópias de DNA (exceto em amostras de vilosidades coriônicas). Entretanto, em sequências muito grandes ela pode variar gerando diversos fenótipos (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013; LYONS; KERR; MUELLER, 2015). A metilação desses alelos acontece em etapas iniciais da embriogênese e parece contribuir para estabilizar a sequência expandida (PRETTO, 2014).

Desde a descoberta do gene FMR1, a estimativa de risco para expansão de um alelo pré-mutado para um alelo com a mutação completa se baseava apenas no tamanho da repetição no alelo materno (NOLIN et al., 2014). Um estudo feito em Israel e combinado com os resultados de um estudo conduzido no Instituto do Estado de Nova Iorque para Pesquisa Básica em Deficiências do Desenvolvimento (IBR) examinou os riscos de transmissões instáveis e expansões para mutações completas dentre portadoras da pré-mutação do gene FMR1 com até 90 repetições CGG. Esse estudo foi uma das maiores coortes sobre o assunto que incluiu diferentes etnias para avaliação desse risco. As duas populações apresentaram características similares em relação à chance de ocorrer expansão para a mutação completa ao se analisar tanto o número de repetições CGG quanto o número de interrupções AGG. Como mencionado anteriormente, essa sequência AGG funcionaria como um freio biológico que inibe a expansão (DOMNIZ et al., 2018).

A maioria da população em geral tem uma ou duas interrupções AGG, que estão mais comumente localizadas próximas ao terminal 5', após a décima ou décima primeira e a vigésima ou vigésima primeira tríade CGG (NOLIN et al., 2014). Alelos instáveis, entretanto, apresentam poucas ou nenhuma tríade AGG (DOMNIZ et al., 2018). Alelos de famílias portadoras da SXF

são menos prováveis de ter sequências AGG próximas ao terminal 5' e contém longos trechos CGG sem interrupção próximo ao terminal 3' (NOLIN et al., 2014).

A interrupção por trincas AGG funcionaria, então, como um fator de proteção e, portanto, diminuiria o risco de expansão entre as gerações (YRIGOLLEN et al., 2012). Essa tríade é considerada uma variável relativamente nova, porém com grande importância para estimar o risco de mutações completas entre populações de diferentes etnias, tanto que o estudo conduzido em Israel sugere até mesmo que essa seja uma das análises que integrem os testes de aconselhamento genético para portadoras da pré-mutação no mundo todo (DOMNIZ et al., 2018).

Sabe-se que diversos alelos pré-mutados são extremamente instáveis e propensos a mutação completa em apenas uma geração (NOLIN et al., 2014). O menor alelo pré-mutado já descrito que sofreu expansão para um alelo com a mutação completa em apenas uma geração continha 56 trincas CGG e se estendeu aproximadamente até 538 repetições (FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009).

De fato, o risco de expansão para mutação completa aumenta dramaticamente com o aumento do número de trincas CGG, entretanto foi observado que alelos com repetições menores expandiam para mutação completa, enquanto alelos com maior número de repetições eram transmitidos de forma estável. Isso se devia exatamente à quantidade de interrupções AGG nas sequências, as quais demonstraram ter papel importante durante a transferência do alelo entre as gerações. O estudo mostrou que mulheres com a pré-mutação até 70 repetições podem ter de zero até cinco interrupções AGG. Dentro desse grupo apenas as que não possuem nenhuma trinca AGG correm risco de transmitir a expansão para mutação completa. Dentre as mulheres com repetições variando de 70 a 90, o risco de transmitir a expansão para mutação completa aumenta conforme o número de interrupções diminui (DOMNIZ et al., 2018).

Um outro estudo conduzido com indivíduos recrutados através do Instituto Clínico MIND concordou que a interrupção AGG é importante para a redução da chance de transmissão materna da expansão, entretanto a base molecular para o efeito da tríade AGG ainda permanece desconhecida (YRIGOLLEN et al., 2012). Alguns estudos também avaliaram a relação da idade das mães portadoras da pré-mutação com o risco da expansão para uma mutação completa (YRIGOLLEN et al., 2012; NOLIN et al., 2014). Demonstrou-se que a idade da mãe não é uma variável estatisticamente significativa para o risco de expansão para mutação completa, tendo apenas um pequeno impacto na estimativa do risco, uma vez que o tamanho do alelo materno e a

estrutura AGG são, de fato, os fatores com maior importância de predisposição a esse risco (NOLIN et al., 2014).

Além disso, mosaicismos podem estar presentes e nesse caso diferenças entre tecidos serão observadas. Existem dois tipos de mosaicismos: de tamanho, que se refere a indivíduos com subpopulações de alelos com a mutação completa metilados e alelos pré-mutados não metilados; e de metilação, que se refere a indivíduos que possuem o alelo com a mutação completa, porém com uma subpopulação não metilada e uma metilada, ou alelos não metilados pré-mutados. (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013; PRETTO, 2014).

3.2.5 Sintomas e sinais físicos

A SXF é uma condição genética que está associada a um amplo espectro clínico. É considerada a causa mais comum de deficiência intelectual herdada e uma causa frequente de autismo (HAYWARD; KUMARI; USDIN, 2017). Ambos os sexos podem ser afetados, entretanto, estima-se uma frequência de um a cada 4.000 homens e uma a cada 8.000 mulheres (USNIH, 2019). A maior frequência em homens se deve ao fato de que todos os homens com a mutação vão apresentar a síndrome, enquanto algumas mulheres não (CHAUFFAILLE, 2017). Além disso, geralmente, indivíduos do sexo masculino são afetados mais severamente pela desordem do que indivíduos do sexo feminino (USNIH, 2019).

Indivíduos do sexo feminino apresentam dois cromossomos X, e para compensar essa diferença com os indivíduos do sexo masculino, um desses cromossomos passa por um processo de inativação durante a embriogênese. Esse processo é aleatório e fixado, ou seja, uma vez que a inativação ocorre em uma célula, todas as células que se originem a partir dela terão o mesmo cromossomo X inativado (SCHAEFER; THOMPSON JR, 2015). Sabe-se que alguns genes, entretanto, conseguem escapar desse processo de inativação, porém esse não é o caso do FMR1, ou seja, esse gene não é expresso no cromossomo X inativo (KIRCHGESSNER; WARREN; WILLARD, 1995).

O que pode acontecer em mulheres com a mutação completa é um fenômeno chamado de inativação desequilibrada ou distorcida do cromossomo X, ou seja, quando o alelo mutado se localiza no cromossomo X ativo e o alelo normal se localiza no cromossomo X inativo. Se a porção de células com a inativação estiver presente em tecidos importantes, pode ser que a portadora feminina apresente as características da síndrome. Além disso, como a inativação

acontece em estágios iniciais da embriogênese, a fração de células que irá compor os tecidos futuros pode ser bem variada, o que pode ser responsável pela penetrância e expressividade variada da síndrome em heterozigotas (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2008).

Além da deficiência intelectual, indivíduos com SXF apresentam risco aumentado de ansiedade, déficits de comunicação, diminuição da interação social, respostas incomuns a estímulos sensoriais, impulsividade, hiperatividade, agressão, incluindo comportamentos auto-agressivos e evitam contato visual (RICHTER; BASSELL; KLANN, 2015; TASSONE, 2015). Em relação às características físicas, as mais comuns são face alongada, orelhas proeminentes, prognatismo que estão presentes tanto em homens quanto em mulheres. Homens também podem apresentar hiperextensibilidade das articulações metacarpofalângicas, pés achatados e macroorquismo, após a puberdade. Vale ressaltar que os sinais físicos, comportamentais e cognitivos são dependentes da quantidade de FMRP produzida e os sinais físicos podem nem sempre estar presentes ou podem se intensificar com o envelhecimento do indivíduo (SALDARRIGA, 2014; USNIH, 2019). Sinais como hipotonia e relaxamento articular também podem estar presentes e podem causar dificuldade para realização de atividades motoras que exigem uma coordenação mais fina, como o ato de escrever (JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019).

Homens e mulheres com a pré-mutação têm intelecto e aparência normais. Entretanto, alguns indivíduos podem apresentar sintomas intelectuais e comportamentais súteis como dificuldades de aprendizado e problemas de ansiedade (NHGRI, 2016). Alelos com a pré-mutação podem deslocar a transcrição do mRNA do gene FMR1 para um local a montante do início da transcrição, o uso de um local alternativo para iniciar a transcrição pode estar relacionado ao aumento no nível transcricional (LYONS; KERR; MUELLER, 2015).

Indivíduos com a pré-mutação apresentam níveis elevados de mRNA do gene FMR1 e níveis diminuídos de FMRP, pois a tradução é menos eficiente. Conforme a repetição da pré-mutação aumenta, os níveis de mRNA aumentam e os de FMRP diminuem (LOZANO; ROSETO; HAGERMAN, 2014). Esse nível elevado de mRNA leva a uma toxicidade de mRNA. O excesso de mRNA leva ao sequestro de importantes proteínas para o funcionamento cerebral (SALDARRIGA, 2014).

Essa toxicidade mediada por RNA está associada com Síndrome do X Frágil Associada ao Tremor/Ataxia (FXTAS), um distúrbio neurodegenerativo de início tardio que tem como

principais características o desenvolvimento de tremor progressivo e ataxia cerebelar. Em casos mais avançados, diminuição da cognição, parkinsonismo e disfunções autonômicas podem estar presentes. Esse distúrbio costuma afetar homens e mulheres acima de 50 anos, tendo uma prevalência maior em homens (WILLESEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011).

Mulheres com a pré-mutação com sequências CGG acima de 80 repetições, geralmente apresentam 20% de chance de desenvolver outro distúrbio, a Insuficiência Ovariana Associada ao X Frágil (FXPOI) (LYONS; KERR; MUELLER, 2015). Esse distúrbio está relacionado à menopausa precoce, fazendo com que mulheres nessa condição entrem na menopausa cinco anos antes do normal. Há uma hipótese de que a pré-mutação também apresente um efeito de toxicidade de RNA nos folículos ovarianos, causando assim a FXPOI (WILLESEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). Esse distúrbio leva a uma série de complicações como ciclos menstruais irregulares, deficiência dos hormônios ovarianos e infertilidade (SALDARRIGA, 2014).

3.3 Diagnóstico

De acordo com a Fundação Americana do X Frágil, existem três circunstâncias gerais para as quais o teste para a SXF deve ser considerado. E são elas: indivíduos que apresentam sintomas clínicos sugestivos de SXF, de FXTAS, ou de infertilidade/FXPOI; indivíduos com histórico familiar de SXF, FXTAS, dificuldades intelectuais ou de aprendizagem, autismo de causa desconhecida ou infertilidade; e indivíduos com histórico familiar de herança da SXF, por exemplo, para indivíduos portadores da pré-mutação. Além disso, existem as recomendações específicas para a realização do teste, e elas incluem: homens ou mulheres com deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, na linguagem e na fala, autismo ou dificuldades de aprendizagem de causa desconhecida; qualquer mulher que apresente infertilidade, níveis elevados de hormônio folículo estimulante, falência ovariana prematura, insuficiência ovariana prematura ou menstruação irregular; e qualquer mulher que deseje engravidar ou já esteja grávida e tenha interesse em realizar o teste para saber se é portadora (NFXF, 2019).

Antes da identificação do gene FMR1, a cultura de células em um meio deficiente de folato seguida da análise citogenética era o método de escolha para o diagnóstico da SXF. Entretanto, essa abordagem, apesar de permitir a avaliação da presença de sítios frágeis no braço longo do cromossomo X, se mostrou complicada, pois esses sítios eram frequentemente vistos em

apenas uma porcentagem pequena de células. Esse fator não era tão problemático para indivíduos do sexo masculino, onde, geralmente, o sítio frágil poderia ser visualizado em 10% das células, mas para indivíduos do sexo feminino, a mutação poderia passar despercebida (TASSONE, 2015).

Além disso, essa técnica não é informativa em relação a alelos intermediários e pré-mutados, uma vez que não fornece informações sobre o número de repetições e também não informa sobre o estado de metilação dos alelos (HAYWARD; KUMARI; USDIN, 2017). Por esses motivos, esse procedimento não é mais considerado um método aceitável de diagnóstico para a SXF (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

Portanto, nos últimos anos, as pesquisas estavam focadas na aquisição de técnicas moleculares mais sensíveis, em sua maioria baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase, (PCR) e várias abordagens foram desenvolvidas, embora com algumas limitações devido à dificuldade de lidar com as sequências CGG expandidas. Atualmente, o diagnóstico da síndrome é, geralmente, baseado na determinação do tamanho da repetição CGG e na avaliação do estado de metilação do gene FMR1. A metodologia considerada como padrão-ouro engloba a combinação da PCR, especialmente útil para determinar o tamanho da sequência CGG até a extensão da pré-mutação e “Southern blot” para analisar alelos de tamanhos maiores e determinar seus estados de metilação. O DNA genômico para análise pode ser obtido de amostras de sangue, saliva, tecidos e cultura de células (TASSONE, 2015).

Entretanto, vale ressaltar que como essas técnicas apenas avaliam a expansão da sequência de repetição CGG, qualquer indivíduo que apresente SXF causada por deleções ou por uma mutação de troca de sentido, que pode incluir todo ou apenas partes do gene FMR1, não será detectado usando esses testes (WELLS, 2009). Como a análise por PCR e “Southern blot” não identifica essas mutações, a prevalência exata delas não é conhecida (TASSONE, 2015). Para casos apresentando sinais e sintomas muito sugestivos de SXF, mas sem diagnóstico possível por PCR e “Southern blot” outros estudos como ensaios de alta resolução da sequência do gene FMR1 e sequenciamentos baseados em “array” podem ser necessários (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Com a técnica de “Southern blot” é possível detectar a mutação e determinar o estado de metilação com apenas um teste (SOFOCLEOUS; KOLIALEXI; MAVROU, 2009). Nessa análise, o DNA genômico é digerido por uma combinação de enzimas de restrição como *EcoRI*,

ou *HindIII* que corta o “locus” FMR1 independente dele estar metilado ou não, e uma enzima sensível a metilação como *BssHII*, *EagI*, *NruI* ou *SacII*, que corta apenas alelos não metilados. Em seguida, as amostras são aplicadas no gel de agarose para eletroforese. Posteriormente, os fragmentos são transferidos para uma membrana, e expostos a uma sonda radioativa ou então a uma sonda marcada com digoxigenina derivada da região 5’ do gene FMR1. As sondas mais comumente usadas são StB12.3 também conhecida como pP2 ou Pfxa7 e Ox 1.9 que hibridizam em uma região a jusante das repetições CGG e dos sítios de reconhecimento das enzimas sensíveis a metilação (ACGS, 2012; HAYWARD; KUMARI; USDIN, 2017).

A análise por “Southern blot” permite que largas expansões da mutação sejam detectadas com segurança, alelos pré-mutados e alelos com a mutação completa só conseguem ser diferenciados com clareza por meio dessa técnica. Além disso, a distinção entre alelos pré-mutados grandes e alelos com a mutação completa pequenos é feita se baseando mais no estado de metilação do que no exato tamanho da repetição. Entretanto, essa técnica não permite diferenciar alelos pré-mutados pequenos e alelos de zona cinzenta de alelos normais (no limite superior da normalidade) (SOFOCLEOUS; KOLIALEXI; MAVROU, 2009).

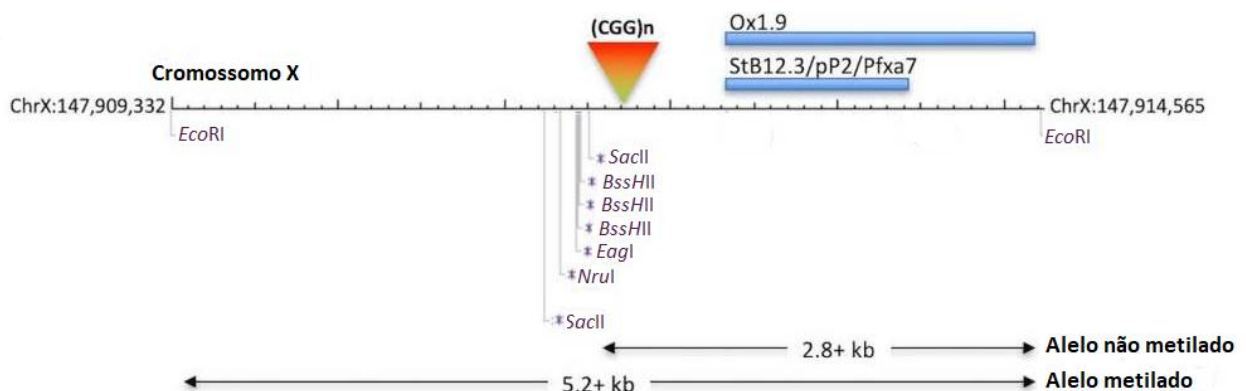
Vale lembrar que alelos com mutação completa podem ser representados por bandas difusas e fracas, que aparecem como manchas no gel, fazendo com que mutações completas possam ser negligenciadas (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Além disso, as manchas arrastadas ou esfregaços nos géis podem também ser artefatos gerados pelo brometo de etídio, logo a omissão desse reagente facilitaria a detecção de alelos com a mutação completa, principalmente em mulheres (SOFOCLEOUS; KOLIALEXI; MAVROU, 2009).

Fragmentos com mais de 200 repetições CGG possuem uma sensibilidade exagerada ao brometo de etídio, esse intercalante de DNA induziria mudanças conformacionais nesses fragmentos, as quais não ocorrem na maioria dos fragmentos de DNA genômico. Dessa forma, ao promover deslocamentos conformacionais da repetição durante a eletroforese, o intercalante altera a migração e produz bandas adicionais ou manchas/esfregaços (NOLIN et al., 2008).

Alelos normais metilados, ou seja, inativos são cortados apenas por uma enzima e originam um fragmento de aproximadamente 5,2 kb. Já alelos normais não metilados, ou ativos, são cortados pelas duas enzimas e geram um fragmento de 2,8 kb (ACGS, 2012). Uma vez que o gene FMR1 está no cromossomo X, em homens normais, ou seja, com alelos normais não metilados, ao usar uma das enzimas de restrição sensíveis a metilação (que cortam fragmentos

com aproximadamente 200 bp de distância umas das outras) representadas na figura 6, e a *EcoRI*, tem-se a produção de um fragmento de aproximadamente 2,8 kb. A mesma digestão em mulheres normais produz duas bandas, uma de 2,8 kb correspondente ao alelo no cromossomo X ativo e uma banda de 5,2 kb correspondente ao alelo do cromossomo X inativo (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Figura 6: Representação diagramática dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição, das sondas e dos tamanhos dos fragmentos esperados.

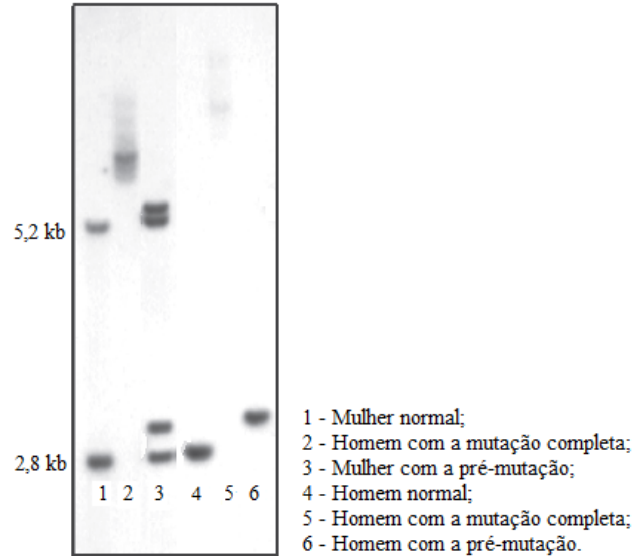


Fonte: Modificada de Hayward, Kummari e Usdin (2017).

Pré-mutações são detectadas como fragmentos de 2,9 kb até 3,3 kb em homens e no cromossomo X ativo de mulheres. Enquanto que fragmentos de 5,3 kb a 5,7 kb correspondem a pré-mutação no cromossomo X inativo (BIANCALANA et al., 2014). Devido ao processo aleatório de inativação do X, mulheres com a pré-mutação podem apresentar 4 fragmentos, que correspondem ao alelo normal ativo (2,8 kb), ao alelo mutado (2,8 kb ou maiores), alelo normal inativo (5,2 kb) e alelo mutante inativo (5,2 kb ou maiores). Em ambos os sexos com a mutação completa, bandas maiores que 5,2 kb podem ser visualizadas. Além disso, a mutação completa pode ser visualizada como uma mancha ou esfregaço, principalmente em casos de mosaïcismo somático (ACGS, 2012). A figura 7 ilustra um modelo de eletroforese com esses indivíduos.

Essa técnica tem algumas desvantagens como o custo alto, a demanda de tempo e o fato de necessitar de grandes quantidades de DNA genômico de alto peso molecular (TASSONE, 2015). A resolução do gel de agarose também é um fator limitante. Além disso, mutações nos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição podem resultar em diagnósticos equivocados (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Figura 7: Eletroforese proveniente de amostras com realização prévia de “Southern blot” com as enzimas *EcoRI* e *EagI* e sonda StB12.3 demonstrando o padrão de bandas encontrados para pacientes normais, com a pré-mutação e com a mutação completa.



Fonte: Modificada de Monaghan, Lyon e Spector (2013).

Como alternativa para o “Southern blot”, diversas estratégias de diagnóstico baseadas em PCR foram propostas para a identificação da expansão da repetição CGG. As metodologias baseadas na PCR convencional não amplificam a sequência CGG de forma confiável devido ao elevado conteúdo CG e a tendência de tais sequências em formar estruturas secundárias estáveis. Logo, a amplificação, por esse método, é majoritariamente limitada a alelos que vão desde a faixa normal até alelos pré-mutados pequenos, passando por alelos de zona cinzenta (TASSONE, 2015). Além disso, a PCR leva horas ao invés de dias como o “Southern blot” e requer nanogramas ao invés de microgramas de DNA (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Para melhorar o rendimento da PCR, pode-se usar osmolitos como betaína, que reduzem a estabilidade das estruturas secundárias formadas, dimetilsulfóxido, que é um desnaturante que também desestabiliza as estruturas secundárias e reduz as altas temperaturas de desnaturação, e análogos de desoxiguanosina trifosfato (dGTP), como 7-deaza-2'-GTP, que impedem a formação dos “loops” (estruturas secundárias), que dificultariam a amplificação (SOFOCLEOUS; KOLIALEXI; MAVROU, 2009). Uma variedade de DNA polimerases capazes de amplificar sequências ricas em CG também foi testada. Os ensaios iniciais foram incapazes de amplificar alelos com a mutação completa. Entretanto, ensaios realizados a partir de 2010 vêm obtendo

sucesso na amplificação desses alelos de forma confiável, até mesmo em mulheres e homens que são mosaicos, sendo que alelos grandes com 940 repetições conseguiram ser amplificados (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Hayward et al (2016) realizaram um ensaio com um tampão com ausência do íon potássio (K^+) e altas concentrações de betaína, para detectar alelos muito longos. O íon K^+ funciona como um estabilizador da estrutura secundária formada pelas repetições CGG, então sua ausência melhora o rendimento da reação por minimizar a estabilidade de tais estruturas, além disso, em associação com a betaína, o rendimento melhora ainda mais, uma vez que esse composto desestabiliza as estruturas secundárias, como já mencionado.

Esse foi um exemplo de ensaio que poderia ser usado para amplificar alelos grandes, e relativamente com baixo custo, logo poderia ser usado para pesquisas de rotina. Os produtos gerados pela PCR são aplicados no gel de agarose e detectados usando corantes como brometo de etídio ou “Sybr Green”. Como os produtos da PCR costumam ser fragmentos menores do que aqueles produzidos pelo “Southern blot”, a estimativa do número de repetições costuma ser mais exata. Entretanto, para determinações mais precisas, para alelos pré-mutados e com a mutação completa, a eletroforese capilar (EC) é o método de escolha. Para esse propósito, um dos iniciadores usados na PCR é tipicamente marcado com compostos fluorescentes (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

PCR Convencional fluorescente (fPCR) é suficiente para detectar todos os alelos normais e, portanto, excluir o diagnóstico de SXF. Mosaicismos para o alelo normal e o alelo com a mutação completa são raros, mas podem existir, e o risco pode ser mais alto para indivíduos com histórico familiar de SXF. Por esse motivo, recomenda-se que pacientes com resultados atípicos de PCR ou com histórico confirmado de SXF sejam testados por “Southern blot” e não somente por fPCR. Tradicionalmente, os laboratórios têm usado a fPCR como triagem e prosseguem para a análise por “Southern blot” apenas nas amostras que falham em amplificar ou em amostras de mulheres que apresentam apenas uma banda. Essa técnica é rápida, barata e consegue detectar alelos com até 120 repetições (ACGS, 2012).

Além de “Southern blot”, outros tipos de ensaios também podem ser usados para monitorar o estado de metilação do gene, abordagens de PCR específicas para metilação envolvem uma etapa pré-digestão com uma enzima sensível a metilação que tem um ou mais sítios de reconhecimento dentro do “amplicon” sendo analisado. Uma vez que a acurácia desse

método depende de a digestão ser feita, um controle para ação enzimática deve ser sempre incluído. O uso de iniciadores com diferentes marcadores fluorescentes permite que amostras digeridas e não digeridas sejam expostas à mesma EC para detecção. A razão entre a altura do pico na amostra digerida e a altura do pico na amostra não digerida é um indicador da extensão da metilação de um alelo particular (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Outra forma de determinar o estado de metilação é por meio de abordagens de PCR que utilizam o bissulfito para provocar modificações na sequência CGG que são baseadas na conversão da citosina não metilada em uracila, enquanto que a citosina metilada permanece inalterada (TASSONE, 2015). Durante a amplificação, as uracilas serão substituídas por timinas (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017). Quando sequenciado, o DNA que foi alterado fornece informações sobre a metilação em regiões CpG específicas dentro da sequência amplificada (TASSONE, 2015). No entanto, esse método é relativamente trabalhoso, dessa forma, não é considerado tão viável para aplicações de alto rendimento ou em termos de diagnóstico (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

Pode ser realizada a técnica de PCR com o triplo “primer” (TRP PCR), a qual utiliza dois iniciadores específicos que flaqueiam a sequência CGG e um terceiro iniciador que é complementar a essa trinca CGG que se repete. Logo, múltiplos produtos de PCR são amplificados e visualizados como picos seriais ou intermitentes na EC. Essa técnica é capaz de identificar todos os alelos, que sofreram expansão, desde alelos normais até alelos de extensão com a mutação completa, fornece informação sobre o tamanho da repetição CGG e a presença de interrupções AGG, uma vez que o iniciador complementar a sequência CGG tem dificuldade e não se liga de forma eficiente a sequências AGG gerando mudanças na intensidade do sinal emitido na EC (CHEN et al., 2010; TASSONE, 2015).

Por último, sabendo que os sintomas da síndrome estão inversamente relacionados com os níveis de FMRP, imunoenaios podem ser feitos para detectar a presença ou ausência dessa proteína. Vale ressaltar que esse método não é usado para diagnóstico de rotina, pois existem limitações, como indivíduos com a pré-mutação que podem ter apenas uma redução na quantidade de FMRP, porém é um método que poderá ser usado em futuros programas de rastreamento de recém-nascidos. Um exemplo dessa técnica é um imunoensaio enzimático (ELISA) quimioluminescente, que utiliza três anticorpos e um substrato para detecção da proteína (HAYWARD; KUMMARI; USDIN, 2017).

3.4 Tratamento

As estratégias de tratamentos para a SXF são apenas de suporte. Não há tratamentos disponíveis nem medicações aprovadas para solucionar o problema neuronal causado pela ausência da FMRP. Como o comportamento pode ser significativamente afetado na SXF, terapias baseadas em tratar esses sintomas podem ser muito úteis para os indivíduos, inclusive medicações podem ser usadas para tratar sintomas específicos como hiperatividade, ansiedade, comportamento obsessivo compulsivo e comportamento agressivo (FRAXARF, 2019a; FRAXARF, 2019b; UPMC, 2019).

Dificuldades comportamentais e adaptativas encontradas pelos indivíduos com SXF podem ser tratadas por meio de terapias de intervenção providenciadas por equipes interdisciplinares que englobam profissionais de áreas da psiquiatria e saúde mental, educadores, terapeutas ocupacionais, cuidadores e fonoaudiólogos. Aconselhamento e treinamento para os pais também é parte fundamental da terapia de apoio para indivíduos com a SXF. Os pais são orientados sobre informações a respeito da condição da criança, podem se conectar com outros grupos de apoio e inclusive há serviços terapêuticos disponíveis para eles (JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019).

Durante as últimas duas décadas, o estudo da fisiopatologia da síndrome levou à busca de alguns alvos da FMRP que poderiam ser supostos alvos de tratamento para a SXF (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017). Na SXF, dois neurotransmissores apresentam uma relevância maior: o glutamato e o ácido gama amino-butírico (GABA). Os receptores de glutamato são expressos em todo o cérebro e são essenciais para neurotransmissão excitatória e a plasticidade sináptica. Os receptores de glutamato são encontrados tanto nas membranas pós-sinápticas quanto nas membranas pré-sinápticas (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011).

Existe uma teoria para a ação do mGluR, de acordo com ela, na ausência da FMRP, a via de sinalização mGluR é estimulada em excesso levando a uma síntese proteica descontrolada nas sinapses e essa seria uma das causas do fenótipo observado na SXF (CHEN; JOSEPH, 2015). A sinalização excessiva da via glutamatérgica leva à tradução local aumentada de mRNA's na junção sináptica e também contribui para a internalização exagerada de AMPAR, o que diminuiu a maturação sináptica e enfraquece as sinapses, formando espinhas sinápticas longas e imaturas que seriam responsáveis pela deficiência intelectual presente nos indivíduos com a SXF

(WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011; JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019).

Em camundongos com ausência de FMR1, a inibição genética ou farmacológica do mGluR5 resgata o fenótipo normal, por isso, antagonistas mGluR podem apresentar eficácia clínica. Além disso, a identificação da via do NMDAR como alvo da FMRP é significativa do ponto de vista terapêutico, uma vez que antagonistas de NMDAR estão disponíveis e podem ser considerados uma opção para avaliação clínica como agentes únicos ou em conjunto com antagonistas de mGluR. mGluR's e NMDAR's medeiam mudanças na plasticidade sináptica pela sinalização através das vias de transdução de sinal de mTORC1 e de ERK, por isso agentes farmacológicos que agem nessas vias também podem ser considerados como possíveis alvos terapêuticos (DARNELL; KLANN, 2013).

A base molecular da ativação exagerada do mGluR não está completamente clara. Em modelos animais com camundongos com ausência de FMR1, o tratamento com antagonistas de mGluR resultou em resgate da morfologia dendrítica, sináptica e de alterações comportamentais, mas esses sucessos não foram alcançados em tratamentos com humanos (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017). Inicialmente, um composto identificado como AFQ056 apresentou melhoras comportamentais em problemas como hiperatividade e fala inadequada em pacientes com SXF com alelos com a mutação completa metilados. Entretanto, na fase seguinte de testes não foram notadas melhoras comportamentais significativas em adultos e adolescentes. Mais testes com esse medicamento, que estava na fase II, são necessários, especialmente em crianças (HAGERMAN et al., 2017).

Muitos sintomas da SXF como ansiedade, hiperatividade, dificuldade de aprendizagem, déficit de memória e autismo estão envolvidos com os receptores de glutamato. A sinalização via GABA também é alterada em paciente com SXF (WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011). Há uma redução na produção desse neurotransmissor (GABA) e expressão alterada das subunidades de seu respectivo receptor (GABAR) (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017).

Administração direta de GABA não é possível devido a sua baixa penetração no tecido cerebral. Logo, para restauração da taxa normal de inibição no Sistema Nervoso Central e, conseqüentemente, reversão de alguns fenótipos da síndrome, investiga-se o uso de agonistas de GABA (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017). Os GABAR do tipo A estão mais

relacionados a fenótipos de ansiedade e de hiperatividade, já os GABAR do tipo B, estão relacionados a diminuição da liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos, possuindo efeito inibitório no sistema glutamatérgico (JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019). Por enquanto, compostos como Acamprosato, Ganaxolona, Arbaclofeno e Riluzole foram testados (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017). Arbaclofeno age no GABAR do tipo B, por exemplo, e melhorou o isolamento social dos indivíduos (DARNELL; KLANN, 2013).

Esse medicamento encontra-se na fase III de testes, entretanto, nessa fase ele não apresentou melhoras comportamentais em adultos e adolescentes, mas em crianças observou-se melhoras comportamentais e em termos de irritabilidade. Além disso, foi observada uma tendência a melhoras significativas em relação a hiperatividade e isolamento social (HAGERMAN, 2017). Acamprosato que age tanto em GABAR do tipo A, quanto em GABAR do tipo B, obteve sucesso terapêutico, mostrou melhoras na hiperatividade e no comportamento social e avançou para a fase II de testes (HAGERMAN et al., 2017; JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019).

Outro composto, gaboxadol, um superagonista do receptor GABAR do tipo A, conseguiu resgatar a hiperexcitabilidade de neurônios na amígdala de camundongos, além de apresentar melhoras em relação às características comportamentais e convulsões. Esse composto ainda está na fase I de testes. Neuroesteróides sintéticos como ganaxolona também são potentes agonistas e conseguiram amenizar as convulsões e comportamentos repetitivos em camundongos. Em humanos mostrou diminuição da ansiedade e está na fase II de testes (HAGERMAN et al., 2017). Atualmente está em teste clínico um medicamento, ADZ73250, que aumenta seletivamente a ativação de GABAR do tipo A (FRAXARF, 2019c; FRAXARF, 2019d).

Metformina, uma droga usada para tratamento de diabetes tipo II em crianças e adultos, também foi testada e usada na prática clínica, apesar do mecanismo exato pelo qual ela age ainda não ser conhecido (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017; HAGERMAN et al., 2017; JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019). Porém em camundongos, essa droga inibiu a via de mTORC1 e ERK, resultando na compensação do excesso de transcrição que ocorre na SXF (CASTAGNOLA; BARDONI; MAURIN, 2017). Além disso, essa droga também diminuiu o nível de fosforilação de eIF4E em camundongos. Pacientes com a SXF que foram tratados com esse medicamento apresentaram melhoras comportamentais e de linguagem (HAGERMAN et al., 2017).

Apesar de um grande número de pacientes estarem testando a metformina, resultados variados são obtidos. Como ela não foi sistematicamente estudada em pacientes com SXF, atualmente há um estudo designado a investigar a segurança desse medicamento, bem como a eficácia em relação a sintomas comportamentais e cognitivos. O estudo também busca as melhores dosagens para adultos e crianças (FRAXARF, 2019e).

Um das causas para o excesso de proteínas presente na SXF, pode se dever a um aumento na atividade da ERK 1 e 2 dependentes de Ras que já foi demonstrada em modelos animais e no tecido cerebral humano. Uma droga conhecida como lovastadina, em modelos animais, inibe a Ras, reduzindo a atividade da ERK, ou prevenindo sua ativação, diminuindo a síntese proteica e melhorando a susceptibilidade do indivíduo a convulsões, e também melhorando sintomas comportamentais (HAGERMAN et al., 2017). Em seres humanos, melhoras comportamentais, em relação a hiperatividade, por exemplo, foram notadas (DARNELL; KLANN, 2013; JALNAPURKAR; COCHRAN; FRAZIER, 2019).

Por último, com os avanços na tecnologia do DNA, o sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas em conjunto com a proteína Cas9 (CRISPR-Cas9), foi utilizado em células tronco pluripotentes derivadas de pacientes com SXF e em neurônios pós mitóticos derivados dessas células para reverter a metilação nas repetições CGG e assim reativar o gene. A expressão da FMRP se manteve após o implante das células para o cérebro de camundongos, provando que a reativação do gene era mantida “in vivo”. Os efeitos em outros genes que não eram o alvo da terapia foram mínimos (LIU et al., 2018). Entretanto, ainda existem muitos obstáculos antes que o uso de células tronco e a edição de genomas para terapias possam ser aceitas para tratar pacientes com SXF ou qualquer outra desordem de desenvolvimento neuronal (HAGERMAN et al., 2017).

Parte da dificuldade dos estudos em seres humanos advém do fato de que uma nova medicação deve ser testada, inicialmente, em adultos com SXF, para depois ser testada em crianças. Entretanto, a reversão dos sintomas da SXF parece ser mais fácil quando o tratamento é iniciado em crianças mais jovens, uma vez que o cérebro de crianças ainda está em formação então uma intervenção precoce daria uma chance maior de resultados benéficos (USNIH, 2016). Além disso, vale ressaltar que reverter o fenótipo em modelos animais com ausência do gene FMR1 é mais fácil do que alterar a síndrome em pacientes (HAGERMAN et al., 2017).

4 Considerações Finais

A SXF é uma doença genética responsável por alterações no Sistema Nervoso Central, as quais causam déficit intelectual acompanhado de distúrbios cognitivos e comportamentais. Devido à ausência da proteína FMRP, e conseqüentemente, à ausência de repressão traducional realizada por ela, diversos circuitos neuronais encontram-se alterados. Apesar de diversos estudos já terem sido realizados, ainda há muito o que se descobrir e esclarecer em relação a complexa fisiopatologia neuronal da síndrome a nível molecular.

Em relação ao diagnóstico, apesar do padrão-ouro se basear na associação das técnicas de PCR e “Southern blot”, outras técnicas, como eletroforese capilar (EC), também podem ser utilizadas durante a análise. Em alguns centros genéticos da rede pública brasileira, muitas vezes, após a coleta do material do paciente, é realizada apenas a PCR convencional e o produto obtido com a técnica é posteriormente submetido a eletroforese para verificar se o gene FMR1 está alterado. Caso não amplifique ou se amplificar algum fragmento de tamanho suspeito, sugerindo desde alelos intermediários a alelos com mutações completas, repete-se a PCR. Se a amplificação permanecer inconstante, ora amplificando e ora não, a coleta poderá ser solicitada, lembrando que diversas variáveis relacionadas ao processo, como erros na etapa de extração do DNA genômico, podem causar interferência nesse resultado.

Caso o resultado continue inconclusivo, pode ser liberado um laudo informando ao paciente da situação e que análises moleculares mais avançadas serão necessárias. Caso o resultado seja negativo, repete-se a PCR apenas mais uma vez para que haja confirmação. E se o resultado for sugestivo de alelos intermediários até alelos com a mutação completa, a amostra é encaminhada para EC, para determinações mais precisas e para a emissão do diagnóstico final.

O uso de tecnologias, que permitem a edição do genoma humano, abre uma nova possibilidade para o tratamento da SXF. Apesar de ainda não se saber ao certo sobre a aplicabilidade em seres humanos, pesquisas nessa área representam um grande potencial para futuras terapias e para uma possível esperança de cura. Entretanto, apesar da técnica CRISPR-Cas9 conseguir reverter a mutação do gene FMR1, isso teria que ser feito ainda nos estágios iniciais da embriogênese, uma vez que é inviável alterar os trilhões de células que compõem o corpo humano. Vale lembrar que técnicas de edição de genoma enfrentam muitas dificuldades para serem aceitas devido a questões bioéticas.

Além disso, essa técnica pode, não intencionalmente, atacar outras partes do genoma que não estariam relacionadas com o gene FMR1 e, com isso, gerar outras mutações como efeito colateral. Portanto, apesar de ser uma possível esperança de cura, não só para a SXF como para diversas doenças genéticas, é necessário que ela seja aperfeiçoada para que seu uso se torne mais seguro.

Apesar de existirem estudos em busca da cura para a SXF, atualmente essa ainda é uma doença sem tratamento que leve a cura efetiva. Os esforços voltados ao desenvolvimento de medicações e terapias que proporcionem uma melhor qualidade de vida aos indivíduos com a SXF devem ser priorizados. Em Santa Catarina, por exemplo, existe a Associação Catarinense da Síndrome do X Frágil, a qual oferece apoio, por meio de projetos sociais, educacionais e terapêuticos aos indivíduos afetados e as suas famílias. Além disso, a Associação também incentiva e estimula pesquisas e oferece palestras e seminários sobre esse tema com o intuito de divulgar informações sobre a Síndrome à sociedade, e de promover uma melhora no bem-estar geral dos indivíduos acometidos.

Iniciativas como as da Associação de Santa Catarina deveriam ser difundidas por todo o país para que o conhecimento sobre a doença fosse ampliado e as pesquisas, com foco na qualidade de vida e na redução dos sinais e sintomas da síndrome, recebessem mais incentivos e investimentos, pois apenas dessa forma será possível proporcionar cada vez mais progressos à condição clínica dos pacientes.

5 Referências

ACGS (Association for Clinical Genetic Science). **Practice Guidelines for Molecular Diagnosis of Fragile X Syndrome.** London, 2012. Disponível em: <http://www.acgs.uk.com/media/908997/frx_bpg_final_nov_2014.pdf>. Acesso em: 19 apr. 2019.

BANERJEE, A. et al. Aberrant RNA translation in fragile X syndrome: From FMRP mechanism to emerging therapeutic strategies. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1693, part A, p. 24-36, aug. 2018.

BIANCALA, V. et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. **European Society of Human Genetics**, Basel, v. 23, n. 4, p. 417-425, apr. 2015.

CAMPOS, M. V. **Levantamento de proteínas candidatas a ativadoras do *splicing* do exón 12 do gene *FMRI***. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CASTAGNOLA, S.; BARDONI, B.; MAURIN, T. The Search for an Effective Therapy to Treat Fragile X Syndrome: Dream or Reality? **Frontiers in synaptic neuroscience**, Lausanne, v. 6, n. 9, p. 15, nov. 2017.

CHAUFFAILLE, M.L. The tip of the iceberg: what is hidden under the fragile X. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2, p. 80, apr. 2017.

CHEN, E.; JOSEPH, S. Fragile X Mental Retardation Protein: A Paradigm for Translational Control by RNA-Binding Proteins. **Biochimie**, Paris, v. 114, p. 147-154, jul. 2015.

CHEN, L. et al. An Information-Rich CGG Repeat Primed PCR That Detects the Full Range of Fragile X Expanded Alleles and Minimizes the Need for Southern Blot Analysis. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 12, n. 5, p. 589-600, sep. 2010.

CHRISTIE, S.B. et al. The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, Washington, v. 29, n. 5, p. 1514-1524, feb. 2009.

COFFEE, B. et al. Mosaic *FMRI* Deletion Causes Fragile X Syndrome and Can Lead to Molecular Misdiagnosis: a Case Report and Review of the Literature. **American journal of medical genetics**, Hoboken, v.146 A, n. 10, p. 1358-1367, may 2008.

DARNELL, J. C.; KLANN, E. The translation of translational control by FMRP: Therapeutic Targets for Fragile X Syndrome. **Nature neuroscience**, New York, v. 16, n. 11, p. 1530-1536, nov. 2013.

DOMNIZ, N. et al. Absence of AGG Interruptions Is a Risk Factor for Full Mutation Expansion Among Israeli *FMR1* Premutation Carriers. **Frontiers in genetics**, Lausanne, v. 9, n. 606, p. doi.org/10.3389/fgene.2018.00606, dec. 2018.

FÉLIX, T.M. Sítios frágeis. In: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. (Org.). **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 147-150.

FERNANDEZ-CARVAJAL, I. et al. Expansion of an *FMR1* grey-zone allele to a full mutation in two generations. **The Journal of Molecular Diagnostics**, New York, v. 11, n. 4, p. 306-310, jul. 2009.

FRAXARF (FRAXA Research Foundation). **Are There Treatments for Fragile X Syndrome?** Newburyport, 2019. Disponível em: <<https://www.fraxa.org/fragile-x-syndrome/treatment/>>. Acesso em: 27 apr. 2019a.

FRAXARF (FRAXA Research Foundation). **A Medication Guide for Fragile X Syndrome**. Newburyport, 2019. Disponível em: <<https://www.fraxa.org/guide-to-medication/>>. Acesso em: 27 apr. 2019b.

FRAXARF (FRAXA Research Foundation). **Clinical Trials**. Newburyport, 2019. Disponível em: <<https://www.fraxa.org/category/clinical-trials+current-research-grants/>>. Acesso em: 27 apr. 2019c.

FRAXARF (FRAXA Research Foundation). **Fragile X Clinical Trial of AZD7325 in Adults**. Newburyport, 2019. Disponível em: <<https://www.fraxa.org/fragile-x-clinical-trial-azd7325-adults/>>. Acesso em: 27 apr. 2019d.

FRAXARF (FRAXA Research Foundation). **Recruiting: Clinical Trial of Metformin for Fragile X Syndrome**. Newburyport, 2019. Disponível em: <<https://www.fraxa.org/open-label-trial-of-metformin-in-children-and-adults-with-fragile-x-syndrome/>>. Acesso em: 27 apr. 2019e.

HAGERMAN, et al. Fragile X syndrome. **Nature reviews. Disease primers**, London, v. 29, n. 3, p. 17065, sep. 2017.

HAYWARD, B. E. et al. A Set of Assays for the Comprehensive Analysis of *FMR1* Alleles in the Fragile X-Related Disorders. **The Journal of molecular diagnostics**, Bethesda, v. 18, n. 5, p. 762-744, sep. 2016.

HAYWARD, B. E.; KUMARI, D.; USDIN, K. Recent advances in assays for the fragile X-related disorders. **Human Genetics**, Berlin, v. 136, n. 10, p. 1313-1327, oct. 2017.

HCGN (HUGO Gene Nomenclature Committee). **Symbol report for FRAXA**, Cambridge, 2018. Disponível em: <https://www.genenames.org/data/gene-symbolreport/#!/hgnc_id/HGNC:3945>. Acesso em: 20 apr. 2019.

HE, Q.; GE, W. The tandem Agenet domain of fragile X mental retardation protein interacts with FUS. **Scientific reports**, London, v. 7, n. 1, p. 962, apr. 2017.

IRWIN, S. A.; GALVEZ, R.; GREENOUGH, W. T. Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragile-X Mental Retardation Syndrome. **Cerebral Cortex**, New York, v. 10, n. 10, p. 1038-1044, oct. 2000.

JALNAPURKAR, I.; COCHRAN, D. M.; FRAZIER, J. A. New Therapeutic Options for Fragile X Syndrome. **Current treatment options in neurology**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 12, feb. 2019.

KIRCHGESSNER, C.U.; WARREN, S. T.; WILLARD, H. F. X inactivation of the *FMR1* fragile X mental retardation gene. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 32, n. 12, p. 925-929, dec. 1995.

KRAWCZUN, M. S.; JENKINS, E. C.; BROWN, W.T. Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. **Human Genetics**, Berlin, v. 69, n. 3, p. 209-211, mar. 1985.

LIU, X. S. et al. Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. **Cell**, Cambridge, v. 172, n. 5, p. 979-992, feb. 2018.

LOZANO, R.; ROSERO, C. A.; HAGERMAN, R. J. Fragile X spectrum disorders. **Intractable & rare diseases research**, Tokyo, v. 3, n. 4, p. 134-146, nov. 2014.

LUBS, H. A. A Marker X Chromosome. **American journal of human genetics**, Baltimore, v.21, n. 3, p. 231-244, may 1969.

LYONS, J. I.; KERR, G. R.; MUELLER, P. M. Fragile X Syndrome: Scientific Background and Screening technologies. **The Journal of Molecular Diagnostics**, New York, v. 17, n. 5, p. 463-471, sep. 2015.

MARTIN, J. P.; BELL, J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. **Journal of neurology and psychiatry**, London, v. 6, n. 3-4, p. 154-157, jul./oct. 1943.

MARTINS, M. P. Perturbações do espectro X frágil: aspectos clínicos. In: Franco, V. (Org.). **Síndrome de X frágil pessoas, contextos & percursos**. Évora: Edições Aloendro, 2013. p. 21-40.

MONAGHAN, K.G.; LYON, E.; SPECTOR, E.B. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in medicine**, Baltimore, v. 15, n. 7, p. 575-586, jun. 2013.

MUDDASHETTY, R. S. et al. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation and mGluR signaling. **Molecular cell**, Cambridge, v. 42, n.5, p. 676-688, jun. 2010.

NAPOLI, I. et al. The Fragile X Syndrome Protein Represses Activity-Dependent Translation through CYFIP, a New 4E-BP. **Cell**, Cambridge, v.134, n. 6, p. 1042-1054, sep. 2008.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). FMR1 **fragile X mental retardation 1** [*Homo sapiens (human)*]. Bethesda, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2332#gene-expression>>. Acesso em: 06 mar. 2019.

NELSON, D.L.; ORR, H. T.; WARREN, S.T. The unstable repeats - Three Evolving Faces of Neurological Disease. **Neuron**, Cambridge, v. 77, n. 5, p. 825-843, mar. 2013.

NFXF (National Fragile X Foundation) **Fragile X Syndrome Testing & Diagnosis**. McLean, 2019. Disponível em: <<https://fragilex.org/understanding-fragile-x/fragile-x-101/testing-diagnosis/>>. Acesso em: 27 apr. 2019.

NHGRI (National Human Genome Research Institute). **Learning About Fragile X Syndrome**. Bethesda, 2016. Disponível em: <<https://www.genome.gov/19518828/>>. Acesso em: 07 mar. 2019.

NOLIN, S. L. et al. Fragile X full mutation alleles composed of few alleles: Implications for CGG repeat expansion. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 146 (A), n. 1, p. 60-65, jan. 2008.

NOLIN, S.L. et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. **Genetics in Medicine**, Baltimore, v. 17, n. 5, p. 358-369, sep. 2014.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson, Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OOSTRA, B. A.; WILLEMSSEN, R. The X chromosome and fragile X mental retardation. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, n. 99, v.1-4, p. 257-264, dec. 2002.

PEK, J. W.; ANAND, A.; KAI, TOSHIE. Tudor domain proteins in development. **Development**, Cambridge, v. 139, n. 13, p. 2255-2266, jul. 2012.

PRETTO, D. I. et al. CGG allele size somatic mosaicism and methylation in FMR1 premutation alleles. **Journal of medical genetics**, London, n. 51, v. 5, p. 309-318, may 2014.

RICHTER, J. D.; BASSEL, G. J.; KLANN, E. Dysregulation and restoration of translational homeostasis in fragile X syndrome. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 16, n. 10, p. 595-605, oct. 2015.

ROTHER, E. T. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. v-vi, abr./jun. 2007.

SALDARRIGA, W. et al. Fragile X Syndrome. **Colombia Médica**, Cali, v. 45, n. 4, p.190-198, oct./dec. 2014.

SCHAEFER, B. G.; THOMPSON JR, J. N. **Genética Médica**. Porto Alegre: AMGH, 2015.

SOFOCLEOUS, C.; KOLIALEXI, A.; MAVROU, A. Molecular diagnosis of Fragile X syndrome. **Expert review of molecular diagnostics**, London, v. 9, n.1, p. 23-30, s.m. 2009.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

SUTHERLAND, G. R. Fragile Sites on Human Chromosomes: Demonstration of Their Dependence on the Type of Tissue Culture Medium. **Science**, New York, v. 197, n. 4300, p. 265-266, jul. 1977.

TASSONE, S. Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragile X syndrome. **Expert review of molecular diagnostics**, London, v.15, n.11, p.1465-1473, oct. 2015.

TFDF (The Free Dictionary by Farlex). **Fragile site**. Huntington Valley, 2019. Disponível em: <<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/fragile+site>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

UPMC (University of Pittsburg Medical Center). **Fragile X Treatments and Medications**. Pittsburg, 2019. Disponível em: <<http://www.chp.edu/our-services/brain/neurology/fragile-x/parents/treatment>>. Acesso em: 27 apr. 2019.

USDHHS (U.S. Department of Health & Human Services). **Fragile X syndrome**. Gaithersburg, 2018. Disponível em: <<https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/6464/fragile-x-syndrome#diseaseReferencesSection>>. Acesso em: 26 aug. 2018.

USNIH (U.S. National Institutes of Health). **Fragile X syndrome**. Bethesda, 2019. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/fragile-x-syndrome#>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

USNIH (U.S. National Institutes of Health). **What are the treatments for the Fragile X syndrome?** Bethesda, 2016. Disponível em: <<https://www.nichd.nih.gov/health/topics/fragilex/conditioninfo/treatments>>. Acesso em 27 apr. 2019.

VERKERK, A. J. et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, Cambridge, v. 65, n. 5, p. 905-914, may 1991.

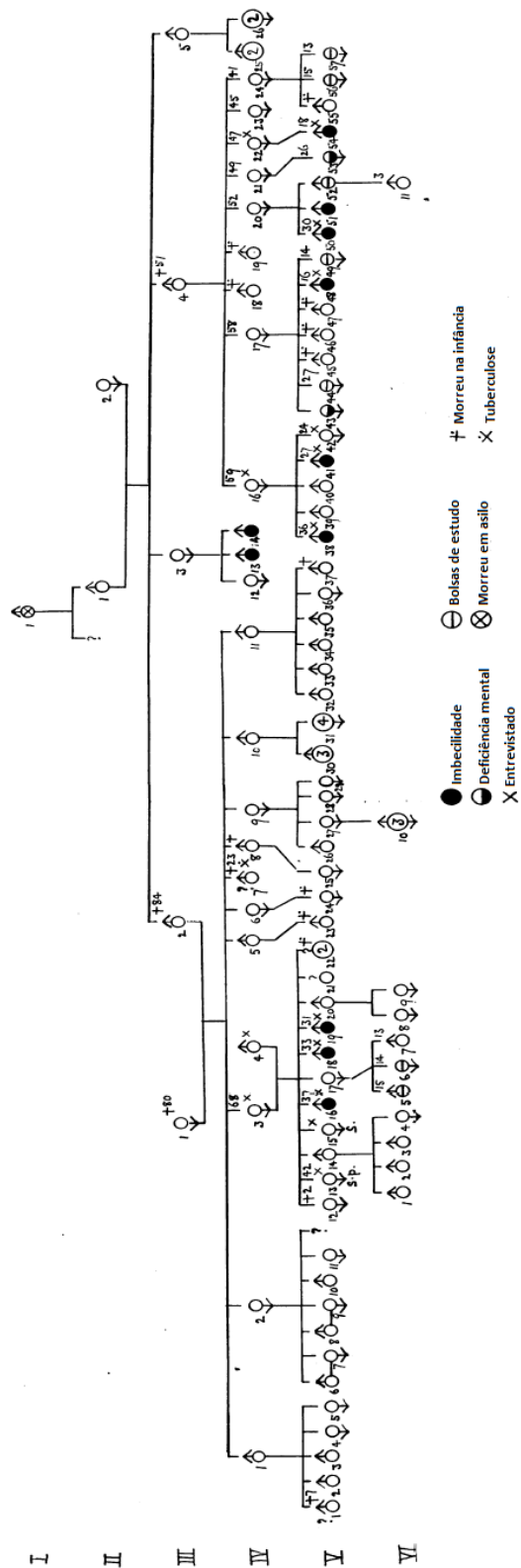
VICARI, R. R.; NOGAROTO, V. Sítios cromossômicos frágeis e alterações cromossômicas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 51, maio/jun. 2017.

WELLS, R. D. Mutation Spectra in Fragile X Syndrome Induced by Deletions of CGG-CCG Repeats. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 12, p. 7407-7411, mar. 2009.

WILLEMSEN, R.; LEVENGA, J.; OOSTRA, B. A. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. **Clinical genetics**, Copenhagen, v. 80, n. 3, p. 214-225, sep. 2011.

YRIGOLLEN, C. Y. et al. AGG interruptions within the maternal *FMR1* gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, Baltimore, v. 14, n. 8, p. 729-736, apr. 2012.

ANEXO A – Heredograma da família estudada por Martin e Bell, publicado em 1943.



Fonte: Modificada de Martin e Bell (1943).