

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

TESE DE DOUTORADO

**SÍNDROME DO CROMOSSOMO X FRÁGIL: ANÁLISE
INTRAFAMILIAL DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
PSICOLÓGICAS, FONOAUDIOLÓGICAS E
MOLECULARES**

DEBORA APARECIDA RODRIGUEIRO

BOTUCATU
2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**SÍNDROME DO CROMOSSOMO X FRÁGIL: ANÁLISE
INTRAFAMILIAL DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
PSICOLÓGICAS, FONOAUDIOLÓGICAS E
MOLECULARES**

DEBORA APARECIDA RODRIGUEIRO

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da UNESP,
campus de Botucatu, para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Rodrigueiro, Debora Aparecida.

Síndrome do cromossomo X frágil: análise intrafamiliar das características clínicas, psicológicas, fonoaudiológicas e moleculares / Debora Aparecida Rodrigueiro. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2006.

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira
Assunto CAPES: 20205007

1. Genética médica
2. Síndrome do cromossomo X frágil
3. Anormalidades cromossômicas

CDD 573.21

Palavras-chave: Aspectos clínicos; Fonoaudiologia; Gene FMR1; Psicologia; Síndrome do cromossomo X frágil;

Dedicatória

*Devo este trabalho principalmente à
cumplicidade dos mestres, dos pensadores
que figuram aqui e à confiança e convivência
de uma série de amigos fiéis.*

*À minha mestra Deise Helena de Souza,
desde o começo.*

Agradecimientos

*Há pessoas que marcam indelevelmente nossas vidas.
A elas agradeço por toda a atenção, respeito e partilha de seus
conhecimentos, na vida e na profissão.*

✓ *Ao meu orientador,*

*Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, por todos os anos de convivência,
aprendizado e, sobretudo, por confiar a mim a longa tarefa de realizar este
trabalho.*

✓ *Às minhas co-orientadoras;*

*Profa. Dra. Ângela Vianna-Morgante, pela confiança
depositada, atenção dispensada e pelo carinho e dedicação ao
me receber em seu laboratório;*

*Profa. Dra. Célia Maria Giachetti, no primor de sua colaboração
e no constante incentivo e apoio ao longo de todo este
trabalho;*

*Profa. Dra. Gimol Perosa, pelas inúmeras explicações, além
de colaboração e paciência ímpares.*

✓ *E aos colaboradores deste trabalho,*

*- Nely Maria de Carvalho Dellevedove, do Serviço Social
da Faculdade de Medicina da UNESP, campus de
Botucatu;*

*- À equipe da Profa. Dra. Ângela Vianna-Morgante,
especialmente à Fátima Laurinda e Sílvia Costa, do
Laboratório de Genética Humana do Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva da USP, campus de São
Paulo;*

*- À equipe da Profa. Dra. Célia Maria Giachetti, do
Depto. de Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e
Ciências da UNESP, campus de Marília;*

*- À equipe da Profa. Dra. Gimol Perosa, do Depto. de
Neurologia da Faculdade de Medicina da UNESP,
campus de Botucatu;*

*- Prof. Dr. César Taconelli, do Depto de Bioestatística do
Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.*

Presenças imprescindíveis e inesquecíveis.

O prazer de ter convivido e aprendido com vocês, eu carrego comigo.

- ✓ *A todos os indivíduos da família a que se refere este trabalho, em especial à Sra. LS, por confiarem em nosso Serviço de Aconselhamento Genético e por acreditarem que, aqui, as pessoas são especiais.*
- ✓ *Ao Serviço de Assistência Social e à Secretaria de Saúde do município de Coronel Macedo/ SP, pela colaboração e presteza dispensadas em nossas visitas aos pacientes e seus familiares.*
- ✓ *A todos que integraram nos últimos treze anos a equipe do Serviço de Aconselhamento Genético, Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu, parte da minha vida profissional e, acima de tudo, parte da vida de alguns milhares de famílias por nós atendidas. Obrigada.*

Rosana, Natália, Luciana, Aline, Renata, Perenette, Lucilene, Melissa, Rodrigo Luiz, Quiesi, Patrícia, Fernanda, Izolda, Raquel, César, Marisa, Izaías, Maria, Márcio...

Direta ou indiretamente, cada um a seu modo, obrigada pela participação que tiveram neste trabalho e neste período da minha vida acadêmica.

- ✓ *Às consistentes amigadas que conquistei no período em que convivi com a equipe da Profa. Dra. Ângela Vianna-Morgante no Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP,*

Maraísa, Lígia, Raimunda, Flávia, Juliana, Simone, Andréa, Luciana, Rafaela, Leonardo, Luís, Ronaldo, enfim, a todos sem exceção,

Muito obrigada pelo convívio agradável, pelas colaborações e sobretudo pela amizade, dentro e fora do campus.

- ✓ *Aos amigos de todas as horas que hoje têm muito mais conhecimento em genética do que poderiam sequer imaginar,*

James, Cristiano e Leandro; Izabela e Anete; Helô, Amanda e Vivi; Lu Fayan, Dani Toffano e Mariana; Ana Paula, Sérgio e Liu; Caio, Stein, Zaca, Eli e Aroldo, João Paulo e João Ricardo;

Obrigada pelas incontáveis horas que me escutaram e acima de tudo pelo apoio nos momentos mais difíceis deste período.

- ✓ *À minha família, uma genealogia que segrega muita união e amor, motivo pelo qual sempre me mantive perseverante, a todo o tempo. A vocês, meu tudo.*

- ✓ *Ao CNPq e à Fundação Lucentis pelo apoio financeiro.*

Epígrafe

Eu não existiria sem meus genes, tudo em mim depende deles. Mas meus genes, por si só, são insuficientes. É unicamente pelos dados simultâneos dos genes e do meio que atinjo um certo grau de complexidade, a partir do qual posso tornar-me co-autor de mim mesmo, possuidor e gerador de uma liberdade quase ilimitada.

O que é factível coletivamente na ciência pode também ser obtido pelo indivíduo na fabricação de si.

Albert Jacquard

Sumário

| SUMÁRIO | Página |
|---|---------------|
| Lista de figuras..... | 14 |
| Lista de tabelas..... | 16 |
| Lista de abreviações..... | 19 |
| Abstract | 21 |
| Resumo..... | 23 |
| 1. Introdução..... | 25 |
| 1.1. Características clínicas da SXF..... | 26 |
| 1.2. A genética da SXF..... | 30 |
| 1.3. O gene FMR1..... | 36 |
| 1.4. A proteína FMRP..... | 44 |
| 1.5. Correlações genótipo-fenótipo..... | 47 |
| 1.6. A síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil..... | 59 |
| 2. Objetivos..... | 65 |
| 3. Material e Métodos..... | 67 |
| 3.1. Grupo amostral..... | 67 |
| 3.2. Avaliação clínica..... | 68 |
| 3.3. Avaliação psicológica..... | 70 |
| 3.4. Avaliação fonoaudiológica..... | 75 |
| 3.5. Análise molecular..... | 79 |
| 3.6. Análise estatística..... | 87 |
| 4. Resultados..... | 95 |
| 4.1. Grupo amostral..... | 95 |
| 4.2. Avaliação clínica..... | 95 |
| 4.3. Avaliação psicológica..... | 100 |
| 4.4. Avaliação fonoaudiológica..... | 105 |
| 4.5. Análise molecular..... | 110 |
| 4.6. Análise estatística..... | 116 |
| 5. Discussão..... | 129 |
| 6. Conclusões..... | 134 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 136 |
| Heredograma | 159 |
| Anexos..... | 160 |

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|-----------|---|
| FIGURA 1 | Variabilidade da deficiência mental (DM) na síndrome do cromossomo X frágil. 29 |
| FIGURA 2 | O paradoxo de Sherman..... 31 |
| FIGURA 3 | Sítios frágeis distais em Xq..... 33 |
| FIGURA 4 | Representação esquemática do gene FMR1. 36 |
| FIGURA 5 | Mutações na repetição CGG na SXF. 38 |
| FIGURA 6 | Representação esquemática do início do gene FMR1. 41 |
| FIGURA 7 | Localização dos sítios de processamento alternativo no gene FMR1 45 |
| FIGURA 8 | Imagem digitalizada de um segmento de gel de poliacrilamida, exemplificando os resultados obtidos por PCR 84 |
| FIGURA 9 | Autorradiografia de membrana de nylon® após a hibridação com sonda StB12.3 exemplificando os resultados obtidos segundo a técnica de Southern blotting. 87 |
| FIGURA 10 | Heredograma completo da genealogia..... 159 |
| FIGURA 11 | Gráfico de análise de correspondência com dois fatores para os sinais clínicos comuns da SXF avaliados na genealogia. 122 |
| FIGURA 12 | Gráfico de análise de correspondência com três fatores para os sinais clínicos comuns da SXF observados na genealogia. 123 |

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| TABELA 1 Freqüências das características físicas encontradas na SXF..... | 49 |
| TABELA 2 Características de comportamento, fala e linguagem encontrados em indivíduos portadores da SXF, segundo diferentes autores..... | 55 |
| TABELA 3 Achados psicológicos e neurológicos relatados em pacientes com a SXF, segundo diferentes autores..... | 63 |
| TABELA 4 Distribuição das categorias de normalidade e deficiência mental propostas pelo DSM-IV e pelos manuais dos testes..... | 75 |
| TABELA 5 <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR..... | 82 |
| TABELA 6 Reagentes utilizados na reação de PCR e suas concentrações finais..... | 83 |
| TABELA 7 Resultados da avaliação clínica nos indivíduos do sexo feminino..... | 96 |
| TABELA 8 Resultados da avaliação clínica nos indivíduos do sexo masculino..... | 98 |
| TABELA 9 Freqüência dos achados clínicos nos indivíduos da genealogia..... | 99 |
| TABELA 10 Resultados da avaliação psicológica nos indivíduos do sexo feminino..... | 100 |
| TABELA 11 Resultados da avaliação psicológica nos indivíduos do sexo masculino..... | 102 |
| TABELA 12 Freqüência dos níveis de inteligência determinados através da avaliação psicológica nos indivíduos da genealogia..... | 103 |
| TABELA 13 Resultados da avaliação fonoaudiológica nos indivíduos do sexo feminino..... | 106 |
| TABELA 14 Resultados da avaliação fonoaudiológica nos indivíduos do sexo masculino | 108 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| TABELA 15 | Freqüência das alterações fonoaudiológicas identificadas entre os 34 homens e 48 mulheres da genealogia submetidos a avaliação fonoaudiológica..... | 109 |
| TABELA 16 | Resultados da avaliação molecular nos indivíduos do sexo feminino..... | 111 |
| TABELA 17 | Resultados da avaliação molecular nos indivíduos do sexo masculino..... | 113 |
| TABELA 18 | Freqüências dos resultados da análise molecular encontrada na genealogia..... | 114 |
| TABELA 19 | Número de indivíduos existentes na genealogia e os portadores de alterações no gene FMR1 identificados neste trabalho..... | 115 |
| TABELA 20 | Freqüência dos achados clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos encontrados na genealogia em relação ao diagnóstico molecular..... | 116 |
| TABELA 21 | Resultados do Teste de proporção χ^2 mostrando os valores de p na análise entre a presença do sinal e as mutações no gene FMR1..... | 117 |
| TABELA 22 | Resultados do teste exato de Fisher - Probabilidades de dependência das características observadas em relação à pré-mutação no gene FMR1, na genealogia em estudo..... | 118 |
| TABELA 23 | Resultados do teste exato de Fisher - Probabilidades de dependência das características observadas em relação mutação completa no gene FMR1, na genealogia em estudo..... | 119 |
| TABELA 24 | Resultados do teste exato de Fisher - Probabilidades de dependência das características observadas em relação mutação completa no gene FMR1, na genealogia em estudo. Neste teste, os dados das pacientes com a pré-mutação no gene FMR1 foram incluídos ao grupo com o gene normal..... | 120 |
| TABELA 25 | Tabela de Burt mostrando as freqüências absolutas dos sinais clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares avaliados na pesquisa..... | 126 |
| TABELA 26 | Tabela de Burt com as freqüências percentuais para os sinais clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e | 127 |

moleculares avaliados na pesquisa.....

Lista de Abreviações

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|----------|--|
| AFCM | Análise fatorial de correspondências múltiplas |
| CF | Comprometimento fonoaudiológico |
| COLUMBIA | Escala de Maturidade Mental Columbia |
| DL | Dígitos longos |
| DM | Deficiência mental |
| DMI | Deficiência mental de gravidade inespecífica |
| DMM | Deficiência mental leve a moderada |
| DMS | Deficiência mental severa a profunda |
| DSM IV | American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- IV |
| F | Sexo feminino |
| FM | Mutação completa do gene FMR1 |
| FMR1 | <i>Fragile X mental retardation gene 1</i> |
| FMRP | <i>Fragile X mental retardation protein</i> |
| FP | Frontal alto e proeminente |
| FXTAS | Síndrome de ataxia/tremor associada ao X frágil |
| GZ | Zona de transição |
| HA | Hiperextensibilidade das articulações |
| ICD-10 | International Classification of Diseases- 10 |
| INV | Teste de Inteligência Não Verbal, forma C |
| ITPA | Teste Illinois de Habilidades Psicolinguísticas |
| M | Sexo masculino |
| NL | Normal |
| OP | Orelhas proeminentes |
| PM | Pr-mutação no gene FMR1 |
| PO | Palato alto e ogival |
| POF | Falha ovariana prematura |
| QD | Quociente de desenvolvimento global |
| QI | Quociente de inteligência |
| RAVEN | Teste de Matrizes Progressivas |
| SXF | Síndrome do cromossomo X frágil |
| WISC | Escala Wechsler de Inteligência para Crianças |

Abstract

ABSTRACT

The fragile X syndrome (SXF) has been referred as the second most common form of mental retardation, affecting all ethnic groups in an estimate rate of 1:4000 live born. The SXF evolves a large spectrum of malformations, varying from emotional disturbances or learning disabilities to all levels of mental retardation. The clinical findings are consistent but not exclusive, and this fact many times difficulties the clinical recognition of the disease. The SXF is caused, in thesis, by the absence of the FMR1 gene product. The mechanism that leads to the syndrome in almost all of the patients is varying copies of a triplet instable repeat at the 5'end of the non-translated region of the FMR1 gene. This repetition tends to be higher at each generation, specially affecting the female meiosis. What happen is the methylation of the repeated expansions at the promoter region of the gene, correlated to the transcription regulation of the gene. This work aimed to analyze the segregation of the FMR1 gene in a large family composed by 325 individuals, comparing the clinical, psychological, speech and molecular findings among the affected and the normal cases. Clinical evaluation was performed in 98 individuals. Psychological tests were applied in 65 individuals, speech tests in other 82, and molecular analysis in 86 cases. We confirmed 8 cases of full mutation (FM) and 7 cases of premutation (PM) in the FMR1 gene, among 6 familiar nucleuses. Statistical analysis has showed an association between the FMR1 PM and speech disorders and an association between the FMR1 FM and a high and arched palate, mental retardation and speech disorders.

Resumo

RESUMO

A Síndrome do cromossomo X frágil (SXF) é a segunda maior causa de deficiência mental conhecida, afetando cerca de 1 em 4000 nascidos vivos, afetando a todas as populações e todos os grupos étnicos. A SXF apresenta um variado espectro de envolvimento, variando de problemas emocionais ou de aprendizado leves, até todos os níveis de deficiência mental. Os achados clínicos são consistentes mas não exclusivos, fato este que muitas vezes torna difícil seu reconhecimento através do exame físico. A SXF é, em hipótese, devida à ausência do produto gênico de FMR1. O mecanismo da mutação que dá origem à síndrome em praticamente a totalidade dos casos é a variação do número de cópias de uma repetição instável de trinucleotídeos CGG na extremidade 5' não traduzida do gene FMR1, e que tende a aumentar a cada geração, principalmente através das meioses femininas. O que ocorre é a metilação das repetições expandidas correlacionadas com a regulação da transcrição de FMR1. O presente trabalho teve por objetivo analisar a segregação do gene FMR1 em uma grande genealogia com 325 indivíduos, comparar os achados clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares entre os indivíduos afetados e não afetados pela SXF na genealogia. Foram realizados exames físicos em 98 indivíduos, testes psicológicos em 65, fonoaudiológicos em 82 e moleculares em 86. Foram confirmados 8 casos de mutação completa (FM) e 7 casos de pré-mutação (PM) no gene FMR1 em 6 dos 63 núcleos familiares. A análise estatística nesta genealogia revelou uma associação entre a presença de PM no gene FMR1 e o comprometimento fonoaudiológico, e associação entre a FM no gene FMR1 e presença de palato alto, deficiência mental e comprometimento fonoaudiológico.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF) (MIM #309550) é a forma mais freqüente, mais pesquisada e melhor documentada de deficiência mental herdável em seres humanos (CORNISH e col., 2005). No âmbito das etiologias genéticas mais freqüentes de deficiência mental, a SXF é precedida apenas pela trissomia do cromossomo 21 (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

Estimativas atuais indicam uma incidência da SXF, isto é, a forma completa da síndrome exibindo inabilidade intelectual, da ordem de 1 em 4000 homens e 1 em 6000 mulheres (TURNER e col., 1996, GARDNER e SUTHERLAND, 2004). O fenótipo da SXF está associado a mutações no gene FMR1 (*fragile X mental retardation 1*) e abrange um amplo espectro de envolvimento físico e comportamental, refletindo sua expressividade clínica variável (NELSON, 1995).

A forma de deficiência mental ligada ao cromossomo X descrita por MARTIN e BELL em uma grande família inglesa (1943) tratava-se da SXF (LUBS e col., 1969, OPTIZ e col., 1984). Este tipo de deficiência mental ligada ao sexo concorrendo com macroorquidismo foi chamada de síndrome de Martin-Bell por cerca de 30 anos. (NELSON, 1995). A SXF foi assim denominada através da associação do sítio frágil sensível ao folato, localizado em Xq27.3 (FRAXA), observado em uma proporção de células nas preparações citogenéticas de pacientes afetados (HAGERMAN, 1999).

O sítio frágil FRAXA reside e está associado com a expansão da repetição do trinucleotídeo CGG na extremidade 5' do gene FMR1 (POZDNYAKOVA e REGAN, 2005). Esta expansão causa metilação irreversível do DNA, silenciando

a expressão gênica e levando a uma substancial redução nos níveis da proteína codificada por este gene, denominada FMRP (*fragile X mental retardation protein*) (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

A proteína FMRP é necessária para o desenvolvimento e função normais do cérebro, executando um papel essencial tanto na função sináptica como no crescimento dos dendritos (DARNEL e col., 2001, IRWIN e col., 2001).

Tem sido sugerido que a proteína FMRP deva desempenhar atividade em algumas, senão todas as seguintes funções: trânsito nuclear-citoplasmático de RNAs; controle de tradução; transporte de RNAs nos dendritos; tradução e regulação dendrito-específica (JIN e WARREN, 2000; POZDNYAKOVA e REGAN, 2005). Porém o real papel desempenhado na célula por esta proteína ainda está longe de ser totalmente esclarecido (POZDNYAKOVA e REGAN, 2005).

1.1. Características clínicas da SXF.

Um grande número de anormalidades físicas e cognitivas está associado a SXF. Deficiência mental, alterações no comportamento, dismorfismos faciais, anormalidades no tecido conjuntivo, aumento do volume testicular em homens em idade pós-puberal e falha prematura ovariana em mulheres fazem parte do espectro clínico da SXF (POZDNYAKOVA e REGAN, 2005). As manifestações são consistentes mas não exclusivas, e a existência de portadores de alteração no gene FMR1 sem manifestações clínicas aparentes impossibilitam o diagnóstico da SXF baseado apenas na avaliação clínica.

1.1.1. A deficiência mental

A principal manifestação clínica da SXF é a deficiência mental, um significativo comprometimento das funções cognitivas e de adaptação. Para o indivíduo afetado, representa um bloqueio que limita as capacidades de aprendizado, a habilidade de auto-expressão, liberdade de movimentos e realização de tarefas. Para a sociedade, representa uma inabilidade caracterizada por redução de produtividade, uma certa dependência e vulnerabilidade à discriminação e exploração. Para a Saúde Pública é uma anormalidade comum, distribuída por todos os estratos da população e que impõe responsabilidades e custos vitalícios. Para a Medicina e para a Biologia, a deficiência mental é uma anormalidade na formação e/ ou função do sistema nervoso central que demanda avaliação e explicação (STEVENSON e col., 2000).

A SXF contribui para 15-20% dos casos de deficiência mental ligada ao cromossomo X (MAES e col., 2000), correspondendo a 2% de homens e 0,3% de mulheres com deficiência mental (STEVENSON e col., 2000).

Na SXF o comprometimento intelectual exibido pelos afetados pode variar de deficiência mental mediana a profunda (NELSON, 1995). Esta categorização corresponde ao funcionamento intelectual geral do indivíduo, definido pelo valor do quociente de inteligência (QI) determinado. Considera-se normal o indivíduo que apresenta o QI acima de 70, e com deficiência mental o indivíduo que apresenta o funcionamento intelectual geral significativamente abaixo da média, ou seja, o valor de QI abaixo de 70.

Os níveis de gravidade de deficiência mental definidos pelo DSM IV (*) são: leve, moderado, severo e profundo, os quais são consistentes com a ICD-10 (**)

(PLOMIM e col., 2000). Estas categorias encontram-se distribuídas em faixas de valores específicos de QI. Considera-se portador de deficiência mental leve o indivíduo que apresente QI entre 50- 70, para a deficiência mental moderada o QI é da ordem de 35- 50. Na deficiência mental severa, o QI atinge entre 25 e 35, enquanto um valor de QI menor que 25 pontos é o encontrado na deficiência mental profunda (APA, 2000).

O termo deficiência mental de gravidade inespecificada pode ser usado quando existe uma forte suposição de deficiência mental mas a inteligência da pessoa não pode ser testada por métodos convencionais. Isto ocorre na avaliação de indivíduos não cooperativos ou com demasiado prejuízo do funcionamento intelectual geral, e em bebês (WHO, 1992).

Em homens afetados pela SXF, os valores de QI encontram-se em duas categorias. Até os 20 anos de idade apresentam uma média de QI igual a 50, enquanto indivíduos mais velhos exibem o valor médio de 35. Tais resultados são por vezes interpretados como um reflexo do declínio do QI com a idade (CORNISH e col., 2005). Por outro lado, a possibilidade de tal diferença ser reflexo de intervenção deve ser considerada, uma vez que pacientes mais jovens são menos freqüentemente institucionalizados, e devem então representar uma classe mais funcional (NELSON, 1995).

()American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- IV*

*(**)International Classification of Diseases- 10*

Há de salientar-se que o declínio pós-puberal nos valores de QI possa representar um declínio real ou ainda uma diminuição no potencial de aprendizado, relativa a idade (CORNISH e col., 2005).

Em mulheres portadoras da SXF há uma menor prevalência de deficiência mental, estando a ampla maioria dessas mulheres nas categorias de inteligência limítrofe e de deficiência mental *moderada* (TASSONE e col., 2000; VAN ESCH, 2006).

A porcentagem de homens e mulheres com a SXF que se encontram nas categorias apresentadas podem ser observadas na FIGURA 1.

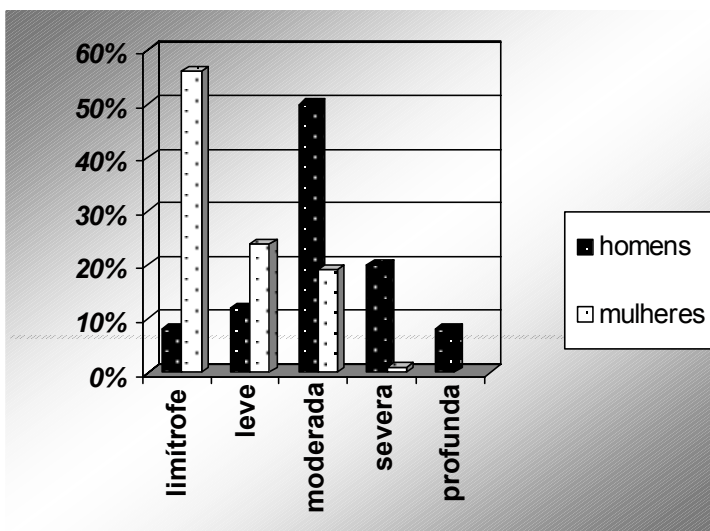


FIGURA 1:

variabilidade da deficiência mental (DM) na síndrome do cromossomo X frágil. Categorias de DM (zona limítrofe, DM leve, DM moderada, DM severa, DM profunda) e a porcentagem de homens e mulheres com a SXF que se encaixam nas mesmas são mostrados. (modificado de Sutherland e col., 1985, Shawn, 1995 e Stevenson e col., 2000).

1.2. A genética da SXF.

A herança da SXF apresenta-se desconexa aos padrões mendelianos clássicos, apesar de as mutações encontradas fornecerem uma explicação para a genética atípica encontrada nesta doença.

O aspecto mais intrigante da SXF é sua penetrância incompleta tanto em homens quanto em mulheres portadores da mutação. Isto se torna peculiar nos casos dos 'homens transmissores normais (NTMs) que transmitem a mutação para seus netos através de suas filhas, mas aparentemente não são afetados (HAGERMAN, 1999).

Mais intrigantes ainda são as probabilidades de deficiência mental baseadas no acometimento dos parentes. Isto se tornou conhecido na literatura como o "paradoxo de Sherman" (SHERMAN e col., 1984), onde a probabilidade de deficiência mental é aumentada através do número de gerações por onde a mutação é transmitida, e é maior tanto para filhos e filhas de mulheres afetadas tanto como para as mulheres com irmãos afetados.

A FIGURA 2 ilustra o paradoxo de Sherman através de uma genealogia imaginária. Nota-se na figura que há um aumento da probabilidade de ocorrência da deficiência mental à medida que as gerações se sucedem.

Uma vez que indivíduos afetados são encontrados, as probabilidades se aproximam das esperadas na herança mendeliana, entretanto, nas gerações iniciais, probabilidades significativamente reduzidas são encontradas.

Há a manifestação de algumas características do fenômeno de antecipação sobre o paradoxo de Sherman, mesmo não se encaixando a

definição estrita do termo. Porém, devido às probabilidades de acometimento aumentarem no decorrer de gerações, a antecipação tem sido associada por alguns autores no entendimento da herança da SXF (NELSON, 1995).

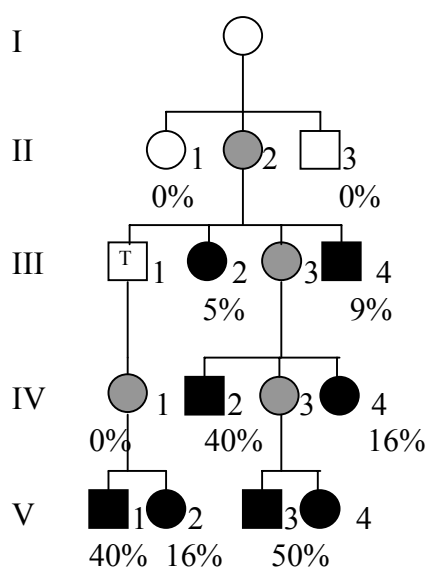
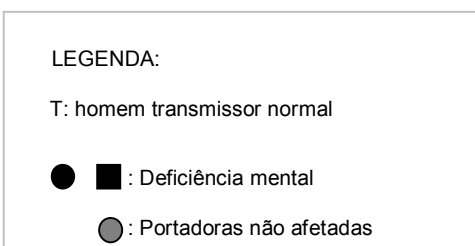


FIGURA 2:

O paradoxo de Sherman. Ilustração de riscos de deficiência mental baseados na posição do heredograma. (de acordo com Sherman, 1984 e Nelson, 1995).



1.2.1. Citogenética e a SXF.

Desde que LUBS e col. (1969) descreveram a presença de um cromossomo X marcador associado à deficiência mental, esta variante tornou-se conhecida como “cromossomo X frágil”.

Nos anos seguintes foram descritas outras famílias, confirmando esta associação (ESCALANTE e col., 1971; GIRAUD e col., 1976; HARVEY e col., 1977; SUTHERLAND, 1977).

Estas falhas, cromossômicas ou cromatídicas, estão presentes sempre no mesmo ponto do cromossomo, em significativo número de células e herdados mendelianamente. A fragilidade pode ser evidenciada pela produção (sob certas condições de cultura) de fragmentos acêntricos, cromossomos deletados, figuras trirradiais, e o próprio sítio frágil (SUTHERLAND, 1979).

Com o advento de um marcador cromossômico presente em alguns casos de deficiência mental ligada ao cromossomo X, a natureza sindrômica da doença tornou-se aparente. Uma vez que as condições de cultura para a caracterização do cromossomo X frágil foram estabelecidas, a citogenética se tornou a ferramenta primária de diagnóstico da SXF (SUTHERLAND, 1977).

Enquanto os resultados mostravam-se variáveis entre diferentes laboratórios, um maior dilema surgiu a partir das inconsistências na visualização do sítio frágil, variando de nenhuma expressão até altas porcentagens de células positivas em metáfases de membros da mesma família (SUTHERLAND, 1979).

Três novos sítios frágeis muito próximos a FRAXA foram identificados (FIGURA 3). Um deles, o FRAXD, é considerado um sítio frágil constitutivo e não está associado a manifestações clínicas. Os outros dois, FRAXE e FRAXF, têm sido identificados em famílias onde há ocorrência de deficiência mental previa e erroneamente classificadas como portadoras da SXF.

A avaliação citogenética torna o sítio FRAXD o único reconhecível dentre os citados e, a distinção entre FRAXA, FRAXE e FRAXF requer o uso de técnicas de citogenética molecular ou outros métodos moleculares (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

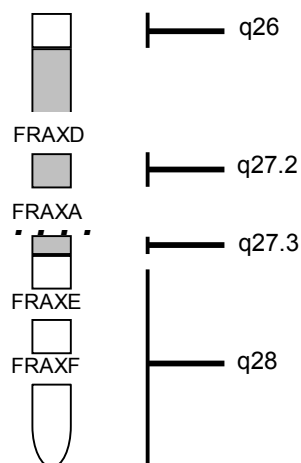


FIGURA 3:
 Sítios frágeis distais em Xq.
 FRAXA, FRAXE e FRAXF são
 folato-sensíveis. FRAXD é
 sítio frágil constitutivo
 (Modificado de Gardner e
 Sutherland, 2004).

O conhecimento corrente da genética molecular da SXF deixou mais compreensível a variabilidade de expressão do sítio frágil, uma vez que as mutações divergem em uma mesma família. A avaliação molecular do gene FMR1, eficaz e indúbia, tornou-se o padrão “ouro” para o diagnóstico apropriado da SXF.

Com a tecnologia molecular utilizada para o diagnóstico da SXF, o papel da citogenética não é o de diagnóstico da síndrome, mas o de identificação de outras possíveis alterações cromossômicas que podem coexistir em um mesmo paciente, além de ser o procedimento laboratorial primariamente indicado para a investigação de causas genéticas de deficiência mental (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

1.2.2. Genética molecular e a SXF.

Três grupos independentemente estudaram a região no cromossomo X envolvida com a fragilidade citogenética no outono de 1991.

Estes eram os grupos de Jean-Louis Mandel do INSERM (Estrasburgo, França); Grant Sutherland e Rob Richards do *Adelaide Children's Hospital* (Adelaide, Austrália) com a colaboração de David Schlessinger da *Washington University* (St. Louis, EUA); e o consórcio américo-holandês, composto principalmente pelos laboratórios de C. Thomas Caskey e David Nelson na *Baylor College of Medicine* (Houston, EUA), Stephen Warren na *Emory University* (Atlanta, EUA) e Bem Oostra da *Erasmus University* (Rotterdam, Holanda).

Vários centros de pesquisa trabalhavam já no início da década de 1980 através de estudos de clonagem posicional em prol da identificação do gene responsável pela SXF. Novos marcadores foram identificados nas vizinhanças do loco Xq27.3. Dentre elas, a sonda St14 definindo uma seqüência repetitiva de número variável no loco DXS52 que é até hoje um dos melhores marcadores genéticos na banda Xq28 (OBERLÉ e col., 1986).

O mapeamento físico da região empregou um grande número de pontos de quebra no cromossomo X em Xq27 e Xq28. Estes pontos de quebra usados para posicionar marcadores de DNA entre si permitiram a geração de marcadores adicionais com a finalidade de estabelecer a localização genética da síndrome do cromossomo X frágil nesta região.

Três contribuições em particular levaram ao isolamento do sítio frágil e do gene FMR1: o isolamento do cromossomo contendo a quebra no sítio frágil; a produção de grandes insertos de DNA derivados da região; e o estabelecimento de grandes fragmentos de restrição cujos tamanhos estavam especificamente alterados em homens portadores da SXF, devido a metilação (YU e col., 1991, OBERLÉ e col., 1991, BELL e col., 1991).

Os híbridos de células somáticas que retinham o cromossomo X frágil foram originalmente importantes no estabelecimento da independência de outros fatores autossômicos no aparecimento do sítio frágil (WARREN e col., 1987) e levaram à conseqüente produção de um painel de linhagens celulares híbridas (WARREN e col., 1990).

Uma vez que marcadores foram identificados na região, definidos pelos painéis de linhagens celulares híbridas bem como através dos mapas genéticos, a eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi a ferramenta utilizada por vários grupos para gerar mapas da região. Dentre tantos trabalhos, um achado significativo foi o do consórcio américo-holandês que utilizou sondas derivadas de cromossomos artificiais de levedura (YACs) (VERKERK e col., 1991).

Pouco antes disso, entretanto, os grupos de Mandel e Davies relataram a identificação de anormalidades na metilação do DNA de pacientes com a SXF detectadas por PFGE usando sondas distais ao sítio frágil (VINCENT e col., 1991; BELL e col., 1991).

Ambos os grupos, o de Mandel e o consórcio américo-holandês, chegaram à identificação de uma seqüência repetitiva do trinucleotídeo CGG na região de instabilidade e metilação (OBERLÉ e col., 1991; VERKERK e col., 1991), e propuseram seu envolvimento no comportamento hipermutável da região. Esta suspeita acabou sendo diretamente demonstrada pelo grupo de Sutherland (KREMER e col., 1991) ao mostrarem que as repetições eram o ponto exato das alterações no DNA dos cromossomos X frágil e, ainda, que estas regiões apresentavam-se polimórficas na população normal.

Nos estudos posteriores do consórcio américo-holandês (FU e col., 1991) o comportamento detalhado das alterações desta seqüência repetitiva foi esclarecido. O mesmo grupo de pesquisadores isolou um cDNA, derivado de um gene designado como FMR1. A ilha CpG sensível a metilação encontrava-se incluída na seqüência analisada, indicando a presença da seqüência hipermutável do sítio frágil em um éxon do gene FMR1. A completa ausência de outros genes nesta região levou à conclusão atual de que o gene em questão é o único cujas alterações são passíveis de resultar na SXF (GARDENR e SUTHERLAND, 2004).

1.3. O gene FMR1.

Dentre as 155 Mb que perfazem a seqüência do cromossomo X humano (ROSS e col., 2005), o gene FMR1 ocupa 38 Kb (O'DONNELL e WARREN, 2002). Composto de 17 éxons (FIGURA 4), tem em seu primeiro e maior deles a seqüência repetitiva do trinucleotídeo CGG, que apresenta em alelos normais (NL) um número variável de 6 a aproximadamente 50 cópias, com valor médio de 29 repetições (TERRACIANO e col., 2004).

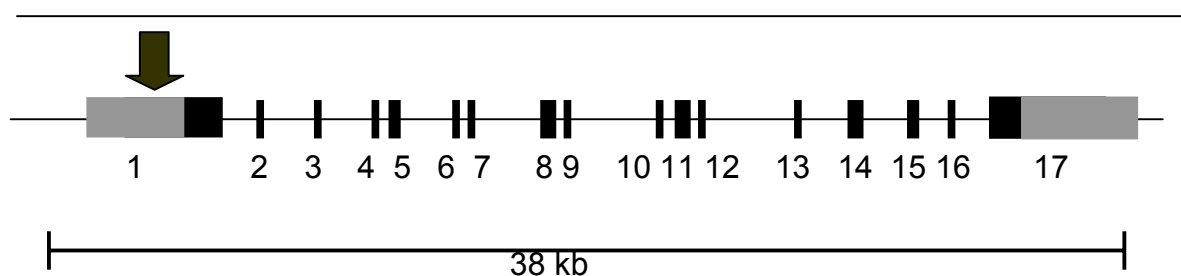


FIGURA 4: Representação esquemática do gene FMR1. Os 17 éxons simbolizados por retângulos negros aparecem numerados. As regiões em cinza representam seqüências não traduzidas dos éxons 1 e 17. A seta indica a região relativa do éxon 1 onde localiza-se a repetição CGG.

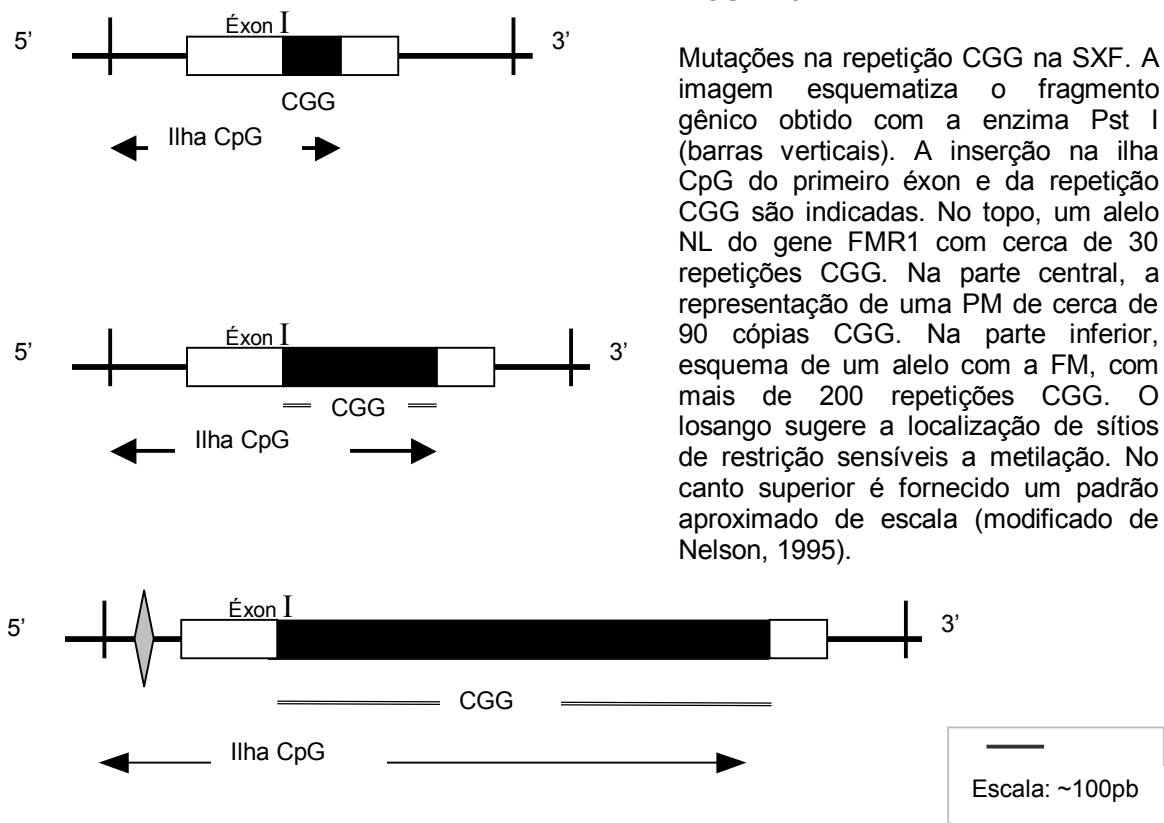
A origem da instabilidade dos alelos de FMR1 ainda é questionável. É fato que quando um alelo apresenta entre 45 e 60 cópias CGG, a instabilidade gerada

resulta em expansão da repetição. Estes constituem a segunda classe alélica, algumas vezes categorizados como protomutados, são amplamente conhecidos como “zona de transição” (GZ).

A terceira classe é constituída de alelos com a expansão que variam entre 55 e 200 cópias CGG, denominados, em grupo, de pré-mutações (PM). São estas PM, instáveis, que durante as meioses (principalmente femininas) originam a quarta classe alélica de FMR1, chamada de mutação completa (FM), caracterizada por expansões de mais de 200 cópias da repetição (FU e col., 1991; SNOW e col., 1993; MALTER e col., 1997). O risco de expansão das PM durante as meioses femininas está correlacionado ao tamanho real da repetição (FU e col., 1991, HEITZ e col., 1992).

Enquanto a distinção entre PM e FM é clara, aquela entre os alelos PM e GZ, bem como a diferença entre alelos GZ e NL permanece incerta, refletindo o pouco conhecimento sobre os mecanismos básicos de transição entre uma categoria e outra.

A distinção indicada acima, tomada de publicações recentes (NOLIN e col., 2003, TERRACIANO e col., 2004); não é inquestionável e tampouco definitiva. A FIGURA 5 mostra esquematicamente os alelos NL, PM e FM do gene FMR1, que são as três classes alélicas consideradas neste trabalho.



O modelo de padrão mutacional corrente para explicar a progressão de um alelo NL até o estado FM foi gerado por MORTON e MACPHERSON (1992). No modelo N-S-Z-L, segundo os autores, uma mutação inicial ocorreria em um alelo NL, aqui chamado N, adquirindo instabilidade limitada, passando a ser chamado de S.

A seguir, este alelo S sofre expansão ou contração de uma ou duas repetições, e esta instabilidade pode permanecer por até 90 gerações (CHAKRAVARTI, 1992). Então, através de seguidas expansões, o alelo S atingiria a faixa de PM, sendo chamado Z, e Z facilmente sofreria uma hiperexpansão tornando-se L, na classe FM. Este modelo, que resulta em desequilíbrio de

ligação, pode explicar o efeito fundador na SXF (CHIURAZZI e col., 1996a, 1996b).

Os indivíduos com a FM no gene FMR1 podem apresentar instabilidade somática da seqüência repetida, o que leva a um dos dois tipos de mosaicismo na SXF (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

O mosaicismo mutacional ocorre em cerca de 20% dos indivíduos afetados que apresentam a FM em co-ocorrência com outra linhagem celular, que contém o alelo pré-mutado do gene FMR1 não metilado e funcional. Mais rara é a ocorrência de uma linhagem normal em conjunto com outra linhagem celular com a PM ou a FM no gene FMR1. Nestes casos a diferença pode aparecer no mesmo tecido, ou em tecidos diferentes (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

O segundo tipo, o mosaicismo de metilação, ocorre em casos onde o número de cópias é característico da FM, mas o DNA não está metilado em todas as células. O mosaicismo de metilação pode ser encontrado em indivíduos com o número de repetições CGG no limite inferior da faixa de FM (GARDNER e SUTHERLAND, 2004).

Diminuições no tamanho das repetições são muito raras (MINGRONI-NETTO e col., 1996). Em alguns casos, o tamanho da FM apresenta-se menor na prole de mulheres com a FM (OBERLÈ e col., 1991, CHIURAZZI e col., 1994). Contrações de um alelo FM para a forma PM também já foram observadas (FU e col., 1991, CHIURAZZI e col., 1994).

VAN DEN OUWENLAND e col. (1994) constataram a contração da forma PM para a forma normal do gene FMR1 em uma filha de mulher portadora da PM.

Baseado em estudos de ligação, os autores concluíram que a conversão gênica foi o mecanismo envolvido nesse caso.

Até a presente data, não foi observado na literatura o relato de contração - ou conversão- gênica de um alelo PM para a forma normal em transmissão vertical de homem - mulher.

A expansão massiva da repetição CGG é a mutação responsável por mais de 95% dos casos de SXF (WARREN e SHERMAN, 2001). Como resultado da expansão, tanto a repetição como a ilha CpG na extremidade 5' de FMR1 são metiladas e a expressão gênica é silenciada (PIERETTI e col., 1991; SUTCLIFFE e col., 1992; HORNSTRA e col., 1993).

O tratamento através de inibidores de metilação em linhagens celulares com a FM no gene FMR1 é capaz de reativar a expressão do gene, ainda que em pequena escala (CHIURAZZI e col., 1998).

Padrões de metilação aberrantes e sua propagação clonal em linhagens celulares estão correlacionados a certas condições patológicas em humanos, como as síndromes de Angelman, Prader-Willi, além da SXF (TASSONE e col., 1999).

Em indivíduos com o alelo FM do gene FMR1 observa-se um padrão variável de metilação. Cada padrão de metilação representa um epigenótipo, e a variabilidade dos epigenótipos celulares de cada indivíduo é incomum, sugerindo que os padrões de metilação, tanto em indivíduos normais como em afetados são dinâmicos. Em indivíduos com o alelo FM, a presença de um número variável de células onde não ocorre a metilação garante a expressão gênica em variados graus, influenciando o fenótipo (TASSONE e col., 1999).

O promotor do gene FMR1 encontra-se numa ilha CpG, de cerca de 1Kb. A transcrição é iniciada em três locais diferentes ao longo do promotor. Observando o sentido 5'- 3', os sítios III, II e I (FIGURA 6), anteriores à repetição CGG, são utilizados tanto em alelos normais quanto naqueles onde há PM, mas em proporções diferentes. Quanto maior a repetição, há o predomínio de utilização nos sítios iniciadores mais distais à repetição, indicando que a seleção de local de iniciação é influenciada pelo elemento CGG (BEILINA e col., 2004).

Apesar do conhecimento da influência da seqüência CGG repetida, o mecanismo que leva à seleção diferenciada do local de início de transcrição no promotor do gene FMR1 não foi explicado. Há especulações sobre sua relação com os níveis aumentados de mRNA (SMITH e col., 2004), observáveis em portadores da PM (TASSONE e col., 2000).

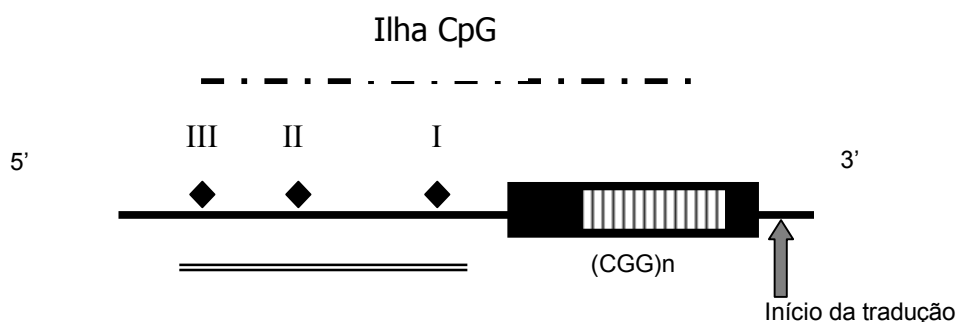


FIGURA 6: Representação esquemática do início do gene FMR1. O promotor do gene e a maior parte do éxon 1 estão inseridos na ilha CpG, delimitada pela linha pontilhada acima da figura. Os sítios de transcrição no promotor (região demarcada pela linha dupla) do gene, representados por losangos, são requeridos de acordo com o tamanho da repetição CGG (retângulo hachurado). O retângulo negro representa o éxon 1, onde está inserida a repetição CGG. A seta simboliza o ponto da seqüência correspondente ao início da tradução.

A seqüência CGG repetida apresenta em alelos normais 2 ou mais interrupções AGG esparsas que, quando presentes, conferem estabilidade à mesma. A estabilidade das repetições é determinada pelo comprimento da repetição pura e pela presença das inclusões AGG, ocorrendo a cada 10 cópias CGG. Portadores de PM e FM possuem repetições maiores com a presença de 1 ou nenhuma inclusão AGG (TERRACIANO e col., 2004).

A perda das inclusões AGG parece representar um evento mutacional importante na geração de alelos de FMR1 instáveis que, conseqüentemente, são passíveis de expansão (EICHLER e col., 1996). Observações posteriores sugerem que a perda das interrupções AGG não seja o evento inicial que confere instabilidade. É mais provável que este evento seja a última barreira antes da hiperexpansão (DOMBROWSKI e col., 2002).

O gene FMR1 apresenta dois parálogos autossômicos: FXR1 e FXR2 (SIOMI e col., 1995; ZHANG e col., 1995) mapeados em 12q13 e 17p13.1, respectivamente. Os indivíduos com a SXF que têm déficit ou ausência da proteína FMRP apresentam níveis normais das proteínas codificadas pelos genes FXR1 e FXR2. Além de interagirem entre si, as três proteínas interagem com ribossomos no processo de síntese proteica.

Mutações em FXR1 e FXR2 ainda não foram relatadas, mas considerando a significativa homologia presente, a falta destas proteínas deve resultar em efeitos fenotípicos similares. Teoricamente é possível que indivíduos com o fenótipo da SXF que apresentam o alelo NL do gene FMR1 bem como níveis normais da proteína FMRP possam ter anormalidades no gene FXR1 ou FXR2 (HAGERMAN e CRONISTER, 1996).

O gene FMR1 apresenta também ortólogos altamente conservados em *Mus musculus* (ASHLEY e col., 1993a), *Galus galus* (PRICE e col., 1996), *Drosophyla* sp (WAN e col., 2000). Estudos sobre a expressão destes genes em modelos animais vêm contribuindo para o entendimento das funções da proteína correspondente e suas interações na célula (ZHANG e cols., 2005).

1.3.1. Variantes alélicas.

Além da expansão do trinucleotídeo CGG, a SXF pode mais raramente ter origem em mutações ao longo do gene FMR1, uma vez que a mesma é atribuída à perda de função do gene.

DE BOULLE e col. (1993) descrevem um paciente com fenótipo da SXF devido a uma mutação de novo no códon 367 onde uma substituição T-A converte o códon ATT para AAT. Esta mutação é conhecida como ILE367ASN. Uma substituição similar identificada no códon 304, que resulta em um quadro clínico severo, é conhecida como ILE304ASN (FENG e cols., 1997).

LUGENBEEL e col. (1995) identificaram 2 diferentes mutações intragênicas do tipo perda de função no gene FMR1. No primeiro caso, um paciente jovem com características sugestivas de repetição CGG, os autores detectaram uma deleção (ACT125CT, FS159TER) *de novo* em um único nucleotídeo. A análise da seqüência do mRNA do gene FMR1 revelou a falta de um resíduo de arginina na posição 373 (códon thr125) no éxon 5, resultando em parada prematura de tradução. O segundo caso era o de um paciente adulto que apresentava o fenótipo clínico clássico da SXF, incluindo o macroorquidismo. A seqüência do

éxon 2 revelou uma mudança, de herança materna, de 2 pares de bases levando a um códon de parada (GG-TA na posição 23714-23715 na seqüência genômica).

Em três pacientes não aparentados WANG e col. (1997) encontraram uma transição C-T no nucleotídeo 14 do íntron 10 do gene FMR1 que resultou na remoção total do éxon 10, unindo assim os éxons 9 e 11 durante o processo de transcrição. Esta mutação, conhecida como IVS10+14C-T, resultou em parada na tradução removendo regiões conservadas do gene que codificam os domínios KH2 e o bloco RGG da proteína FMRP. Este último caso é descrito atualmente como um polimorfismo do gene FMR1 e não como uma mutação relacionada a SXF (WANG e LI, 1998).

1.4. A proteína FMRP.

O transcrito gerado pelo gene FMR1 é da ordem de 4.4 Kb (EICHLER e col., 1993). O processamento do mesmo apresenta alternativas em 5 pontos diferentes, o que deve contribuir para sua diversidade funcional (HUANG e col., 1996).

A FIGURA 7 apresenta os 5 sítios de processamento alternativo no gene FMR1. Os mesmos autores ao estudarem neurônios fetais encontraram 11 isoformas da proteína FMRP. De acordo com os pesquisadores, poderiam ser gerados até 24 transcritos maduros diferentes, que por sua vez corresponderiam a um máximo de 20 isoformas da proteína FMRP (HUANG e col., 1996).

É provável que as isoformas de FMRP apresentem especificidade no reconhecimento de diferentes RNAs e nas habilidades de acoplamento da proteína, influenciando no fenótipo pleiotrópico da SXF (HUANG e col., 1996).

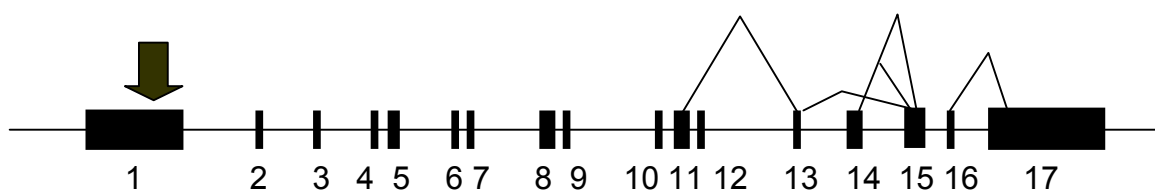


FIGURA 7: Localização dos sítios de processamento alternativo no gene FMR1. A repetição CGG (seta) aparece indicada no primeiro éxon.

A proteína FMRP, de 70-80 kD, encontrada predominantemente no citoplasma (DEVYS e col., 1993; FENG e col., 1995) está presente em todos os neurônios de indivíduos normais estudados, mas ausente (ou presente em pequena quantidade) em células nervosas não neuronais.

Uma alta proporção da proteína foi encontrada em outros tecidos corpóreos de indivíduos normais não envolvidos com o fenótipo da SXF (FENG e col., 1995).

TAMANINI e cols. (1997) encontraram alta expressão da proteína em células germinativas primordiais de fetos e adultos normais. Examinando testículos de fetos e adultos portadores da FM no gene FMR1, os autores também encontraram a proteína. No caso dos fetos, em pequena quantidade, enquanto

nos adultos a expressão normal do gene corrobora com estudos anteriores onde pacientes com a FM nas células somáticas apresentavam apenas a PM no gene FMR1 de suas células germinativas. (REYNIERS e col., 1993; de GRAAFF e col., 1995).

Dois tipos de domínios de acoplamento a RNAs foram identificados em FMRP, incluindo dois domínios KH e um bloco RGG contendo a seqüência conservada *arg gly gly* (OOSTRA e WILLEMSSEN, 2003).

A importância do domínio KH para a função apropriada de FMRP é ilustrada pelo raro e único paciente com a mutação, ILE304ASN, localizada no segundo domínio KH, causando disrupção na estrutura quaternária desta região da proteína (DE BOULLE e col., 1993).

A seqüência de FMRP sugere sua função (SIOMI e col., 1993). Sinais de localização e de exportação nucleares (NLS e NES), domínios de homologia K (KH1 e KH2) e o bloco RGG sugerem que a proteína FMRP deva transitar dentro e fora do núcleo celular além de possuir atividades relacionadas a RNAs diversos, predizendo sobre o fenótipo pleiotrópico da SXF.

Em linhagens celulares humanas FMRP encontra-se associada a polirribossomos e ao retículo endoplasmático rugoso. Há fortes evidências na literatura que suportam a idéia de ser a proteína FMRP importante na tradução de diversos mRNAs. Experimentos *in vitro* mostram que FMRP funciona como agente repressor de tradução de seu próprio mRNA (LAGGERBAUER e col., 2001).

Uma vez que FMRP tem a faculdade de acoplamento a diversos RNAs, a identificação dos mesmos é um pré-requisito para a compreensão de sua função.

Estratégias diferentes apontam para algumas centenas de RNAs alvos, mas a especificidade da interação entre a FMRP e a vasta maioria destes RNAs ainda precisa ser confirmada (OOSTRA E WILLEMSSEN, 2003; CASTETS e col., 2005; POZDNYAKOVA e REGAN, 2005).

1.5. Correlações genótipo-fenótipo

1.5.1. Características físicas

Os homens afetados pela SXF podem exibir uma ampla variedade de características físicas atribuíveis à afecção. Entretanto nenhuma destas características é patognomônica, e nenhuma característica física é encontrada em 100% dos afetados. Além disso, muitas destas se sobrepõem a outras síndromes de deficiência mental, tornando difícil um diagnóstico diferencial meramente baseado no exame físico. A TABELA 1, apresentada ao final desta seção, reúne dados sobre a frequência das principais características clínicas da SXF.

Grande parte das características observadas parece derivar de um defeito no tecido conjuntivo, e neste grupo destacam-se a presença de frontal proeminente, orelhas grandes e proeminentes, palato alto e ogival, hiperextensibilidade das articulações digitais, pele aveludada, pés planos, *pectus excavatum* e prolapso da válvula mitral (HAGERMAN e SYNHORST, 1984, HAGERMAN, 1999).

Em muitos homens com a FM nota-se ainda a face longilínea devida a hipoplasia do osso malar, além de mandíbula proeminente. Notadamente, o

achado mais consistente dentre os homens afetados em idade pós-puberal é o macroorquidismo, presente em 80% dos mesmos, caracterizado por aumento de tecido conjuntivo (colágeno) e edema. Dentre os homens em idade pré-puberal, os testículos aumentados são observáveis em apenas 15% dos casos (HAGERMAN, 1999).

A aparência característica da face se desenvolve durante a infância e adolescência. Na primeira infância o alongamento e proeminência da mandíbula são menos notáveis, e o palato alto pode ser notado. Estudos realizados no final da década de 1970 e início da década de 1980 delinearam a atual caracterização facial dos pacientes afetados pela SXF (O'DONNEL e WARREN, 2002).

Mulheres portadoras da FM que apresentam deficiência mental ocasionalmente manifestam algumas das características faciais exibidas pelos homens afetados, mas em geral suas características físicas permeiam a normalidade (HAGERMAN, 1999).

Algumas mulheres com a PM têm o volume ovariano aumentado, outras apresentam falha ovariana prematura (POF), que resulta em menopausa precoce, isto é, antes dos 40 anos (ALLINGHAM-HAWKINS e col., 1999). Estimativas de POF ocorrentes nas mulheres portadoras de PM são da ordem de 4% aos 30 anos e 25% aos 39 anos de idade (HUNDSCHEID e col., 2000).

TASSONE e col. (2000), analisando linfócitos de 80 indivíduos do sexo masculino portadores de PM, encontraram alterações tanto nos níveis de mRNA como da proteína FMRP. Ao mesmo tempo em que a taxa de produção de RNA mensageiro correspondente encontrava-se elevada, os autores verificaram uma porcentagem baixa da proteína FMRP, quando comparados com indivíduos

normais. Os dados sugerem que a transcrição aumentada seja um modo de compensar a baixa eficiência de tradução, observações ainda em nível especulativo (CASTETS e col., 2005).

Apesar de as propriedades funcionais da FMRP terem sido extensivamente estudadas, seu mecanismo preciso de ação e as vias que levam à deficiência mental são muito pouco explorados. As conseqüências da ausência ou déficit de expressão da proteína FMRP, a localização subcelular das proteínas codificadas pelos RNAs FMRP- dependentes, bem como as correlações com o fenótipo clínico foram estudadas em casos esporádicos (CASTETS e col., 2005).

TABELA 1: Freqüências das características físicas encontradas na SXF adaptado de MERENSTEIN e col. (1996) e HAGERMAN e col.(1996)

| Autor Categoria | Freqüência | | |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------|
| | (1) | | (2) |
| | Homens AP (n=97) | Homens PP (n=64) | Mulheres (*) (dados em %) |
| Orelhas grandes | 25 | 50 | 12,9 |
| Face alongada | 64 | 80 | 46,4 |
| Orelhas proeminentes | 78 | 66 | 56,3 |
| Palato ogival | 51 | 63 | 19,4 |
| Hiperextensibilidade das articulações | 81 | 49 | 62,1 |
| Polegares biarticulados | 58 | 48 | 33,3 |
| Prega palmar única | 26 | 22 | 21,4 |
| Calos nas mãos | 18 | 52 | 3,3 |
| Pés planos | 82 | 60 | 36,7 |
| Macroorquidismo | 54 | 92 | - |

LEGENDA: AP: idade pré-puberal, PP: idade pós-puberal, PM: pré-mutação, FM: mutação completa.; (*): amostra não determinada. (1): MERENSTEIN e col., 1996; (2): HAGERMAN e col., 1996.

1.5.2. Comportamento, Fala e Linguagem na SXF.

Na última década, a comunidade médica começou a reconhecer não apenas os fenótipos físicos e dismórficos, mas também padrões específicos de

comportamento nas síndromes genéticas. Um fenótipo comportamental é definido como um repertório comportamental característico e específico exibido por pacientes portadores de um distúrbio cromossômico ou gênico (PLOMIN, 2001).

O fenótipo comportamental na SXF inclui um razoável número de características, no que tange a cognição, linguagem e aspectos sociais, bem como problemas de conduta e alterações psicopatológicas (FINEGAN, 1998).

Os afetados pela SXF apresentam características comportamentais que incluem: contato visual pobre, estereotípias das mãos, fala perseverante com ecolalia e palilalia, hiperatividade com déficit de atenção, agressividade e muitas características típicas do autismo (NELSON, 1995).

SPINELLI e col. (1992) relatam que a labilidade emocional, ao lado da hiperatividade e pobre contato visual, foram as principais manifestações comportamentais observadas em seu estudo com 10 indivíduos brasileiros portadores da SXF.

As dificuldades na linguagem variam de total ausência de linguagem até dificuldades medianas na comunicação. Um padrão de fala desordenado, onde a fala é rápida, ocasionalmente confusa, repetitiva e desorganizada tem sido observado (PLOMIN e col., 2001).

A habilidade espacial tende a ser mais comprometida que a verbal. A compreensão da linguagem é melhor quando comparada com a expressão da mesma, e é melhor que o esperado com base nos valores individuais de QI (DYKENS, HODAPP e LECKMAN, 1994; HAGERMAN, 1996).

Freqüentemente os pais de crianças afetadas relatam hiperatividade, impulsividade e desatenção de seus filhos (PLOMIN e col., 2001). A maioria destas características persiste na vida adulta (STEVENSON e col., 2000).

No nível cognitivo, poucos estudos têm salientado padrões de déficits entre portadores de PM e, nos poucos trabalhos existentes, são priorizados os estudos em homens com PM (CORNISH e col., 2005). As conseqüências da SXF nas habilidades cognitivas têm sido amplamente observadas (DYKENS e col., 1989, FISCH e col., 1996), porém não significativamente relacionadas a um déficit global, tanto na fala como na linguagem dos pacientes (FISCH e col., 1999).

Um excesso de manifestações depressivas e alterações de humor têm sido observado em diversos trabalhos sobre o tema (THOMPSON e col., 1994, SOBESKY e col., 1994). Os resultados correlacionando tais problemas à análise molecular mostram resultados divergentes (REISS e col., 1993, HULL e HAGERMAN, 1993).

HAGERMAN (1996) sugere o uso de um “índice comportamental” na avaliação de pacientes com hipótese diagnóstica para a SXF, baseado em características como: hábito de bater as mãos, mordida de mãos, contato visual pobre, defesa tátil, linguagem perseverante, hiperatividade, problemas de atenção consistentes com déficit de atenção/ desordem hiperativa (ADHD), episódios violentos, irritabilidade, timidez e fobia social.

Em relação aos sintomas associados com comportamentos ADHD, um trabalho similar no que diz respeito a uma listagem de características e sua importância frente a SXF foi publicado por BARKLEY (1990) fornecendo, inclusive, uma escala gradual de severidade para cada comportamento avaliado.

Além da deficiência mental, muitos afetados pela SXF apresentam deficiência motora e do desenvolvimento da fala (SUTHERLAND e HECHT, 1985; LARGO e col., 1985).

HANSON e col. (1986) avaliaram as características de linguagem de 10 pacientes do sexo masculino portadores da SXF. Os autores observaram um padrão de aquisição de vocabulário relativamente aumentado nestes pacientes quando comparado à fraca memória auditiva e aos padrões de processamento lingüístico. Um padrão de fala característico e distúrbios de linguagem foram observados em 9 dos 10 pacientes. A fala mostrou-se caracterizada por flutuações na taxa e velocidade de diálogo, além de repetição de sons, palavras ou frases. Segundo os autores, os distúrbios de fala podem ser importantes no diagnóstico de pacientes com SXF que não apresentam deficiência mental.

Segundo VILKMAN e col. (1988), a SXF não está necessariamente ligada a alterações anatômicas nos órgãos responsáveis pela fala. Os autores compararam dois meninos com SXF, um com inteligência no limiar da normalidade, e o outro que apresentavam deficiência mental mediana, em uma análise fonológica. Ambos conseguiam produzir os sons do idioma Finlandês em testes de palavras isoladas. Entretanto, nos testes de frases eles exibiram disfonologia geral, e os autores ressaltaram os padrões de erro fonológico serem muito semelhantes entre si. Dentre os padrões citados, estavam presentes tendências em substituir ou omitir fonemas, e os erros de substituição geralmente envolviam as consoantes dentárias.

SUDHALTER (1991) comenta que o desenvolvimento da sintaxe em homens afetados pela SXF é tipicamente atrasado e não apenas desviado. O

mesmo autor, em 1992, comparou 11 pacientes portadores de SXF, com idades entre 6 e 41 anos e idade psicolingüística média de 4 anos e 4 meses, com 11 meninos normais de 4 anos de idade. Aos dois grupos foram aplicados testes de competência semântica. Os indivíduos com SXF produziram mais erros semânticos que as crianças normais. Além disso, as respostas a serem completadas corretamente por uma maior variedade de sinônimos perturbaram os indivíduos com a SXF. Estes resultados sugerem que a semântica é uma área com déficit específico na SXF (SUDHALTER, 1992).

PROUTY e col. (1988) estudaram uma série de aspectos de desenvolvimento em 100 homens e 95 mulheres portadoras de SXF. No campo da linguagem, todos os pacientes apresentaram atrasos significantes e todos, exceto um homem, tinham anormalidades na articulação verbal. Nos casos onde a voz foi gravada e submetida a testes físicos, houve concordância quanto ao padrão de voz e, em 80% dos casos, a voz era de baixa qualidade.

BORGHGRAEF e col. (1987) estudando meninos pré-puberais portadores da SXF, notaram, além de uma severa deficiência global na fala desses pacientes, que no diálogo de pacientes jovens existem características distintas como um ritmo acentuado de fala, impulsividade e fala perseverante.

Uma avaliação fonoaudiológica em 10 pacientes brasileiros com a SXF mostrou em todos os casos alterações relacionadas com a comunicação oral, processos perceptuais, aspectos cognitivos e praxias fonoarticulatórias que se manifestavam em vários graus de severidade (SPINELLI, 1995). Os autores ainda apontaram para a dificuldade dos afetados pela SXF em localizar palavras e para a dispraxia verbal como características intrínsecas ao espectro clínico da SXF.

Dentre os 10 pacientes, 5 encontraram dificuldades em achar vocábulos, que é uma frequência maior que aquela encontrada na dispraxia isolada.

A TABELA 2 resume os principais achados sobre comportamento, fala e linguagem encontrados em pacientes com a SXF, de acordo com diferentes autores.

TABELA 2: Características de comportamento, fala e linguagem encontrados em indivíduos portadores da SXF, segundo diferentes autores.

| | Hegerman e cols. (1996) (*) | Merenstein e col. (1996) (*) | Spinelli e col. (1995) n=10 | Borghgraef e col. (1987) (*) | Nelson (1995) (*) | Plomin e col. (2001) (*) | Prouty e col. (1998) n=195 | Hanson e col. (1996) n=10 |
|--|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Hiperatividade | X | X | X | | X | X | | |
| Fala perseverante | X | X | | X | X | | | |
| Ecolalia | | X | | | X | X | | X |
| Palilalia | | | | | X | X | | X |
| Contato visual pobre | X | X | X | | X | | | |
| Déficit de atenção | X | | | | X | X | | |
| Esteretipias das mãos | X | X | | | X | | | |
| Mordida de mãos | X | X | | | | | | |
| Defensiva táctil | X | X | | | | | | |
| Padrão desordenado de fala | | | | | | X | | X |
| Agressividade | | X | | | X | | | |
| Ansiedade | | X | | | | | | |
| Ataques de pânico | | X | | | | | | |
| Timidez | | X | | | | | | |
| Labilidade emocional | | | | | | | | |
| Padrão de aquisição de vocabulário aumentado | | | X | | | | | X |
| Fraca memória auditiva | | | | | | | | X |
| Baixa qualidade vocal | | | | | | | X | |
| Anormalidades na articulação verbal | | | | | | | X | |
| Dispraxia verbal | | | X | | | | | |
| Comportamento depressivo | X | | | | | | | |
| Ritmo acentuado na fala | | | | X | | | | |

n = indivíduos da amostra.

(*) = amostra não determinada.

1.5.3. Aspectos Neurológicos e Psiquiátricos.

Relatos de convulsões entre portadores da SXF são comuns na literatura (LUBS, 1969, BOWEN e col., 1978; NIELSEN, 1983).

Hipotonia (NIELSEN, 1983), diminuição de reflexos (RHOADS e col., 1982), espasticidade com contraturas (JENNINGS e col., 1980) e coordenação motora pobre (GUSTAVSON e col., 1981) foram sinais adicionais descritos.

Independentemente de seus aspectos genéticos, a SXF tem atraído o interesse de pesquisadores devido a sua possível relação com condições psiquiátricas maiores. Os primeiros relatos de associação entre a SXF e o autismo foram feitos por BROWN e col. (1982a, 1982b).

O autismo, desordem heterogênea de forte influência genética, é definido segundo o critério DSM-IV e inclui: ausência de reciprocidade social, uso anormal de linguagem e comunicação aliados a um repertório restrito de atividades e interesses (APA, 2000).

Dentre os meninos com autismo, 2,5 a 6% são afetados também pela SXF (BROWN e col., 1986, BAILEY e col., 1996, HAGERMAN, 2002). Já os afetados pela SXF, apesar de apresentarem características que se assemelham ao autismo, em sua maioria apresentam interesse em interações sociais e não preenchem os critérios para o diagnóstico de autismo. Um quarto dos pacientes com a SXF preenchem tais critérios (ROGERS e col., 2001, BAILEY e col., 2001) mas não há correlação do autismo com os níveis da proteína FMRP neste tipo de pacientes (BAILEY e col., 2000).

BAILEY e col. (2000) sugerem que a co-ocorrência da SXF com o autismo

deve estar relacionada a fatores genéticos ou ambientais adicionais que poderiam ser aditivos à presença de mutação no gene FMR1. Ainda que a relação entre autismo e a SXF esteja atualmente fora das discussões científicas (FISCH, 1993), é importante identificar as crianças com SXF dentre aquelas diagnosticadas como autistas, para o correto acompanhamento e aconselhamento genético.

Debates sobre o excesso de alterações psiquiátricas em mulheres portadoras da SXF constantemente envolvem questões tais como quando a pressão psicossocial aumentada devido a uma criança com deficiência mental explicaria sentimentos de culpa, repulsa social ou ainda depressões, quando o efeito primário da mutação no gene FMR1 levaria a um efeito secundário na morbidade psiquiátrica, ou ainda quando as desordens psiquiátricas representariam uma consequência primária da PM ou da FM (FRANCKE e cols., 1996; ABBEDUTO e col., 2003; ABBEDUTO, e col., 2004). Altas taxas de desordens depressivas em portadoras obrigatórias de PM no gene FMR1 têm sido relatadas por diferentes autores (FREUND e cols., 1992; THOMPSON e cols., 1994).

Elevadas freqüências (>40%) de desordens momentâneas e achados psicopatológicos (tais como esquizotipia e nível de ajuste de pré-morbidade social diminuído) foram observadas no grupo de mulheres ditas portadoras obrigatórias da SXF, quando comparadas ao grupo de mulheres com a expressão negativa do achado citogenético (FREUND e cols., 1992).

As freqüências de alterações psicopatológicas também foram maiores nas mulheres com herança materna da alteração cromossômica quando comparadas com aquelas que herdaram o sítio frágil paterno (FREUND e cols., 1992).

Estudos incluindo técnicas de biologia molecular em comparação com os achados psiquiátricos ainda apresentam resultados divergentes. Enquanto em alguns relatos as portadoras de PM não diferem do grupo controle no que tange às desordens psiquiátricas (REISS e cols., 1993), outros autores foram capazes de demonstrar que o fenótipo (incluindo algumas manifestações de comportamento) das portadoras de PM difere dos controles e assemelham-se a daquelas com a FM no gene FMR1 (HULL e HAGERMAN 1993).

Os resultados de uma pesquisa similar realizada pela equipe de THOMPSON e cols. (1994) relataram que 75% de portadoras da PM no gene FMR1 avaliadas apresentavam o quadro clínico de depressão profunda, uma frequência maior até que a encontrada no grupo composto por portadoras da FM (60%), apesar de esta diferença não ser estatisticamente significativa.

Em um amplo estudo sobre o perfil psicopatológico de portadoras obrigatórias da PM, FRANCKE e cols. (1996) observaram que estas mulheres apresentam uma frequência aumentada de desordens afetivas quando comparadas a um grupo controle formado por mulheres na população geral. Uma frequência três vezes maior de ansiedade foi encontrada nestas mulheres, inclusive quando comparadas a mães de crianças autistas. No mesmo estudo, notou-se que os parentes destas mulheres apresentavam uma frequência de desordens afetivas da ordem de 20%, comparadas aos 11,7% e 3,3% entre os familiares de mães de autistas e da população geral, respectivamente.

É importante ressaltar que as desordens afetivas ocorrem em aproximadamente 40% das mulheres portadoras da PM no gene FMR1, valor este que é substancialmente maior que o encontrado em mulheres da população em

geral (FRANCKE e cols., 1996).

1.6. A síndrome de tremor/ ataxia associada ao X frágil.

A possibilidade de envolvimento clínico de portadores de PM no gene FMR1 inicialmente foi descartada (HAGERMAN E HAGERMAN, 2004a), mas, recentemente, a descoberta de um fenótipo de início tardio associado a este grupo trouxe novas implicações ao aconselhamento genético.

Inicialmente identificada em 20 a 30% de homens com a PM (HAGERMAN e col., 2001) a síndrome de ataxia/tremor associada ao X frágil (FXTAS) consiste de um tremor progressivo, andar atáxico, parkinsonismo e disfunção do sistema nervoso autônomo (WILLEMSEM e cols., 2003; BERRY-KRAVIS e col., 2003; JACQUEMONT e col., 2003; LEEHEY e col., 2003).

Outras características associadas incluem neuropatia periférica com diminuição da sensibilidade e tremor nas extremidades distais dos membros inferiores, bem como um déficit cognitivo que envolve perda de memória e de funções motoras (HAGERMAN e HAGERMAN, 2004a, 2004c).

Como ocorre na POF, a FXTAS é uma entidade distinta da SXF. Dada a relativa alta prevalência de PM no gene FMR1 na população em geral, estima-se uma prevalência de 30% para a FXTAS dentre os homens portadores da PM (HAGERMAN e HAGERMAN, 2004c; TERRACIANO e cols., 2005).

O achado radiológico mais consistente associado a FXTAS envolve o pedúnculo cerebelar mediano, que apresenta hiperintensidade de sinal em

imagens de ressonância magnética (BRUNBERG e col., 2002). Apesar de o relato original enfatizar os tremores como sintoma principal (HAGERMAN, 2001), estudos posteriores revelaram ser a ataxia mais comum que o tremor. Em relação aos problemas relacionados à disfunção autônoma, estes têm seu aparecimento posterior ao início do tremor/ ataxia (TERRACIANO e cols., 2005).

As mulheres com a PM no gene FMR1 esporadicamente apresentam os achados neurológicos da FXTAS e, quando existentes, aparecem de forma menos severa que em homens com a mesma condição (HAGERMAN e col., 2003).

Na autópsia, o achado mais consistente entre portadores de PM afetados pela FXTAS é a presença de inclusões eosinófilas intranucleares, tanto em neurônios como em astrócitos (GRECO e col. 2002).

Estas inclusões associadas a FXTAS, nunca encontradas em amostras cerebrais de indivíduos com a FM no gene FMR1, foram também detectadas no cérebro de ratos transgênicos com a repetição CGG na faixa de PM (WILLEMSEN e col., 2003). Esta observação suporta a idéia de haver um papel direto da expansão da repetição CGG *per se* e dos elevados níveis de mRNA na formação das inclusões neuronais, confirmando que a FXTAS não é devida ao silenciamento do gene FMR1 e/ou a ausência de FMRP (TERRACIANO e cols., 2005).

HAGERMAN E HAGERMAN (2002) propuseram um efeito tóxico do tipo ganho de função que o mRNA do gene FMR1 em excesso assumiria no aparecimento da FXTAS.

Com novos dados sobre o envolvimento clínicos em portadores de PM, ao avaliar uma família onde há a segregação do cromossomo X frágil, deve-se questionar sobre possíveis alterações neurológicas em todos os indivíduos em risco de portarem a PM (HAGERMAN e HAGERMAN, 2004).

Muitos dos sintomas experimentados por tais indivíduos são passíveis de intervenção psicofarmacológica (JACQUEMONT e col., 2004a). As famílias devem ser orientadas acerca dos riscos de desenvolvimento de distúrbios neurológicos ao final da fase adulta (30% dos homens com a PM com idades acima de 50 anos). Para muitos indivíduos os sintomas neurológicos não aparecem antes dos 70/ 80 anos e tal fato deve estar relacionado a variações alélicas em outros genes que interagem com o mRNA de FMR1 (JACQUEMONT e col., 2004 b).

A TABELA 3 reúne os dados sobre os aspectos psicológicos e neurológicos encontrados em indivíduos com a SXF, compilados de diferentes autores.

TABELA 3: Achados psicológicos e neurológicos relatados em pacientes com a SXF, segundo diferentes autores.

| | Lubs (1969) | Francke e col. (1996) | Reiss e col. (1988) | Freund e col. (1992) | Thompson e col. (1994) | Bowen e col. (1978) | Jennings e col. (1980) | Gustavson e col. (1981) | Nielsen (1983) | Rhoads e col. (1982) |
|-----------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Convulsões | X | | | | | X | | | X | |
| Hipotonia | | | | | | | | | X | |
| Diminuição de reflexos | | | | | | | | | | X |
| Espasticidade | | | | | | | X | | | |
| Contraturas | | | | | | | X | | | |
| Coordenação motora pobre | | | | | | | | X | | |
| Depressão | | | X | X | X | | | | | |
| Desordens afetivas | | X | | | | | | | | |
| Esquizotípicas | | | X | X | X | | | | | |

Objetivos

2. *Objetivos*

2.1. Objetivo principal.

O presente trabalho teve como objetivo principal analisar a segregação do gene FMR1 em uma grande genealogia com 325 indivíduos.

2.1. Objetivos secundários.

2.1.1. Comparar os achados clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares entre os indivíduos afetados da genealogia.

2.1.2. Comparar os achados clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares entre os indivíduos não afetados da genealogia.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Grupo Amostral

A genealogia a que se refere este trabalho foi identificada através do Serviço de Aconselhamento Genético da UNESP, campus de Botucatu/ SP. Os probandos, um casal de gêmeos dizigóticos de sexos diferentes, com mãe falecida no parto, vieram trazidos pela avó materna para avaliação do profundo atraso de desenvolvimento neuro-psico-motor.

A avaliação citogenética dos linfócitos de sangue periféricos dos probandos constatou uma notável expressão do cromossomo X frágil, em condições normais de cultura, isto é, sem o uso de sistemas de indução. A menina apresentou 12% de células com o cromossomo X frágil, e o menino, 20%. Através da avaliação citogenética específica, as contagens foram 17 e 49%, respectivamente.

A partir do levantamento do histórico familiar feito junto à avó materna, tornou-se clara a possibilidade de existirem outros casos de SXF na família. Durante a entrevista a avó dos probandos revelou ainda ser casada com um primo em primeiro grau.

Grande parte dos membros da família residem na região da cidade de Coronel Macedo, SP, com cerca de 5 mil habitantes. Por serem muitos indivíduos, de famílias de baixo nível sócio-econômico com uma grande parte habitando a zona rural da cidade, os pesquisadores envolvidos foram até a cidade de Coronel

Macedo, onde foram feitas as avaliações clínica, fonoaudiológica, psicológica e colhidas amostras de sangue periférico para posterior análise em laboratório.

Dentre os indivíduos pertencentes à família, 106 compareceram para as avaliações genético-clínicas. Os indivíduos foram entrevistados individualmente para a obtenção de dados pessoais e informações adicionais (informações sobre filiação, casamentos, e dados sobre outros parentes falecidos ou ausentes) visando à construção do heredograma completo da família.

O programa computacional PROGENY DESKTOP 6® (PROGENY SOFTWARE, LLC) foi a principal ferramenta utilizada na construção da imagem da genealogia.

Todos os sujeitos foram esclarecidos sobre a pesquisa, e livremente consentiram com a publicação de seus dados.

3.2. Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada pelo mesmo investigador, geneticista clínico do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) (Departamento de Genética, Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu/SP).

As medidas antropométricas (altura, peso, perímetro cefálico, envergadura) de 98 indivíduos da família foram obtidas e cada um foi avaliado sobre a presença/ausência dos 5 principais sinais pertinentes à SXF, a saber:

1. Frontal alto e proeminente;
2. Orelhas grandes e proeminentes;

3. Palato ogival;
4. Hiperextensibilidade das articulações;
5. Dígitos longos.

Todos os sinais foram compilados em protocolos com as marcações de (+) presença, (-) ausência ou (+/-) presença leve do sinal. Foram realizadas fotografias em todos os indivíduos da pesquisa.

A avaliação clínica não pôde ser realizada em 8 indivíduos. Nos casos 50, 59, 60, 63, 71, 91, 94 não houve a colaboração dos mesmos.

A paciente 33, já avaliada anteriormente por nosso grupo (KOBASHI e col., 1999), trata-se de um caso de co-ocorrência de síndrome de Down e SXF. Em nossa avaliação genético-clínica anterior a paciente apresentou o fenótipo clínico típico da síndrome de Down.

A avaliação citogenética do caso 33 revelou a presença de trissomia livre do cromossomo 21 e a avaliação molecular realizada através da técnica de Southern *blotting* utilizando o sistema não radioativo DIG (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS) na marcação da sonda comercial GLFXDig1 revelou a presença da FM no gene FMR1.

De acordo com os objetivos deste trabalho a presença do fâcies típico da síndrome de Down certamente iria interferir na tomada dos sinais clínicos pertinentes à SXF. Deste modo, o diagnóstico clínico da síndrome de Down foi considerado como critério de exclusão do caso 33 para a pesquisa.

O caso 84, não avaliado sob nenhuma das abordagens da pesquisa, refere-se a um indivíduo do sexo feminino não pertencente à genealogia que,

durante a entrevista, revelou não ser aparentada apesar de considerar-se pertencente à família.

3.3. Avaliação psicológica

A avaliação psicológica foi realizada por profissionais convidados do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da UNESP, campus de Botucatu/SP.

Em um primeiro momento foram tomadas as impressões clínicas sobre a capacidade mental de cada indivíduo da pesquisa, através da anotação de (+) presença ou (-) ausência de deficiência mental, sendo considerados (+) os casos onde havia uma forte suspeita clínica.

A avaliação psicológica foi realizada em 65 indivíduos. Em 59 casos a avaliação psicológica foi obtida através dos métodos convencionais. Em seis casos que apresentavam demasiado prejuízo intelectual geral, a avaliação psicológica convencional não pôde ser realizada (casos 02, 07, 11, 12, 13, 107). Estes indivíduos foram categorizados como “portador de deficiência mental, gravidade inespecífica” (DMI).

Os indivíduos não-cooperativos perfazem o grupo que não foi submetido aos testes específicos para a determinação de deficiência mental.

Para a avaliação das habilidades mentais dos 59 indivíduos selecionados, diversificada no tocante ao sexo, idade, nível de escolaridade e limitações físicas associadas, foi preciso recorrer a diversos instrumentos de avaliação psicológica.

Foram aplicados testes para avaliar o nível intelectual dos sujeitos da pesquisa, e os resultados são apresentados em forma de quociente de inteligência total (QI) ou de percentil (P). Ainda, foram utilizadas escalas para avaliar o quociente de desenvolvimento global (QD), de crianças com menos de 4 anos. Os testes usados foram:

- a. Escala de Desenvolvimento Neuropsicomotor de Arnold Gesell;
- b. Escala de Maturidade Mental Columbia (*Columbia mental maturity scale - COLUMBIA*);
- c. Escala Wechsler de Inteligência para Crianças (*Wechsler Intelligence Scale for Children -WISC*);
- d. Teste de Matrizes Progressivas (*Raven's progressive matrices - RAVEN*);
- e. Teste de Inteligência Não Verbal, forma C (INV).

- a. Escala de Desenvolvimento Neuropsicomotor de Arnold Gesell

As crianças com idades inferiores a 4 anos foram avaliadas individualmente, a partir da Escala do Desenvolvimento Neuropsicomotor de Arnold Gesell (GESELL E AMATRUDA, 1987). Com o uso deste instrumento padronizado, composto de estímulos específicos que são oferecidos à criança, foi possível observar a qualidade e integração de seu comportamento em quatro áreas distintas, a saber:

- b. -comportamento motor;
- c. -comportamento adaptativo;

- d. -comportamento de linguagem;
- e. -comportamento pessoal-social.

A partir da relação entre idade real e idade maturacional (derivada do desenvolvimento comportamental) obtivemos o QD, além dos quocientes específicos, correspondentes às quatro áreas de desenvolvimento supracitadas. A normalidade corresponde à equivalência entre idade maturacional e idade cronológica.

Há evidências na literatura que o QD obtido nos primeiros anos de vida corresponde ao QI posterior, especialmente nas crianças com deficiências (ARNAUDE col., 1995; FAZZI e col., 1997). Isto possibilita tratar os resultados em QD e em QI da mesma forma.

b. Escala de Maturidade Mental Columbia (COLUMBIA)

Para a avaliação intelectual de crianças a partir dos 4 anos e até os 12 anos, inclusive, com deficiências mentais ou físicas evidentes, foi utilizado a COLUMBIA. O material, apresentado na forma de 100 cartões, cada qual composto por três a cinco figuras grandes e coloridas, é ordenado por dificuldade crescente.

A criança, individualmente, foi instruída a identificar frente a cada cartão, o desenho que não pertencia ao conjunto. Este é um teste que não exige respostas verbais, devendo a criança em avaliação apenas apontar a sua opção. O

resultado bruto dos acertos é transformado em QI (PORTO e GENTA, 1996; SAETA e SOTO, 1994).

c. Escala Wechsler de Inteligência para Crianças (WISC)

Para as crianças na faixa entre 5 e 12 anos foi aplicado o teste WISC, instrumento largamente utilizado para avaliar as habilidades intelectuais de indivíduos na faixa etária entre 5 e 16 anos, derivado da “Escala Wechsler-Bellevue para adolescentes e adultos” (WECHSLER, 1991). O teste WISC avalia a inteligência através das habilidades verbais e não-verbais.

A aplicação deste teste, individual, exige o uso de tabelas padronizadas construídas especificamente para grupos etários pré-determinados. Com a utilização deste instrumento obtivemos além do QI, o quociente intelectual verbal (QIV) e o quociente de execução (QIE) (PORTO e GENTA, 1996).

d. Teste de Matrizes Progressivas (RAVEN)

Os sujeitos com mais de 12 anos e adultos com ensino fundamental completo foram avaliados através do teste RAVEN que, em tese, não depende de influências culturais nem de linguagem.

Este teste, aplicável para pessoas entre 8 e 65 anos, consiste de 60 desenhos incompletos, onde ao avaliado é solicitado completá-los, descobrindo relações abstratas e apontando no desenho a parte faltante, dentre as alternativas

apresentadas, para avaliação da habilidade individual sobre dados complexos. A habilidade mental determinada por este teste é normalmente correlacionada ao desempenho.

A forma de aplicação neste grupo foi, a princípio, coletiva. Uma vez observada alguma dificuldade na compreensão das instruções ou, ainda, falta de concentração, para estes o teste foi aplicado individualmente. Após consulta às tabelas específicas para grupos etários, obtivemos o resultado em forma de percentil (RAVEN, 1977).

e. Teste de Inteligência Não Verbal, forma C (INV).

Para os indivíduos acima de 60 anos, os analfabetos e aqueles que só haviam cursado as duas primeiras séries do ensino fundamental, foi realizada a avaliação segundo o teste INV. Este teste foi criado para permitir que se avalie a capacidade intelectual geral em diferentes meios culturais, além de abranger as pessoas com pouca ou nenhuma escolaridade, incluindo os analfabetos (SAETA e SOTO, 1994).

O teste INV, bastante semelhante ao RAVEN, mas com menor grau de dificuldade, é composto de um caderno de 5 páginas com desenhos incompletos, e o sujeito tem que escolher o estímulo que completa o desenho, a partir de relações perceptuais e abstratas. Não há limite de tempo para sua execução.

Para a aplicação do teste INV seguimos o mesmo protocolo aplicado ao teste RAVEN, isto é, de aplicação inicial coletiva com a possibilidade de uma

segunda chance, oferecida àqueles que apresentaram dificuldades. Após correção individual com crivo próprio e posterior consulta à tabela de referência, os resultados foram transformados em percentil.

Após a tomada das medidas de inteligência dos indivíduos da pesquisa, os mesmos foram classificados em categorias de acordo com a classificação proposta pelo DSM-IV, de acordo com a ICD-10. A TABELA 4 apresenta a distribuição destas categorias de normalidade e deficiência mental de em relação aos valores de QI e aos percentis de inteligência.

Os valores de QI e percentil foram corrigidos a fim de apresentar a avaliação psicológica categorizada em “normal” (NL), “portador de deficiência mental leve a moderada” (DMM) e “portador de deficiência mental severa a profunda” (DMS) (TABELA 4).

TABELA 4: Distribuição das categorias de normalidade e deficiência mental propostas pelo DSM-IV e pelos manuais dos testes (APA,2000).

| | Normal (NL) | Deficiência leve a moderada (DMM) | Deficiência severa a profunda (DMS) |
|-----------|----------------|--------------------------------------|--|
| QI | > 70 | Entre 35 e 69 | < 34 |
| Percentil | > 24 | Entre 10 e 24 | < 10 |

3.4. Avaliação fonoaudiológica

A avaliação fonoaudiológica foi realizada por profissionais convidados do Departamento de Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências da UNESP, campus de Marília/SP.

A tomada dos dados foi comprometida na pesquisa, considerando o alto número de indivíduos com comprometimento nas habilidades da linguagem oral e com histórico de fracasso e abandono escolar, resultando em analfabetismo. Por esta razão foram selecionados 82 indivíduos para a avaliação fonoaudiológica.

A avaliação fonoaudiológica dos 82 indivíduos foi dividida em duas etapas, a saber: em um primeiro momento os 82 casos foram avaliados clinicamente quanto à linguagem e à fala. Posteriormente uma avaliação complementar foi efetuada a fim de caracterizar as habilidades e dificuldades da linguagem oral e escrita nos indivíduos que apresentaram comprometimento fonoaudiológico revelado na primeira etapa.

3.4.1. Avaliação da Linguagem e da Fala

Quando nos referimos à linguagem estamos abrangendo todas as possibilidades de comunicação. Estamos incluindo, além da fala, gestos, sinais gráficos, escrita e expressões faciais, por exemplo .

Esta parte da avaliação realizada nos 82 casos selecionados foi subdividida em 3 etapas: avaliação da habilidade comunicativa, avaliação da linguagem oral (sintaxe, semântica, fonologia e pragmática) e avaliação da linguagem escrita (leitura oral e escrita).

No que diz respeito ao raciocínio lógico e matemático, o desempenho dos indivíduos foi avaliado mediante situações-problema, para verificar sua capacidade de compreensão, organização e execução de tarefas relacionadas ao cotidiano. Quanto à matemática, foram observadas habilidades envolvendo operações aritméticas apresentadas na forma de problemas orais e escritos.

3.4.2. Avaliação Fonoaudiológica Complementar

Os testes complementares foram utilizados com o objetivo de auxiliar na caracterização e análise estatística das habilidades e dificuldades da linguagem oral e escrita.

Foram aplicados aos 49 indivíduos que apresentaram comprometimento fonoaudiológico na primeira etapa da avaliação, provas e testes padronizados e normatizados para a língua portuguesa que visam à complementação diagnóstica.

Os testes aplicados foram:

- a. Teste Illinois de Habilidades Psicolinguísticas (ITPA) (KIRK e MCCARTHY, 1968; BOGOSSIAN e SANTOS, 1977) e
- b. Teste Token; (DERENZI e VIGNOLO, 1962).

a. Teste Illinois de Habilidades Psicolinguísticas (ITPA)

Embora o teste ITPA seja direcionado para indivíduos com idade cronológica entre 2 anos e 11 meses a 10 anos e 11 meses (BOGOSSIAN e SANTOS, 1977), foi realizada a aplicação do mesmo em indivíduos com idade

cronológica superior, quando a avaliação fonoaudiológica clínica caracterizou comprometimento grave das habilidades da linguagem oral. Este dado foi sugestivo de complementação diagnóstica com este procedimento para melhor determinação da idade psicolingüística de cada indivíduo.

Alguns indivíduos não responderam para este instrumento, sendo assinalado (NR), quando não houve compreensão para executar as ordens solicitadas.

Após a aplicação e contagem dos pontos em cada subteste, foi utilizado o valor da idade psicolingüística composta, por permitir comparação com a idade cronológica do indivíduo.

A idade psicolingüística composta é derivada da soma dos escores brutos de nove subtestes. É considerado um resultado global, tal como a idade mental. Seu valor possibilita classificar e comparar o desempenho global do indivíduo avaliado, mostrando objetivamente se a idade psicolingüística corresponde ou não à idade cronológica. Conseguido após somatório dos escores brutos obtidos dos 9 subtestes (escore global), esse resultado é localizado em tabela específica do manual de utilização do teste (BOGOSSIAN e SANTOS, 1977).

b. Teste Token

O Teste Token foi desenvolvido por DERENZI e VIGNOLO (1962) e tem por objetivo detectar distúrbios da recepção oral em diferentes faixas etárias.

Este teste foi inserido nos procedimentos de avaliação com a finalidade de complementação dos achados da avaliação fonoaudiológica clínica.

O diagnóstico fonoaudiológico para 49 indivíduos foi confirmado a partir da avaliação das habilidades da linguagem e da fala, obtido a partir da avaliação clínica e posteriormente complementado com testes padronizados. Houve caracterização diagnóstica para estes casos que apresentaram alterações identificadas na avaliação clínica, não sendo utilizada a presença de comprometimento em um ou mais testes, como indicador do diagnóstico.

3.5. Análise molecular

A análise do gene FMR1 foi realizada no Laboratório de Genética Humana (LGH) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

No total, 49 mulheres e 37 homens foram avaliados, num total de 86 indivíduos.

Não foram avaliados 09 casos (48, 50, 59, 60, 63, 71, 89, 91, 94) onde não obtivemos a colaboração para a coleta de sangue por parte dos indivíduos ou de seus responsáveis.

Em 7 casos (09, 15, 64, 03, 67, 74, 96) as amostras de DNA foram insuficientes para a realização da análise molecular do gene FMR1.

Em três irmãs da geração VI (casos 101, 102 e 105), a análise molecular não se fez necessária uma vez que os pais das mesmas não apresentavam alterações o gene FMR1 e as três foram consideradas neste trabalho como normais quanto a alterações no gene FMR1

O caso 33, não avaliado, trata-se da paciente com SXF e síndrome de Down.

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, colhido em seringa com EDTA (6%) como anticoagulante, utilizando o *kit* comercial de extração *GenomicPrep Blood Isolation Kit* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®). As quantidades de reagentes utilizadas bem como o protocolo das reações de extração seguiram as especificações do fabricante, com os seguintes passos envolvidos:

- a. Lise seletiva de hemácias, separadas dos linfócitos por gradiente de centrifugação ;
- b. Lise celular (de linfócitos) com uso de detergentes aniônicos capazes de solubilizar os componentes celulares, acompanhado de um limitante de atividade de DNAses, tanto endógenas quanto exógenas a fim de se preservar o DNA;
- c. Precipitação salina de proteínas nucleares e citoplasmáticas;
- d. Precipitação alcoólica de DNA genômico;
- e. Hidratação do DNA, diluído em uma solução tampão contendo um agente preservante de ácidos nucleicos.

A quantificação do DNA de cada amostra foi obtida em espectrofotômetro GENESIS™ 5 (SPECTRONIC®), e a qualidade das amostras de DNA determinada em gel de agarose 1,0 % com adição de brometo de etídeo (1 mg/ 1ml de gel).

A princípio, todas as amostras provenientes dos 41 indivíduos do sexo masculino que tiveram amostras coletadas seguiram para a análise do gene FMR1 através da técnica de PCR seguindo o protocolo descrito por HADDAD e cols. (1996).

Uma vez determinados os indivíduos com a FM no gene FMR1, realizamos a análise através da técnica de Southern blotting nas amostras provenientes das mães e irmãs dos afetados, bem como nos antecessores e parentes em risco das portadoras identificadas.

Utilizando o resultado de um antecessor como critérios de exclusão, a análise molecular do gene FMR1 não se fez necessária em três indivíduos do sexo feminino, uma vez que não estariam em risco de terem herdado o gene alterado segregante nesta família.

3.5.1. Avaliação do gene FMR1 através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*)

As amostras de DNA provenientes dos indivíduos do sexo masculino foram analisadas através da técnica de PCR padronizada para o estudo do gene FMR1 por HADDAD e col. (1996).

Através desta abordagem molecular são estabelecidas condições para contornar os problemas na reação de amplificação de alelos grandes, como no caso do gene FMR1. A combinação de 75% de 7-deaza-dGTP (MCCOLONGUE e

col., 1988), 10% de DMSO e o uso da técnica *hot-start* garantem uma amplificação reproduzível (HADDAD e cols., 1996).

Os alelos do gene FMR1 com a FM podem ser detectados pela falha na amplificação de uma região variável. Um controle interno, uma região genômica rica em CG, utilizado concomitantemente, assegura ser a falha na amplificação o resultado da presença de uma FM, e não o insucesso da abordagem molecular.

Foram utilizados três *primers* a fim de garantir a amplificação do controle interno monomórfico da ordem de 223 pb e o grande fragmento contendo a região variável. A seqüência dos primers utilizados pode ser observada na TABELA 5.

TABELA 5: *Primers* utilizados na reação de PCR (HADDAD e cols., 1996).

| PRIMER | SEQÜÊNCIA |
|--------|--------------------------------------|
| f | 5' agccccgcacttccaccaccagctcctcca 3' |
| Eag-U | 5' cgacctgtcaccgcccttcagccttcc 3' |
| Eag-L | 5' cgctgcgggtgtaaactgaaaccacgtc 3' |

A reação de PCR transcorreu utilizando a técnica de *hot start* em microtubos de polipropileno de 0,2 ml, com volume final da reação de 25 µl. Para tal, todos os reagentes, exceto o DNA e a enzima *Taq* DNA polimerase (Promega Corp.®) foram preparados em uma mistura com 21 µl de volume.

A esta mistura, 2 µl de DNA genômico em concentração de 40 ng/µl foram adicionados para o início do procedimento *hot start*, que consistiu do aquecimento

das amostras a 98°C durante 10 minutos seguida de resfriamento até a temperatura de 72°C, onde os tubos foram mantidos durante 3 a 10 minutos.

As concentrações finais dos reagentes na reação total de 25 µl foram estão apresentadas na TABELA 6 , apresentada a seguir.

TABELA 6: Reagentes utilizados na reação de PCR e suas concentrações finais.

| REAGENTES | CONCENTRAÇÃO FINAL |
|---------------------------|---------------------------|
| Tampão comercial para PCR | 1 X |
| MgCl ₂ | 20 mM |
| DMSO | 10% |
| dATP | 200 µM |
| dCTP | 200 µM |
| dTTP | 200 µM |
| dGTP | 50 µM |
| 7-deaza-dGTP | 150 µM |
| Primer Eag-L | 0.08 µM |
| Primer Eag-U | 0.30 µM |
| Primer f | 0.20 µM |

Aos tubos, ainda no termociclador, foi adicionado 2 µl da enzima *Taq* DNA polimerase, diluída a concentração final de 0,8 U/ µl em tampão comercial para PCR (Promega Corp. ®).

O programa específico para a reação de PCR foi realizado imediatamente, e consistiu de 35 ciclos com 90 segundos de denaturação a 94°C, 60 segundos de anelamento a 65°C e 2 minutos de extensão a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel não denaturante de poliacrilamida a 6%, e corados com nitrato de prata, de acordo com SANTOS e col. (1993).

Nesta análise do gene FMR1 feita por PCR, os resultados em indivíduos normais revelam um alelo na faixa dos valores de referência determinada para os alelos normais do gene FMR1 [banda entre 488 e 632 pares de bases (pb)], além do controle intragênico, conforme pode ser observado na FIGURA 8.

Em indivíduos com a FM no gene FMR1 não é detectado produto de amplificação na faixa dos valores de referência determinada para os alelos normais ou pré-mutados do gene FMR1, porém o fragmento controle intragênico, de 237 pb, é amplificado (FIGURA 8).

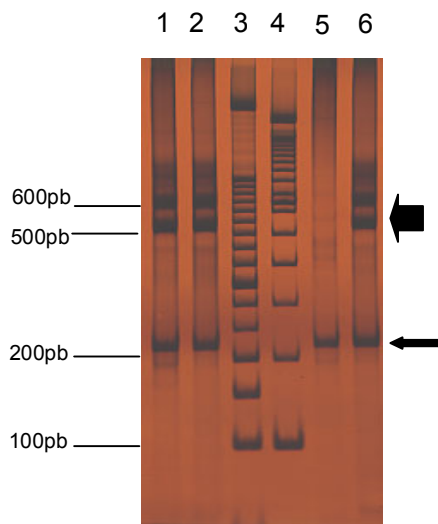


FIGURA 8:

Imagem digitalizada de um segmento de gel de poliacrilamida, exemplificando os resultados obtidos por PCR (segundo HADDAD e cols., 1996). A escala à esquerda da imagem representa os valores de peso molecular. As colunas 3 e 4 representam os marcadores de peso molecular de 50 e 100 pares de bases (pb), respectivamente. As colunas 1, 2 e 6 representam indivíduos com o gene FMR1 normal, a coluna 5 representa um indivíduo com a mutação completa no gene FMR1. A seta pequena indica o controle intragênico (237 pb), e a seta maior indica o valor de referência para alelos normais (valores entre 488 e 632 pb).

3.5.2. Análise do gene FMR1 através da técnica de *Southern blotting*.

A 55 mulheres da genealogia, mães de afetados e mulheres em risco de portarem alterações no gene FMR1, foi aplicada a técnica de detecção direta de DNA (*Southern blotting*) de acordo com o protocolo padronizado por MINGRONI-NETTO e col. (1996).

Foram utilizados 7 μ g de DNA genômico de cada paciente, digeridos seqüencialmente com as enzimas de restrição EcoRI (80 unidades), e EagI (40 unidades). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,7%, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz UV. Os fragmentos de lambda-DNA digerido com HindIII foram separados no mesmo gel, como marcadores de peso molecular para a posterior construção da curva logarítmica (referência para a determinação do peso molecular dos alelos dos indivíduos).

O gel sofreu tratamento químico a fim de denaturar e neutralizar o DNA, sendo este então transferido para uma membrana de nylon®, (Hybond N+, AMERSHAM PHARMACIA) através do efeito mata-borrão (*blotting*), onde foi fixado sob radiação ultravioleta.

A sonda de detecção do gene FMR1 [StB12.3 (gentilmente cedida por François Rousseau)] foi marcada com α -³²P-dATP, através de *kit* comercial (LIFE TECHNOLOGIES) seguindo as recomendações da CNEN (*).

Após a hibridação, feita em forno de hibridação a 65°C por 2 horas, a membrana sofreu lavagens de estringência 2X SSC e então foi exposta a 2 filmes KODAK X-OMAT® a -70°C por um a três dias.

Os resultados obtidos pela técnica de *Southern blotting* podem ser compreendidos da seguinte maneira:

(*) CNEN: Comissão Nacional de Energia Nuclear.

Em homens normais encontramos um fragmento de 2,8kb, resultante da digestão do DNA genômico pelas enzimas de restrição EcoRI e EagI.

Em mulheres normais encontramos fragmentos de 2,8 kb e 5,2 kb do gene FMR1 (FIGURA 9). O fragmento de 2,8kb, produto da digestão do DNA genômico pelas enzimas EcoRI e EagI corresponde ao cromossomo X ativo. O fragmento de 5,2kb é obtido sob as mesmas condições, ou seja, na presença das duas enzimas supracitadas. Este fragmento corresponde ao cromossomo X inativo que é normalmente metilado e perde o sítio de restrição da enzima EagI, logo, o fragmento resultante é produto da digestão da enzima EcoRI, apenas.

Nos indivíduos portadores da pré-mutação ou de mutação completa no gene FMR1, os fragmentos obtidos dependem do tamanho da expansão CGG na extremidade 5' da porção não traduzida do gene FMR1 e da ocorrência de metilação (FIGURA 9).

O alelo do gene FMR1 com a FM será produto da digestão da enzima EcoRI, uma vez que a metilação nos alelos com a FM faz com que a enzima EagI perca seu sítio de restrição. Deste modo, o fragmento resultante será maior que 5,2kb, com seu tamanho determinado através da curva logarítmica construída para o experimento. Em mulheres com a FM, encontramos os fragmentos de 2,8kb e de 5,2kb, e outro maior ainda, correspondendo à FM no gene FMR1 (FIGURA 9).

O procedimento laboratorial foi baseado em SAMBROOK e col. (1989), seguindo recomendações de OOSTRA e col. (1993).

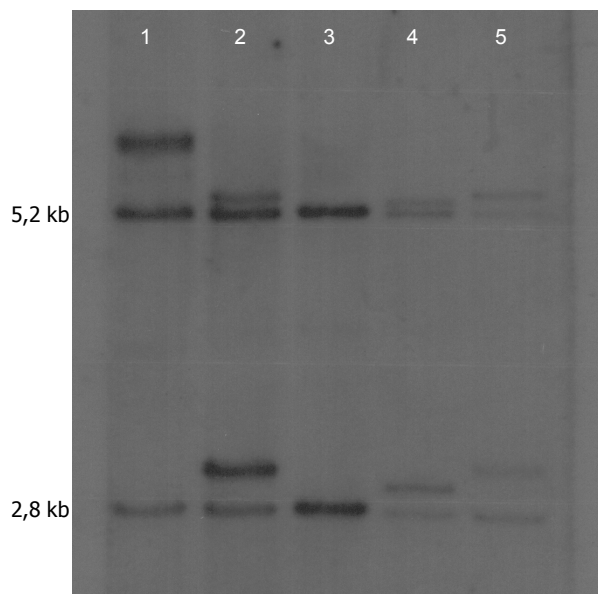


FIGURA 9: Autorradiografia de membrana de nylon® após a hibridação com sonda StB12.3 exemplificando os resultados obtidos segundo a técnica de Southern *blotting*. À esquerda da imagem as localizações dos fragmentos de 2,8 kb e 5,2 kb estão apontadas. A coluna 1 mostra uma mulher com FM no gene FMR1, as colunas 2, 4 e 5 mostram mulheres com a PM no gene FMR1. A coluna 3 apresenta uma mulher com os dois alelos NL.

3.6. Análise Estatística

3.6.1. O teste de proporção χ^2

O teste de proporção χ^2 ao nível de significância de 5% foi realizado para testar a hipótese de ausência de associação de cada sinal avaliado individualmente e a presença de mutações no gene FMR1 (hipótese nula = H_0). Conseqüentemente, a hipótese alternativa (H_1) foi a de associação entre o sinal e a mutação.

Neste tipo de abordagem estatística o número de indivíduos pertencente a cada grupo não deve ser inferior a 20, pois neste caso a hipótese nulitiva torna-se difícil de ser rejeitada. Com esta amostragem ele pode ser utilizado desde que

nos subgrupos não haja um valor menor que 5. Ainda assim, testamos a hipótese considerando qualquer alteração no gene FMR1, o que significou incluir neste grupo os indivíduos com a FM e aqueles com a PM, perfazendo um total de 15 indivíduos.

O teste foi realizado individualmente para cada uma das 5 características clínicas avaliadas (frontal alto e proeminente; orelhas proeminentes; palato alto; dígitos longos e hiperextensibilidade das articulações)

Foram realizadas análises para avaliar a correspondência entre a presença de comprometimento fonoaudiológico e mutações no gene FMR1 bem como para a presença de deficiência mental em relação aos resultados da análise molecular. Os grupos foram divididos de acordo com o sexo e o diagnóstico molecular.

Não avaliamos os indivíduos em relação à idade devido ao pequeno número de afetados pré-púberes (menos de 12 anos), o que formaria um subgrupo de $n = 1$ indivíduo, não permitindo a realização do teste de proporção.

A análise combinada dos dados clínicos, fonoaudiológicos e psicológicos em relação ao resultado da avaliação molecular também não foi possível devido ao fato do pequeno número de indivíduos na amostra que apresentavam alterações no gene FMR1, tanto em número absoluto quanto em relação aos indivíduos normais.

3.6.2. O Teste exato de Fisher.

Devido à dificuldade de rejeição da hipótese nula no teste do qui-quadrado, selecionamos outra abordagem estatística para testar a hipótese de não associação entre a presença dos sinais clínicos e mutações no gene FMR1.

A abordagem selecionada foi o teste exato de Fisher (FISHER, 1922) que avalia as diferenças entre dois grupos independentes (G1 e G2), em relação a uma variável qualquer que só admita duas alternativas como resposta: Sim/Não, Positivo/Negativo, ou +/- . Isso leva à construção de uma tabela de contingência 2 x 2.

Numa tabela de contingência fornece-se a repartição de uma população estatística por dois caracteres qualitativos expressos, cada um, por modalidades exclusivas (um indivíduo da população não pode possuir mais de uma modalidade) e exaustivas (possuirá uma e somente uma modalidade).

O teste funciona basicamente como o teste de proporção χ^2 , entretanto, o qui-quadrado fornece apenas uma estimativa da probabilidade real, estimativa esta que pode não ser muito acurada se houver um grupo amostral pequeno ou um pequeno valor (menor que 5) em uma das células da tabela. Em ambos os casos o qui-quadrado é contra-indicado e o teste de Fisher é a melhor escolha. Ainda assim, em muitos casos opta-se pelo qui-quadrado em função da dificuldade de cálculo gerada pelo teste de Fisher. Em compensação, quando o número de dados da amostra é grande, o teste de Fisher é que não deve ser usado, porque envolve o cálculo de fatoriais, o que pode conduzir a números excessivamente elevados. Nesses casos, a opção deve ser pelo teste do χ^2 .

A fim de avaliar a correspondência entre a presença de cada sinal avaliado (comprometimento fonoaudiológico, deficiência mental e 5 sinais clínicos: frontal alto e proeminente, orelhas proeminentes, palato alto, dígitos longos e hiperextensibilidade das articulações) e a presença de alterações no gene FMR1, realizamos diferentes testes, comparando:

- a) (G1) = indivíduos com a PM X (G2) = indivíduos com o(s) alelo(s) normal(is) do gene FMR1;
- b) (G1) = indivíduos com a FM x (G2) = indivíduos com o(s) alelo(s) normal(is) do gene FMR1.

Considerando a possibilidade de não haver associação entre os sinais clínicos observados e a presença da PM no gene FMR1 obtida no primeiro teste (PM x NL), realizamos um terceiro teste incluindo os indivíduos com a PM no grupo dos indivíduos normais e comparando este novo grupo aos indivíduos com a FM, dado por:

- c) (G1) = indivíduos com a FM x (G2) = indivíduos com o(s) alelo(s) normal(is) do gene FMR1 + indivíduos com a PM.

Nos três casos consideramos como hipótese nula (H_0) a ausência de associação entre a condição clínica avaliada e a presença da alteração no gene. Conseqüentemente, a hipótese alternativa (H_1) foi a de associação entre as variáveis avaliadas.

O programa utilizado para a realização do teste de Fisher, SISA (*), calcula as diferenças entre os dados observados e os dados esperados considerando a marginal dada e o pressuposto de modelo de independência (H_0). A probabilidade calculada será igual ao produto dos fatoriais dos totais marginais pelo fatorial do total geral multiplicado pelo inverso do produto dos fatoriais dos valores observados em cada classe. Como no teste de proporção χ^2 , a análise dos resultados foi realizada ao nível de significância de 5%.

(*) SISA: Simple Interactive Statistical Analysis

3.6.3. A análise fatorial de correspondências múltiplas (AFCM)

A análise fatorial de correspondências múltiplas (BENZECRI, 1960) tem por objetivo possibilitar a identificação de relações entre as unidades de observação, entre as características observadas e entre as unidades de observação e as características simultaneamente.

Um dos objetivos da AFCM é realizar uma tipologia dos indivíduos. Essa tipologia se apóia numa noção de semelhança tal que dois indivíduos serão bastante próximos se possuírem um grande número de modalidades em comum.

A análise de correspondência múltipla permite avaliar a associação entre os níveis (categorias) de três ou mais variáveis qualitativas através da representação destes níveis num sistema de eixos cartesianos, em que cada eixo representa um fator, que é responsável pela explicação de uma certa proporção da informação original dos dados. Nestas representações, pontos próximos indicam categorias fortemente associadas, associação esta que diminui à medida que os pontos se encontram mais afastados.

Através desta análise pudemos observar a correspondência entre as mutações no gene FMR1, sexo, comprometimento fonoaudiológico, deficiência mental e os 5 sinais clínicos observados, que totalizam 9 fatores. Na análise fatorial de correspondência considerando dois fatores (dois eixos), 42,5% da

variabilidade original dos dados é conservada. Considerando três fatores, este valor sobe para 55,6%.

3.6.3.1. A tabela de Burt.

A dimensão da tabela lógica necessária para a análise dos dados da pesquisa, que resume diferentes aspectos da informação obtida, pode ser de dimensão enorme. Desta forma a construção de uma tabela lógica com nossos dados constituiria um instrumento adequado, porém pouco útil sobre o ponto de vista prático. Deste modo a informação foi resumida em duas novas tabelas chamadas tabelas de Burt, que são complementares à análise fatorial de correspondência múltipla.

A tabela de Burt é uma tabela que apresenta o conjunto de tabelas de contingências que podem ser construídas cruzando duas a duas as características observadas. A diagonal da tabela é constituída pela distribuição de freqüências absolutas de todas as modalidades de todas as variáveis qualitativas que as compõem. Ao dividirmos todos os valores da tabela pelo número total de indivíduos observados a tabela apresenta as freqüências relativas.

Podemos adotar diferentes pontos de vista no estudo das variáveis. Em nosso estudo quisemos realizar um inventário das ligações entre as mesmas. O estudo das relações entre duas variáveis qualitativas necessita levar em consideração a tabela cruzada de suas modalidades. Um levantamento pouco detalhado das relações implica, então, em se situar no nível das modalidades, aquém daquele das variáveis.

A noção de semelhança que se estabelece entre as modalidades difere segundo o ponto de vista adotado. No nosso caso, as semelhanças entre duas

modalidades devem repousar sobre sua associação mútua: duas modalidades se assemelham quanto mais elas estiverem presentes, ou ausentes, simultaneamente em um grande número de indivíduos. As outras modalidades não intervirão.

Em nosso estudo construímos duas tabelas de Burt, uma apresentando as freqüências absolutas das modalidades de cada uma das características. A segunda tabela de Burt considera os perfis por linha e nos dá a freqüência percentual da modalidade em relação a seu bloco diagonal.

Em ambos os casos uma linha da Tabela de Burt caracteriza a associação da modalidade com as modalidades de todas as variáveis: duas modalidades se assemelham quanto forte, ou fraca, é sua associação às mesmas modalidades.

Para se obter as tabelas de Burt foi utilizado o software SPAD.N Integrado, versão 2.52 PC, cedido pelo CISIA (*Centre International de Statistique et d'Informatique Appliquées*, França).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Grupo amostral

O grupo amostral avaliado neste trabalho pertence a uma mesma genealogia de 325 indivíduos que está representada no heredograma (FIGURA 10) apresentado ao final deste volume, para facilitar sua visualização e consulta.

Através da análise do heredograma pudemos observar que a origem das alterações no gene FMR1 encontrada nesta genealogia deu-se no indivíduo I-2, e nos cinco casamentos consangüíneos existentes não há o encontro do mesmo cromossomo alterado na geração I. Ainda no heredograma pudemos observar a ocorrência de algumas perdas fetais em núcleos familiares onde há a segregação do gene FMR1 alterado, além de outros óbitos não relacionadas à SXF, provavelmente decorrentes da consangüinidade.

4.2. Avaliação clínica

Os resultados da avaliação clínica encontram-se nas TABELAS 7 e 8, divididas de acordo com o sexo dos indivíduos. A posição correspondente de cada caso junto ao heredograma completo da família está indicada.

A TABELA 9 apresenta as freqüências de cada um dos sinais avaliados na amostra.

TABELA 7: Resultados da avaliação clínica nos indivíduos do sexo feminino

(n= 56).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Frontal proeminente | Orelhas proeminentes | Palato ogival | Dígitos longos | Hiperextensibilidade das articulações |
|------|------------------------|--------------|---------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| 01 | IV-51 | 47 | - | + | - | - | + |
| 04 | III-17 | 68 | + | + | - | - | - |
| 06 | IV-58 | 38 | - | + | + | - | + |
| 07 | IV-64 | 28 | - | - | + | + | + |
| 08 | IV-55 | 42 | - | + | + | - | + |
| 09 | V-59 | 13 | - | - | - | + | + |
| 11 | V-65 | 15 | + | + | + | + | + |
| 15 | III-5 | 53 | - | - | - | - | - |
| 20 | IV-13 | 14 | + | - | + | - | + |
| 22 | III-28 | 62 | - | + | - | - | + |
| 23 | IV-87 | 38 | + | - | - | - | - |
| 24 | V-99 | 17 | - | - | - | - | + |
| 25 | V-100 | 10 | + | - | - | - | - |
| 28 | V-52 | 20 | + | - | - | - | - |
| 29 | III-6 | 56 | - | + | - | - | - |
| 31 | IV-16 | 34 | - | - | - | - | - |
| 32 | IV-20 | 32 | - | + | - | - | - |
| 34 | V-14 | 10 | - | + | + | + | - |
| 35 | V-15 | 9 | - | + | - | - | - |
| 36 | V-12 | 14 | + | + | - | - | - |
| 37 | V-7 | 16 | - | - | - | + | +/- |
| 38 | V-8 | 14 | - | - | - | - | - |
| 42 | V-11 | 6 | +/- | - | + | + | + |
| 43 | V-72 | 40 | + | + | - | +/- | - |
| 47 | V-74 | 36 | - | + | - | - | - |
| 49 | IV-92 | 24 | +/- | + | - | + | + |
| 51 | V-16 | 19 | - | - | - | - | + |
| 52 | V-17 | 16 | - | - | + | - | + |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal – (+/-) presença leve do sinal.

TABELA 7: Resultados da avaliação clínica nos indivíduos do sexo feminino

(Continuação).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Frontal proeminente | Orelhas proeminentes | Palato ogival | Dígitos longos | Hiperextensibilidade das articulações |
|------|------------------------|--------------|---------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| 55 | IV-79 | 42 | - | - | - | - | + |
| 58 | IV-85 | 29 | + | - | - | - | - |
| 61 | V-94 | 15 | + | - | - | - | + |
| 62 | V-87 | 23 | + | - | - | + | - |
| 64 | III-13 | 71 | - | + | - | + | +/- |
| 65 | IV-47 | 33 | + | - | - | + | + |
| 66 | IV-44 | 36 | + | - | - | - | - |
| 70 | V-36 | 14 | - | + | - | + | + |
| 73 | IV-89 | 33 | + | + | - | - | + |
| 75 | V-35 | 11 | +/- | + | - | + | + |
| 76 | V-18 | 17 | - | - | - | - | - |
| 78 | V-23 | 17 | - | - | - | + | + |
| 79 | IV-67 | 40 | + | + | - | - | - |
| 85 | V-80 | 27 | - | - | - | - | + |
| 86 | VI-32 | 5 | - | - | + | + | + |
| 87 | V-78 | 30 | - | + | - | - | + |
| 88 | V-3 | 26 | + | - | - | - | - |
| 89 | VI-9 | 1,83 | + | + | - | - | + |
| 90 | V-2 | 32 | + | - | - | - | - |
| 93 | III-50 | 33 | - | - | - | + | + |
| 95 | IV-2 | 37 | + | + | - | - | - |
| 97 | IV-99 | 7 | + | + | + | + | + |
| 99 | VI-30 | 7 | + | + | - | +/- | + |
| 100 | V-66 | 10 | - | + | + | + | + |
| 101 | VI-1 | 12 | + | - | - | - | - |
| 102 | VI-3 | 9 | - | - | - | + | + |
| 105 | VI-8 | 7 | + | - | + | + | + |
| 106 | VI-31 | 10 | + | - | + | + | + |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal – (+/-) presença leve do sinal.

TABELA 8: Resultados da avaliação clínica nos indivíduos do sexo masculino

(n = 42).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Frontal proeminente | Orelhas proeminentes | Palato ogival | Dígitos longos | Hiperextensibilidade das articulações |
|------|------------------------|--------------|---------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| 02 | V-51 | 22 | + | + | + | + | + |
| 03 | V-54 | 14 | - | - | + | + | - |
| 05 | III-16 | 64 | + | + | + | + | + |
| 10 | V-61 | 17 | - | - | + | - | + |
| 12 | V-62 | 12 | + | + | + | + | + |
| 13 | V-63 | 6 | - | - | + | - | - |
| 14 | IV-59 | 40 | - | - | + | - | - |
| 16 | III-4 | 62 | - | - | - | - | - |
| 17 | IV-11 | 19 | - | - | + | - | - |
| 18 | IV-12 | 17 | + | + | + | + | - |
| 19 | IV-14 | 12 | - | - | - | - | + |
| 21 | III-27 | 66 | - | + | - | - | - |
| 26 | IV-91 | 26 | + | - | - | - | - |
| 27 | IV-90 | 28 | + | + | + | - | + |
| 30 | III-7 | 83 | - | + | - | - | - |
| 39 | V-9 | 9 | + | - | - | - | - |
| 40 | V-10 | 8 | + | + | - | - | - |
| 41 | V-49 | 23 | - | + | + | - | + |
| 44 | IV-68 | 70 | - | + | - | - | - |
| 45 | VI-22 | 5 | - | + | + | + | + |
| 46 | V-75 | 33 | - | + | - | - | - |
| 48 | VI-24 | 0,24 | + | - | NA | - | - |
| 53 | IV-22 | 50 | - | + | - | - | - |
| 54 | IV-78 | 44 | - | - | - | - | - |
| 56 | V-88 | 21 | + | - | - | + | - |
| 57 | IV-84 | 36 | + | - | + | - | + |
| 67 | IV-33 | 47 | + | + | - | + | - |
| 68 | IV-48 | 29 | - | + | - | - | - |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal – (+/-) presença leve do sinal - NA: não avaliado.

TABELA 8: Resultados da avaliação clínica nos indivíduos do sexo masculino

(Continuação).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Frontal proeminente | Orelhas proeminentes | Palato ogival | Dígitos longos | Hiperextensibilidade das articulações |
|------|------------------------|--------------|---------------------|----------------------|---------------|----------------|---------------------------------------|
| 69 | V-108 | 12 | + | + | - | + | - |
| 72 | V-37 | 10 | + | - | +/- | + | + |
| 74 | V-19 | 23 | - | - | + | - | - |
| 77 | V-22 | 20 | + | - | - | + | - |
| 80 | V-60 | 19 | - | - | - | + | - |
| 81 | V-81 | 59 | - | - | - | - | - |
| 82 | IV-5 | 55 | - | + | - | - | - |
| 83 | IV-69 | 78 | + | + | - | - | - |
| 92 | VI-4 | 7 | + | + | - | - | - |
| 96 | IV-1 | 44 | + | + | - | - | - |
| 98 | VI-29 | 9 | + | + | - | - | + |
| 103 | VI-6 | 9 | + | + | - | - | - |
| 104 | VI-7 | 8 | + | - | + | + | + |
| 107 | V-64 | 15 | + | + | + | + | + |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal – (+/-) presença leve do sinal.

TABELA 9: Frequência dos achados clínicos nos indivíduos da genealogia.

| Sinais clínicos | Frequência | | |
|---------------------------------------|------------|----------|--------|
| | Homens | Mulheres | Total |
| Frontal proeminente | 22/ 42 | 27/ 56 | 49/ 98 |
| Orelhas proeminentes | 23/ 42 | 25/ 56 | 48/ 98 |
| Palato ogival | 17/ 41 | 13/56 | 30/ 97 |
| Dígitos longos | 14/ 42 | 22/56 | 36/ 98 |
| Hiperextensibilidade das articulações | 13/ 42 | 33/56 | 46/ 98 |

4.3. Avaliação Psicológica

Cada indivíduo selecionado recebeu o teste apropriado para sua faixa etária e escolaridade. Os resultados foram obtidos sob a forma de quociente intelectual (QI), quociente de desenvolvimento (QD) e percentis de inteligência.

Dentre os 65 indivíduos avaliados, 18 apresentaram alguma forma de deficiência mental, e os resultados individuais da avaliação psicológica estão apresentados nas TABELAS 10 e 11, separados de acordo com o sexo dos indivíduos. A TABELA 12 apresenta as freqüências dos níveis de inteligência observados na amostra.

TABELA 10: Resultados da avaliação psicológica nos indivíduos do sexo feminino (n = 39).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Avaliação psicológica | Instrumento de aplicação | Resultado (QI ou percentil "p") | Nível de inteligência |
|------|------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 01 | IV-51 | 47 | + | INV | P 10 | DMM |
| 06 | IV-58 | 38 | + | INV | P 25 | NL |
| 07 | IV-64 | 28 | - | (*) | | DMI |
| 08 | IV-55 | 42 | + | INV | P 30 | NL |
| 11 | V-65 | 15 | - | (*) | | DMI |
| 20 | IV-13 | 14 | + | WISC | P 88 | NL |
| 23 | IV-87 | 38 | + | INV | P 30 | NL |
| 24 | V-99 | 17 | + | RAVEN | P 5 | DMS |
| 28 | V-52 | 20 | + | RAVEN | P 5 | DMS |
| 29 | III-6 | 56 | + | INV | P 40 | NL |
| 31 | IV-16 | 34 | + | INV | P 50 | NL |
| 32 | IV-20 | 32 | + | INV | P 60 | NL |
| 34 | V-14 | 10 | + | WISC | QI 78 | NL |

Legenda: (+) avaliação realizada - (-) avaliação não realizada - NL: normal - DMM: deficiência mental leve a moderada - DMS: deficiência mental severa a profunda - DMI: deficiência mental de gravidade inespecificada - (*) impressão do avaliador/psicólogo.

TABELA 10: Resultados da avaliação psicológica nos indivíduos do sexo feminino
(Continuação).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Avaliação psicológica | Instrumento de aplicação | Resultado (QI ou percentil “p”) | Nível de inteligência |
|------|------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 35 | V-15 | 9 | + | WISC | QI 78 | NL |
| 36 | V-12 | 14 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 37 | V-7 | 16 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 38 | V-8 | 14 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 42 | V-11 | 6 | + | WISC | QI 85 | NL |
| 49 | IV-92 | 24 | + | INV | P 40 | NL |
| 51 | V-16 | 19 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 52 | V-17 | 16 | + | RAVEN | P 5 | DMS |
| 55 | IV-79 | 42 | + | INV | P 30 | NL |
| 58 | IV-85 | 29 | + | WISC | 83 | NL |
| 61 | V-94 | 15 | + | RAVEN | P 75 | NL |
| 62 | V-87 | 23 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 65 | IV-47 | 33 | + | INV | P 80 | NL |
| 70 | V-36 | 14 | + | WISC | QI 89 | NL |
| 73 | IV-89 | 33 | + | COLUMBIA | QI 34 | DMM |
| 75 | V-35 | 11 | + | WISC | QI 112 | NL |
| 85 | V-80 | 27 | + | INV | P 10 | DMS |
| 87 | V-78 | 30 | + | INV | P 60 | NL |
| 88 | V-3 | 26 | + | INV | P 50 | NL |
| 90 | V-2 | 32 | + | INV | P 30 | NL |
| 95 | IV-2 | 37 | + | INV | P 40 | NL |
| 97 | IV-99 | 7 | + | WISC | QI 80 | NL |
| 99 | VI-30 | 7 | + | WISC | QI 61 | NL |
| 100 | V-66 | 10 | + | COLUMBIA | P 50 | NL |
| 105 | VI-8 | 7 | + | WISC | QI 66 | NL |
| 106 | VI-31 | 10 | + | COLUMBIA | P 25 | NL |

Legenda: (+) avaliação realizada - (-) avaliação não realizada - NL: normal - DMM: deficiência mental leve a moderada - DMS: deficiência mental severa a profunda – DMI: deficiência mental de gravidade inespecificada - (*) impressão do avaliador/psicólogo.

TABELA 11: Resultados da avaliação psicológica nos indivíduos do sexo masculino (n = 25).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Avaliação psicológica | Instrumento de aplicação | Resultado (QI ou percentil “p”) | Nível de inteligência |
|------|------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 02 | V-51 | 22 | - | (*) | | DMI |
| 03 | V-54 | 14 | + | RAVEN | P 10 | DMS |
| 10 | V-61 | 17 | + | RAVEN | P 75 | NL |
| 12 | V-62 | 12 | - | (*) | | DMI |
| 13 | V-63 | 6 | - | (*) | | DMI |
| 17 | IV-11 | 19 | + | INV | P 50 | NL |
| 18 | IV-12 | 17 | + | COLUMBIA | QI 45 | DMM |
| 19 | IV-14 | 12 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 26 | IV-91 | 26 | + | INV | P 80 | NL |
| 27 | IV-90 | 28 | + | INV | P 60 | NL |
| 40 | V-10 | 8 | + | WISC | QI 51 | DMM |
| 41 | V-49 | 23 | + | RAVEN | P 5 | DMS |
| 56 | V-88 | 21 | + | RAVEN | P 50 | NL |
| 57 | IV-84 | 36 | + | INV | P 70 | NL |
| 67 | IV-33 | 47 | + | INV | P 75 | NL |
| 69 | V-108 | 12 | + | WISC | QI 141 | NL |
| 72 | V-37 | 10 | + | WISC | QI 81 | NL |
| 74 | V-19 | 23 | + | INV | P 20 | DMM |
| 77 | V-22 | 20 | + | RAVEN | P 50-75 | NL |
| 80 | V-60 | 19 | + | RAVEN | P 40 | NL |
| 92 | VI-4 | 7 | + | WISC | QI 136 | NL |
| 98 | VI-29 | 9 | + | WISC | QI 41 | DMM |
| 103 | VI-6 | 9 | + | WISC | QI 83 | NL |
| 104 | VI-7 | 8 | + | WISC | QI 72 | NL |
| 107 | V-64 | 15 | - | (*) | | DMI |

Legenda: (+) avaliação realizada - (-) avaliação não realizada - NL: normal - DMM: deficiência mental leve a moderada - DMS: deficiência mental severa a profunda – DMI: deficiência mental de gravidade inespecificada - (*) impressão do avaliador/psicólogo.

TABELA 12: Freqüência dos níveis de inteligência determinados através da avaliação psicológica nos indivíduos da genealogia.

| Níveis de Inteligência | Freqüência | | |
|------------------------|------------|----------|--------|
| | Homens | Mulheres | Total |
| Normal | 15/ 25 | 31/ 39 | 46/ 64 |
| DMM | 04/ 25 | 02/ 39 | 06/ 64 |
| DMS | 02/ 25 | 04/ 39 | 06/ 64 |
| DMI | 04/ 25 | 02/ 39 | 06/ 64 |
| TOTAL DM | 10/ 25 | 08/ 39 | 18/ 64 |

Legenda: DMM: deficiência mental leve a moderada - DMS: deficiência mental severa a profunda – DMI: deficiência mental de gravidade inespecificada – DM: deficiência mental.

Os resultados obtidos nos casos 99 e 105 encontram-se na categoria de DMM. Porém, por encontrarem-se na zona limítrofe entre esta categoria e a de normalidade, os resultados estão apresentados como normalidade intelectual.

Os casos 28 (sexo feminino, 20 anos) e 41(sexo masculino, 23 anos) tratam-se de dois irmãos, filhos de um casal não consangüíneo. Apesar de seu baixo desempenho nos testes psicológicos, ambos apresentaram o alelo NL do gene FMR1. No caso 28 os testes realizados nos forneceram indícios de imaturidade neurológica. Deste modo, no caso 28, o baixo desempenho nos testes de habilidades intelectuais pode ser indicativo de um provável distúrbio neurológico. No caso 41 o indivíduo não apresentou comprometimento fonoaudiológico e os testes indicaram boa maturidade neurológica. O indivíduo apresentou boa compreensão, começando bem os testes e decaindo ao final. A

princípio, o baixo desempenho nos testes foi resultado da falta de interesse em realizá-lo.

O caso 24 (sexo feminino, 17 anos) não apresentou sinais sugestivos para a SXF durante a avaliação clínica. A avaliação molecular revelou o gene FMR1 normal, mas durante a avaliação psicológica observamos um baixo desempenho geral. O indivíduo lia bem, aqui cabe ressaltar que não apresentou comprometimento fonoaudiológico, porém pudemos verificar em testes específicos um padrão de inversão de figuras, nos sugerindo imaturidade neurológica como possível causa de sua baixa pontuação nos testes psicológicos.

No caso 40 (sexo masculino, 8 anos) trata-se de uma criança com distúrbio neurológico. De acordo com seu histórico pessoal pudemos constatar que esta criança foi considerada pequena ao nascer e começou a andar com 1 ano e 8 meses de vida. Durante a entrevista nos foi relatado pela mãe que a criança tem comportamento agressivo, é hiperativo e tem dificuldades na escola. A avaliação fonoaudiológica constatou distúrbio de linguagem e a DM foi caracterizada na avaliação psicológica.

O caso 52 (sexo feminino, 16 anos) apresentou comprometimento fonoaudiológico e baixo desempenho nos testes psicológicos. A própria paciente refere ter problemas na escola, especialmente em matemática. Os testes psicológicos indicaram boa maturidade neurológica, porém identificamos uma leve dificuldade de compreensão que, associada à evidente ansiedade levaram ao baixo desempenho final nos testes de habilidades intelectuais.

Dificuldade de compreensão e referência do paciente em relação à matemática também foram observadas no caso 73 (sexo feminino, 33 anos).

Neste caso, ainda, a paciente relatou consumo de álcool. Acreditamos ser a dificuldade de compreensão acerca dos comandos dos testes a causa de seu baixo desempenho.

O caso 85 (sexo feminino, 27 anos) trata-se de uma mulher analfabeta, não interessada por escola ou assuntos relacionados e que revelou fazer consumo freqüente de álcool. Não pudemos identificar a causa específica de seu baixo desempenho nos testes psicológicos.

O baixo desempenho nos testes de habilidades intelectuais observado no caso 98 (sexo masculino, 9 anos) foi resultado da não colaboração no indivíduo, uma criança hiperativa que não quis terminar o teste. Durante a avaliação fonoaudiológica pudemos verificar o distúrbio de aprendizagem e disfonia neste caso.

3.4. Avaliação fonoaudiológica

Cada sujeito da pesquisa selecionado para a avaliação fonoaudiológica recebeu o teste apropriado para sua faixa etária e escolaridade. Nem todos os indivíduos responderam aos testes, e os resultados obtidos estão apresentados nas TABELAS 13 e 14, de acordo com a presença ou ausência de comprometimento fonoaudiológico. A TABELA 15 mostra as freqüências das alterações fonoaudiológicas identificadas na genealogia.

Dentre os 82 indivíduos que responderam aos testes, 49 apresentaram comprometimento fonoaudiológico. As TABELAS 13 e 14 indicam o diagnóstico fonoaudiológico determinado para cada indivíduo. Em 6 mulheres (casos 01, 29,

36, 86, 99 e 105) e 3 homens (casos 27, 98 e 107) os indivíduos apresentaram dois tipos diferentes de alteração fonoaudiológica. A TABELA 15 apresenta estes casos em separado, razão pela qual o numero total de diagnóstico difere do numero de indivíduos avaliados.

TABELA 13: Resultados da avaliação fonoaudiológica nos indivíduos do sexo feminino (n = 48).

| Caso | Posição | Idade (anos) | Comprometimento Fonoaudiológico | Diagnóstico | ITPA (anos) |
|------|---------|-----------------|------------------------------------|------------------------------|----------------|
| 01 | IV-51 | 47 | + | Dist. de Aprendizagem e Fala | NA |
| 04 | III-17 | 68 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 06 | IV-58 | 38 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 07 | IV-64 | 28 | + | Dist. de Linguagem | 1,91 |
| 08 | IV-55 | 42 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 09 | V-59 | 13 | - | NL | NA |
| 11 | V-65 | 15 | + | Dist. de Linguagem | 2,58 |
| 20 | IV-13 | 14 | + | Dist. de Fala | NA |
| 22 | III-28 | 62 | - | NL | NA |
| 23 | IV-87 | 38 | - | NL | NA |
| 24 | V-99 | 17 | - | NL | NA |
| 25 | V-100 | 10 | + | Dist. de Aprendizagem | 5,58 |
| 28 | V-52 | 20 | - | NL | NA |
| 29 | III-6 | 56 | + | Dist. de Aprendizagem e Fala | NA |
| 31 | IV-16 | 34 | - | NL | NA |
| 32 | IV-20 | 32 | - | NL | NA |
| 34 | V-14 | 10 | + | Dist. de Aprendizagem | 8,66 |
| 35 | V-15 | 9 | + | Dist. de Aprendizagem | 2,16 |
| 36 | V-12 | 14 | + | Dist. de Leitura e Escrita | 6,25 |
| 37 | V-7 | 16 | - | NL | NA |
| 38 | V-8 | 14 | + | Dist. de Aprendizagem | 7,25 |
| 42 | V-11 | 6 | + | Dist. de Linguagem | 4,33 |
| 49 | IV-92 | 24 | - | NL | NA |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal- NA: avaliação não realizada - NL: normal - Dist: distúrbio.

TABELA 13: Resultados da avaliação fonoaudiológica nos indivíduos do sexo feminino (Continuação).

| Caso | Posição | Idade (anos) | Comprometimento Fonoaudiológico | Diagnóstico | ITPA (anos) |
|------|---------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|
| 51 | V-16 | 19 | - | NL | NA |
| 52 | V-17 | 16 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 55 | IV-79 | 42 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 61 | V-94 | 15 | + | Dist. de Aprendizagem | 8,58 |
| 62 | V-87 | 23 | - | NL | NA |
| 64 | III-13 | 71 | - | NL | NA |
| 65 | IV-47 | 33 | - | NL | NA |
| 66 | IV-44 | 36 | - | NL | NA |
| 70 | V-36 | 14 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 73 | IV-89 | 33 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 75 | V-35 | 11 | - | NL | NA |
| 76 | V-18 | 17 | - | NL | NA |
| 78 | V-23 | 17 | - | NL | NA |
| 85 | V-80 | 27 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 86 | VI-32 | 5 | + | Disfonia e Dist. de Linguagem | NA |
| 87 | V-78 | 30 | - | NL | NA |
| 90 | V-2 | 32 | - | NL | NA |
| 94 | IV-98 | 5 | + | Dist. de Linguagem | 3,16 |
| 95 | IV-2 | 37 | - | NL | NA |
| 97 | IV-99 | 7 | + | Dist. de Aprendizagem | 4,5 |
| 99 | VI-30 | 7 | + | Disfonia e Dist. de Aprendizagem | 5,41 |
| 100 | V-66 | 10 | + | Apraxia de Fala do Desenvolvimento | 9,16 |
| 101 | VI-1 | 12 | - | NL | 8,08 |
| 105 | VI-8 | 7 | + | Disfonia e Dist. de Aprendizagem | 4,08 |
| 106 | VI-31 | 10 | + | Dist. de Aprendizagem | 6,25 |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal- NA: avaliação não realizada - NL: normal - Dist: distúrbio.

TABELA 14: Resultados da avaliação fonoaudiológica nos indivíduos do sexo masculino (n = 34).

| Caso | Posição | Idade (anos) | Comprometimento Fonoaudiológico | Diagnóstico | ITPA (anos) |
|------|---------|--------------|---------------------------------|----------------------------|-------------|
| 02 | V-51 | 22 | + | Dist. de Linguagem | NA |
| 03 | V-54 | 14 | + | Dist. de Aprendizagem | 7,25 |
| 10 | V-61 | 17 | - | NL | NA |
| 12 | V-62 | 12 | + | Dist. de Linguagem | 1,91 |
| 13 | V-63 | 6 | + | Dist. de Linguagem | 2,08 |
| 14 | IV-59 | 40 | - | NL | NA |
| 16 | III-4 | 62 | - | NL | NA |
| 17 | IV-11 | 19 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 18 | IV-12 | 17 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 19 | IV-14 | 12 | - | NL | NA |
| 21 | III-27 | 66 | - | NL | NA |
| 26 | IV-91 | 26 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 27 | IV-90 | 28 | + | Dist. de Leitura e Escrita | NA |
| 39 | V-9 | 9 | + | Dist. de Aprendizagem | 4,33 |
| 40 | V-10 | 8 | + | Dist. de Aprendizagem | 2,66 |
| 41 | V-49 | 23 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 45 | VI-22 | 5 | + | Dist. de Aprendizagem | 1,91 |
| 50 | V-110 | 4,5 | + | Dist. de Linguagem | 3,0 |
| 56 | V-88 | 21 | - | NL | NA |
| 57 | IV-84 | 36 | - | NL | NA |
| 59 | V-98 | 4 | + | Dist. de Linguagem | 1,91 |
| 60 | V-96 | 7 | + | Dist. de Aprendizagem | 1,91 |
| 67 | IV-33 | 47 | - | NL | NA |
| 69 | V-108 | 12 | - | NL | NA |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal- NA: avaliação não realizada - NL: normal- Dist: distúrbio.

TABELA 14: Resultados da avaliação fonoaudiológica nos indivíduos do sexo masculino (Continuação).

| Caso | Posição | Idade (anos) | Comprometimento Fonoaudiológico | Diagnóstico | ITPA (anos) |
|------|---------|--------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------|
| 72 | V-37 | 10 | + | Dist. de Aprendizagem | 4,08 |
| 74 | V-19 | 23 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 77 | V-22 | 20 | - | NL | NA |
| 80 | V-60 | 19 | - | NL | NA |
| 82 | IV-5 | 55 | + | Dist. de Aprendizagem | NA |
| 83 | IV-69 | 78 | - | NL | NA |
| 98 | VI-29 | 9 | + | Disfonia e Dist. de Aprendizagem | 6,08 |
| 103 | VI-6 | 9 | - | NL | 7,66 |
| 104 | VI-7 | 8 | + | Dist. de Aprendizagem | 5,58 |
| 107 | V-64 | 15 | + | Disfagia e Dist. De Linguagem | NA |

Legenda: (+) presença do sinal - (-) ausência do sinal- NA: avaliação não realizada - NL: normal - Dist: distúrbio.

TABELA 15: Freqüência das alterações fonoaudiológicas identificadas entre os 34 homens e as 48 mulheres da genealogia que foram submetidos a avaliação fonoaudiológica.

| Diagnóstico fonoaudiológico | Freqüência | | |
|------------------------------------|------------|----------|--------|
| | Homens | Mulheres | Total |
| Distúrbio de aprendizagem | 14/ 34 | 19/ 48 | 33/ 82 |
| Distúrbio de linguagem | 06/ 34 | 05/ 48 | 11/ 82 |
| Distúrbio de fala | 00/ 34 | 03/ 48 | 03/ 82 |
| Distúrbio de leitura | 01/ 34 | 01/ 48 | 02/ 82 |
| Distúrbio de escrita | 01/ 34 | 01/ 48 | 02/ 82 |
| Apraxia de fala do desenvolvimento | 00/ 34 | 01/ 48 | 01/ 82 |
| Disfagia | 01/ 34 | 00/ 48 | 01/ 82 |
| Disfonia | 01/ 34 | 03/ 48 | 04/ 82 |
| Normal | 13/ 34 | 21/ 48 | 34/ 82 |
| Total de diagnósticos obtidos | 37/ 34 | 54/ 48 | 91/ 81 |

O comprometimento fonoaudiológico pôde ser observado em 49 indivíduos da família. Dentre os indivíduos portadores da FM, o distúrbio de linguagem foi observado nas duas mulheres com a FM e em 4 dos 6 homens com a FM. Os outros dois homens com a FM apresentaram distúrbio de aprendizagem.

As avaliações psicológica e fonoaudiológica do caso 17, combinadas, revelaram o perfil de um indivíduo com dificuldades em habilidades específicas como a abstração, em contraste com o bom desempenho na leitura.

Dentre as 7 mulheres portadoras da PM, 6 apresentaram comprometimento fonoaudiológico. Neste grupo encontramos 3 casos de distúrbio de aprendizagem e um de distúrbio de fala. Em 2 casos as pacientes apresentaram distúrbio de aprendizagem e de fala.

Distúrbio de leitura e escrita, apraxia de fala do desenvolvimento e disfonia foram identificados apenas nos indivíduos que não apresentaram mutações no gene FMR1.

O estudo aprofundado das correlações entre os diagnósticos encontrados nos indivíduos da família e as mutações no gene FMR1 foge do escopo desta pesquisa e será realizado em trabalhos futuros.

4.5. Avaliação molecular

Os resultados da análise molecular dos indivíduos da pesquisa são apresentados, caso a caso, nas TABELAS 16 e 17. A TABELA 18 apresenta os casos agrupados por diagnóstico molecular.

TABELA 16: Resultados da avaliação molecular nos indivíduos do sexo feminino (n = 52).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Gene FMR1 |
|------|------------------------|--------------|-----------|
| 01 | IV-51 | 47 | PM |
| 04 | III-17 | 68 | PM |
| 06 | IV-58 | 38 | PM |
| 07 | IV-64 | 28 | FM |
| 08 | IV-55 | 42 | PM |
| 11 | V-65 | 15 | FM |
| 20 | IV-13 | 14 | PM |
| 22 | III-28 | 62 | NL |
| 23 | IV-87 | 38 | NL |
| 24 | V-99 | 17 | NL |
| 25 | V-100 | 10 | NL |
| 28 | V-52 | 20 | NL |
| 29 | III-6 | 56 | PM |
| 31 | IV-16 | 34 | NL |
| 32 | IV-20 | 32 | NL |
| 34 | V-14 | 10 | NL |
| 35 | V-15 | 9 | NL |
| 36 | V-12 | 14 | NL |
| 37 | V-7 | 16 | NL |
| 38 | V-8 | 14 | NL |
| 42 | V-11 | 6 | NL |
| 43 | V-72 | 40 | NL |
| 47 | V-74 | 36 | NL |
| 49 | IV-92 | 24 | NL |
| 51 | V-16 | 19 | NL |

Legenda: FM: mutação completa - PM: pré-mutação - NL: normal.

TABELA 16: Resultados da avaliação molecular nos indivíduos do sexo feminino (Continuação).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Gene FMR1 |
|------|------------------------|--------------|-----------|
| 52 | V-17 | 16 | NL |
| 55 | IV-79 | 42 | NL |
| 58 | IV-85 | 29 | NL |
| 61 | V-94 | 15 | NL |
| 62 | V-87 | 23 | NL |
| 65 | IV-47 | 33 | NL |
| 66 | IV-44 | 36 | NL |
| 70 | V-36 | 14 | NL |
| 73 | IV-89 | 33 | NL |
| 75 | V-35 | 11 | NL |
| 76 | V-18 | 17 | NL |
| 78 | V-23 | 17 | NL |
| 79 | IV-67 | 40 | NL |
| 85 | V-80 | 27 | NL |
| 86 | VI-32 | 5 | NL |
| 87 | V-78 | 30 | NL |
| 88 | V-3 | 26 | NL |
| 90 | V-2 | 32 | NL |
| 93 | III-50 | 33 | NL |
| 95 | IV-2 | 37 | PM |
| 97 | IV-99 | 7 | NL |
| 99 | VI-30 | 7 | NL |
| 100 | V-66 | 10 | NL |
| 101 | VI-1 | 12 | NL |
| 102 | VI-3 | 9 | NL |
| 105 | VI-8 | 7 | NL |
| 106 | VI-31 | 10 | NL |

Legenda: FM: mutação completa - PM: pré-mutação - NL: normal.

TABELA 17: Resultados da avaliação molecular nos indivíduos do sexo masculino (n = 37).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Gene FMR1 |
|------|------------------------|--------------|-----------|
| 02 | V-51 | 22 | FM |
| 05 | III-16 | 64 | NL |
| 10 | V-61 | 17 | NL |
| 12 | V-62 | 12 | FM |
| 13 | V-63 | 6 | FM |
| 14 | IV-59 | 40 | NL |
| 16 | III-4 | 62 | NL |
| 17 | IV-11 | 19 | FM |
| 18 | IV-12 | 17 | FM |
| 19 | IV-14 | 12 | NL |
| 21 | III-27 | 66 | NL |
| 26 | IV-91 | 26 | NL |
| 27 | IV-90 | 28 | NL |
| 30 | III-7 | 83 | NL |
| 39 | V-9 | 9 | NL |
| 40 | V-10 | 8 | NL |
| 41 | V-49 | 23 | NL |
| 44 | IV-68 | 70 | NL |
| 45 | VI-22 | 5 | NL |
| 46 | V-75 | 33 | NL |
| 53 | IV-22 | 50 | NL |
| 54 | IV-78 | 44 | NL |
| 56 | V-88 | 21 | NL |
| 57 | IV-84 | 36 | NL |
| 68 | IV-48 | 29 | NL |
| 69 | V-108 | 12 | NL |

Legenda: FM: mutação completa - PM: pré-mutação - NL: normal.

TABELA 17: Resultados da avaliação molecular nos indivíduos do sexo masculino (Continuação).

| Caso | Posição no heredograma | Idade (anos) | Gene FMR1 |
|------|------------------------|--------------|-----------|
| 72 | V-37 | 10 | NL |
| 77 | V-22 | 20 | NL |
| 80 | V-60 | 19 | NL |
| 81 | V-81 | 59 | NL |
| 82 | IV-5 | 55 | NL |
| 83 | IV-69 | 78 | NL |
| 92 | VI-4 | 7 | NL |
| 98 | VI-29 | 9 | NL |
| 103 | VI-6 | 9 | NL |
| 104 | VI-7 | 8 | NL |
| 107 | V-64 | 15 | FM |

Legenda: FM: mutação completa - PM: pré-mutação – NL: normal.

TABELA 18: Frequências dos resultados da análise molecular encontrada na genealogia (n = 89).

| Gene FMR1 | Homens | Mulheres |
|-----------|--------|----------|
| NL | 31/37 | 43/52 |
| PM | 0/37 | 7/52 |
| FM | 6/37 | 2/52 |

Legenda: FM: mutação completa - PM: pré-mutação – NL: normal.

De acordo com o heredograma, os casos 03 e 74 apresentam risco de 50% para SXF. A amostra de DNA obtida em ambos os casos foi insuficiente para a análise molecular e os indivíduos não estavam disponíveis para uma segunda coleta. Ambos apresentaram DM moderada na avaliação psicológica.

A FM no gene FMR1 foi observada em 8 pacientes, sendo 2 do sexo feminino e 6 do sexo masculino em duas gerações da família. A faixa etária dos homens com a FM variou de 6 a 22 anos nos homens e as mulheres com a FM tinham 15 e 28 anos.

A PM foi encontrada em 7 mulheres de três gerações diferentes, com idades entre 14 e 68 anos.

Com relação ao número de afetados por geração na família, a TABELA 19 registra a quantidade de indivíduos na família, por geração, bem como o número de indivíduos afetados (portadores de pré-mutação ou mutação completa) dentre o grupo testado. Nenhum indivíduo das gerações I e II foi testado, porém os números se referem aos portadores obrigatórios do cromossomo X frágil, de acordo com o heredograma da família (FIGURA 9).

TABELA 19: Número de indivíduos existentes na genealogia e os portadores de alterações no gene FMR1 identificados neste trabalho.

| GERAÇÃO | I | II | III | IV | V | VI |
|-----------------|-------|----------|-------|-------|--------|-------|
| <i>Homens</i> | 00/02 | 03(*)/12 | 00/27 | 02/50 | 04/55 | 00/16 |
| <i>Mulheres</i> | 01/02 | (-)/15 | 04/23 | 08/48 | 01/55 | 00/17 |
| <i>Total(*)</i> | 01/04 | 03/24 | 05/50 | 10/98 | 05/110 | 00/34 |

Legenda: (*): número mínimo de indivíduos portadores obrigatórios de mutação no gene FMR1
 (--): sem possibilidade de dedução.

As freqüências dos sinais clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares observados na amostra encontram-se na TABELA 20, separada por sexo dos indivíduos.

TABELA 20: Freqüência dos achados clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos encontrados na genealogia em relação ao diagnóstico molecular.

| Sexo | Masculino | | Feminino | | |
|---------------------------------------|------------------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | NL | FM | NL | PM | FM |
| FMR1 | | | | | |
| Característica avaliada | | | | | |
| Frontal proeminente | 13/ 30 | 04/ 06 | 24/ 41 | 3/ 7 | 1/ 2 |
| Orelhas proeminentes | 16/ 31 | 04/ 06 | 19/ 41 | 6/ 7 | 1/ 2 |
| Palato ogival | 10/ 30 | 06/ 06 | 10/ 41 | 3/ 7 | 2/ 2 |
| Dígitos longos | 09/ 31 | 04/ 06 | 14/ 41 | 0/ 7 | 2/ 2 |
| Hiperextensibilidade das articulações | 09/ 31 | 03/ 06 | 20/ 41 | 4/ 7 | 2/ 2 |
| Deficiência mental | 5/ 14 | 05/ 06 | 05/ 28 | 1/ 6 | 2/ 2 |
| Comprometimento fonoaudiológico | 15/ 28 | 06/ 06 | 20/ 40 | 6/ 7 | 2/ 2 |

Legenda: NL: normal - PM: pré-mutação - FM: mutação completa.

4.6. Análise estatística

4.6.1. O teste de proporção χ^2

O teste revelou, tanto no grupo de homens como de mulheres, uma correlação entre a presença de alteração no gene FMR1 e a presença de palato alto na genealogia estudada. Para todos os outros sinais físicos avaliados não houve correspondência entre mutações no gene FMR1 e a presença dos sinais. Ainda, não observamos correspondência entre a presença de mutações no gene FMR1 e o comprometimento fonoaudiológico ou psicológico.

Devido ao pequeno número absoluto de indivíduos com alterações no gene FMR1 a hipótese nula (de não -associação) neste teste é difícil de ser rejeitada, não apresentando valor de p significativo. Os resultados do teste de proporção χ^2 encontram-se na TABELA 21, dividida de acordo com o sexo dos indivíduos.

TABELA 21: Resultados do Teste de proporção χ^2 mostrando os valores de p na análise entre a presença do sinal e as mutações no gene FMR1.

| Característica | Homens | | Mulheres | |
|---------------------------------------|----------|---------|----------|---------|
| | χ^2 | p | χ^2 | p |
| Frontal proeminente | 0.6644 | 0.415 | 0.2297 | 0.6318 |
| Orelhas proeminentes | 0.0528 | 0.8183 | 1.9832 | 0.1591 |
| Palato ogival | 6.8417 | 0.0089* | 3.8799 | 0.0489* |
| Dígitos longos | 1.691 | 0.1935 | 0.0417 | 0.8382 |
| Hiperextensibilidade das articulações | 0.2787 | 0.5976 | 0.4492 | 0.5027 |
| Deficiência mental | 0.0011 | 0.9739 | 0.0907 | 0.7632 |
| Comprometimento fonoaudiológico | 0.9405 | 0.3321 | 1.2813 | 0.2577 |

(*) $p < 0,05$. Como esse valor é menor que 5% a hipótese das características serem independentes é rejeitada, dizendo-se que a sua associação não é casual.

4.6.2. Teste exato de Fisher

Os resultados do teste exato de Fisher são dados como probabilidade de dependência das duas amostras e expressados por um valor de p . Estes valores estão apresentados a seguir em forma de tabelas de acordo com os testes realizados.

- a) grupo de indivíduos com a PM no gene FMR1 X indivíduos com o gene FMR1 normal (TABELA 22)
- b) grupo de indivíduos com a FM no gene FMR1 X indivíduos com o gene FMR1 normal (TABELA 23)

c) para o grupo de indivíduos com a FM no gene FMR1 X indivíduos com o gene FMR1 normal + indivíduos com a PM (TABELA 24)

TABELA 22: Resultados do teste exato de Fisher - Probabilidades de dependência das características observadas em relação à pré-mutação no gene FMR1, na família em estudo.

| Característica observada | Valor de p |
|---------------------------------------|------------|
| Frontal proeminente | 0,99 |
| Orelhas proeminentes | 0,05 |
| Palato ogival | 0,16 |
| Dígitos longos | 0,09 |
| Hiperextensibilidade das articulações | 0,70 |
| Deficiência mental | 0,30 |
| Comprometimento fonoaudiológico | 0,03* |

(*) $p < 0,05$. Como esse valor é menor que 5% a hipótese das características serem independentes é rejeitada, dizendo-se que a sua associação não é casual.

O teste exato de Fisher revelou a associação entre a presença de comprometimento fonoaudiológico e a PM no gene FMR1 na família em estudo.

Os valores de p calculados para as outras características foram maiores que 0,05; o que nos mostra que tanto a deficiência mental como os 5 sinais físicos avaliados, apesar de encontrados entre as pacientes com a PM, não apresentam correlação estatística com o achado molecular.

TABELA 23: Resultados do teste exato de Fisher - Probabilidades de dependência das características observadas em relação mutação completa no gene FMR1, na família em estudo.

| Característica observada | Valor de p |
|---------------------------------------|--------------|
| Frontal proeminente | 0,71 |
| Orelhas proeminentes | 0,46 |
| Palato ogival | 0,00003* |
| Dígitos longos | 0,05 |
| Hiperextensibilidade das articulações | 0,02* |
| Deficiência mental | 0,00000003* |
| Comprometimento fonoaudiológico | 0,01* |

(*) $p < 0,05$. Como esse valor é menor que 5% a hipótese das características serem independentes é rejeitada, dizendo-se que a sua associação não é casual.

Neste segundo teste (TABELA 23) os valores de p encontrados revelam uma forte probabilidade de correspondência entre palato ogival, hiperextensibilidade das articulações, deficiência mental, comprometimento fonoaudiológico e a FM no gene FMR1, na família em estudo.

A correlação encontrada entre a presença de FM e deficiência mental, comprometimento fonoaudiológico ou palato ogival mantiveram-se quando comparamos o grupo de FM com o grupo com normalidade no gene e quando associamos a este o grupo os indivíduos com PM no gene FMR1 (TABELA 24).

TABELA 24: Resultados do teste exato de Fisher - Probabilidades de dependência das características observadas em relação mutação completa no gene FMR1, na família em estudo. Neste teste, os dados das pacientes com a pré-mutação no gene FMR1 foram incluídos ao grupo com o gene normal.

| Característica observada | Valor de p |
|---------------------------------------|--------------|
| Frontal proeminente | 0,71 |
| Orelhas proeminentes | 0,48 |
| Palato ogival | 0,00005* |
| Dígitos longos | 0,02* |
| Hiperextensibilidade das articulações | 0,05 |
| Deficiência mental | 0,00000004* |
| Comprometimento fonoaudiológico | 0,04* |

(*) $p < 0,05$. Como esse valor é menor que 5% a hipótese das características serem independentes é rejeitada, dizendo-se que a sua associação não é casual.

Os dados sobre hiperextensibilidade das articulações a presença de dígitos longos alternaram-se identicamente quando comparamos o grupo de FM em relação à normalidade e o grupo de normalidade acrescida de PM.

A hiperextensibilidade das articulações apresentou probabilidade de dependência à FM quando o grupo comparado estava constituído apenas de indivíduos com o gene normal. Quando incluímos o grupo com a PM no grupo normal verificamos independência.

Em relação à presença de dígitos longos observamos exatamente o inverso, a probabilidade de dependência deste dado clínico com a FM ocorreu

apenas quando o grupo da normalidade incluiu os dados do grupo de PM.

A presença de frontal proeminente, orelhas proeminentes não apresentou probabilidade de dependência da FM nos indivíduos da família estudada, independentemente da inclusão ou não do grupo de portadoras de PM à normalidade. Isto nos leva a crer que, independentemente da SXF estar presente nesta genealogia, o encontro destes sinais clínicos em qualquer outro indivíduo da família não avaliado por nosso estudo não é indício para suspeição da SXF.

O comprometimento fonoaudiológico apresentou relevância estatística nesta família mesmo com a sua ocorrência em indivíduos não afetados pela SXF. Os achados fonoaudiológicos parecem estar fortemente associados a alterações no gene FMR1, como observado nos testes estatísticos realizados no grupo de PM e de FM (TABELAS 22 e 23). A correlação estatística manteve-se ainda no terceiro teste (TABELA 24), quando incluímos os dados das portadoras de PM ao grupo de indivíduos com alelo normal do gene FMR1.

4.6.3. Análise fatorial de correspondências múltiplas

Na AFCM considerando dois dos 9 fatores (dois eixos), 42,5% da variabilidade original dos dados foi conservada. O gráfico gerado (FIGURA 11) nos fornece alguns indícios.

- a) A presença de deficiência mental (DM) está fortemente associada à mutação completa do gene FMR1(FM), o que fica nítido através da proximidade entre os respectivos pontos;
- b) A FM está associada à presença dos sinais clínicos avaliados,

principalmente em relação à presença de palato alto (PO).

- c) A presença de comprometimento fonoaudiológico (CF), de orelhas proeminentes (OP) e frontal alto e proeminente (FP), aparentemente, são os que menos se associam à FM do gene FMR1 nesta genealogia, dada a maior distância verificada para os respectivos pontos.
- d) A presença das variáveis estudadas na família aparecem com maior frequência nas pessoas do sexo masculino, independentemente de apresentarem mutações no gene FMR1.

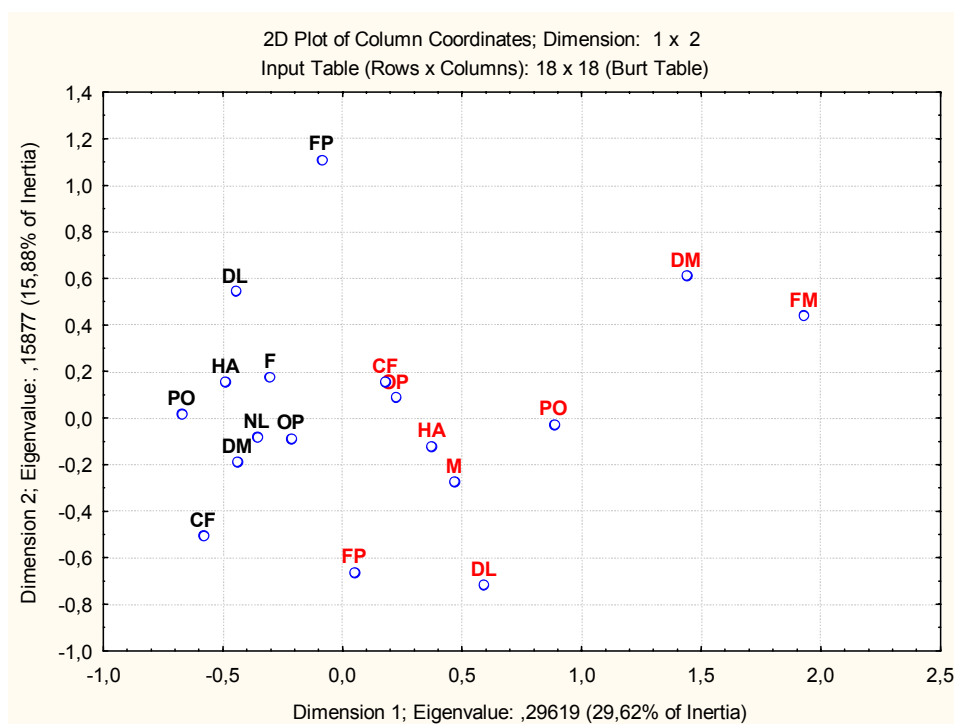


Figura 11- Gráfico de análise de correspondência com dois fatores para os sinais clínicos comuns da SXF avaliados na genealogia. Onde: FP: frontal alto e proeminente, OP: orelhas proeminentes, PO: palato alto e ogival, DL: dígitos longos, HA: hiperextensibilidade das articulações, CF: comprometimento fonoaudiológico, DM: deficiência mental, FM: mutação completa do gene FMR1, NL: pré-mutação ou normalidade no gene FMR1, M: sexo masculino, F: sexo feminino. À exceção do sexo, a presença do sinal aparece em vermelho e, a ausência em preto.

A forte associação dos achados clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares entre si já pôde ser observada na análise bidimensional dos dados. A análise tridimensional nos levou ainda a uma maior aproximação dos pontos referentes à presença dos sinais e a FM.

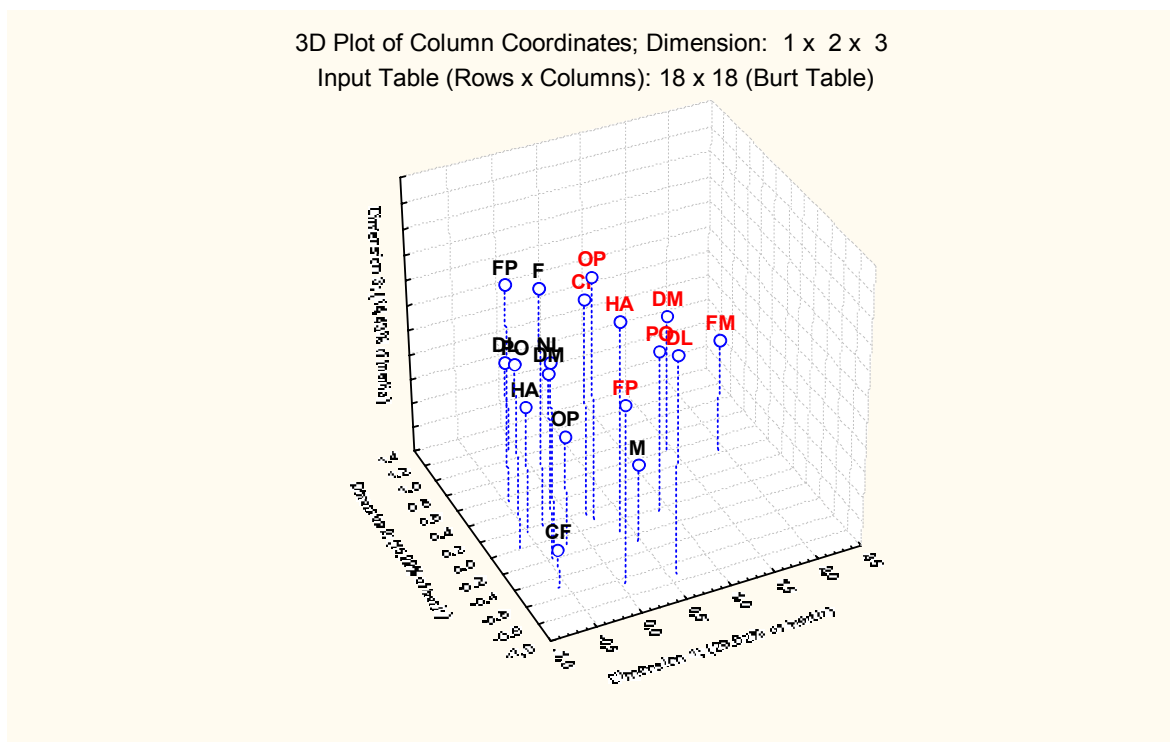


FIGURA 12: Gráfico de análise de correspondência com três fatores para os sinais clínicos comuns da SXF observados na genealogia. Onde: FP: frontal alto e proeminente, OP: orelhas proeminentes, PO: palato alto e ogival, DL: dígitos longos, HA: hiperextensibilidade das articulações, CF: comprometimento fonoaudiológico, DM: deficiência mental, FM: mutação completa do gene FMR1, NL: pré-mutação ou normalidade no gene FMR1, M: sexo masculino, F: sexo feminino. À exceção do sexo, a presença do sinal aparece em vermelho e, a ausência em preto.

Na análise fatorial de correspondência considerando três fatores (três eixos), 55,6% da variabilidade original dos dados foi conservada. A inclusão de mais um eixo fatorial (FIGURA 12) ratifica os resultados da análise feita com dois eixos, e mostra que a presença de todas as variáveis estudadas está mais

relacionada à FM do gene FMR1, o que pode ser observado considerando a altura dos pontos referentes. Ainda, a presença em conjunto dos sinais está mais associada entre si do que suas ausências, independente de mutações no gene FMR1.

Observados em conjunto durante a análise fatorial de correspondências, a presença dos sinais clínicos, fonoaudiológicos e psicológicos pesquisados mostrou-se consistente com a SXF. Sob esta abordagem verificamos a associação dos sinais entre si e a presença de FM no gene FMR1.

4.6.3.1. Tabelas de Burt.

As tabelas de Burt geradas: A tabela de Burt com as freqüências absolutas (TABELA 25) é uma tabela simétrica, portanto apenas a parte triangular inferior da figura é apresentada. Nos blocos da diagonal temos a freqüência absoluta de cada uma das modalidades de cada uma das características estudadas.

Nos blocos fora da diagonal temos as tabelas cruzadas entre as respectivas características. A soma das linhas, dentro de cada bloco, é igual ao valor da respectiva linha no bloco da diagonal.

Na tabela de Burt com as freqüências percentuais (TABELA 26) consideramos os perfis de linha. Nos blocos da diagonal divide-se o valor observado pelo número total de observações, obtendo-se a freqüência percentual de cada modalidade das características. Para blocos fora da diagonal divide-se o valor da linha pelo valor da linha no bloco diagonal, obtendo-se assim o percentual em relação à modalidade que está na linha do bloco diagonal,

chamado perfis dor linha. Neste caso a tabela não é simétrica.

As TABELAS 25 e 26 apresentam as freqüências absolutas e percentuais de cada característica estudada na genealogia. Com isto tiramos, por exemplo, o efeito dos diferentes números de homens e mulheres no experimento, bem como o fato de nem todos os indivíduos da pesquisa terem sido avaliados sob os mesmos parâmetros.

Podemos observar na TABELA 25 o número absoluto de indivíduos considerados na análise fatorial de correspondências que apresentaram uma dada característica. Na segunda linha temos os dados dos indivíduos que apresentaram frontal proeminente. Observando a última linha da tabela podemos saber o número de indivíduos com a FM que apresentaram ou não cada uma das características observadas.

Os dados da TABELA 26 referem-se às freqüências percentuais de cada uma das modalidades das diferentes características considerados na análise. Por exemplo, considerando a intersecção da segunda linha com a segunda coluna (FP 1 X FP 1) observamos que 63% dos indivíduos apresentaram frontal proeminente. Nos blocos fora da diagonal temos as modalidades comparadas duas a duas. Considerando a intersecção (CF 1 X DM 1) veremos que 22% dos indivíduos apresentaram comprometimento fonoaudiológico e deficiência mental.

TABELA 25: Tabela de Burt mostrando as frequências absolutas dos sinais clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares avaliados na pesquisa.

| | FP 0 | FP 1 | OP 0 | OP 1 | PO 0 | PO 1 | DL 0 | DL 1 | HA 0 | HA 1 | CF 0 | CF 1 | DM 0 | DM 1 | F | M | NL | FM |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|----|
| FP 0 | 19 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FP 1 | 0 | 32 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OP 0 | 10 | 16 | 26 | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| OP 1 | 9 | 16 | 0 | 25 | | | | | | | | | | | | | | |
| PO 0 | 10 | 19 | 15 | 14 | 29 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| PO 1 | 9 | 13 | 11 | 11 | 0 | 22 | | | | | | | | | | | | |
| DL 0 | 16 | 13 | 16 | 13 | 21 | 8 | 29 | 0 | | | | | | | | | | |
| DL 1 | 3 | 19 | 10 | 12 | 8 | 14 | 0 | 22 | | | | | | | | | | |
| HA 0 | 8 | 14 | 12 | 10 | 18 | 4 | 16 | 6 | 22 | 0 | | | | | | | | |
| HA 1 | 11 | 18 | 14 | 15 | 11 | 18 | 13 | 16 | 0 | 29 | | | | | | | | |
| CF 0 | 4 | 8 | 9 | 3 | 8 | 4 | 8 | 4 | 6 | 6 | 12 | 0 | | | | | | |
| CF 1 | 15 | 24 | 17 | 22 | 21 | 18 | 21 | 18 | 16 | 23 | 0 | 39 | | | | | | |
| DM 0 | 13 | 26 | 21 | 18 | 27 | 12 | 24 | 15 | 19 | 20 | 11 | 28 | 39 | 0 | | | | |
| DM 1 | 6 | 6 | 5 | 7 | 2 | 10 | 5 | 7 | 3 | 9 | 1 | 11 | 0 | 12 | | | | |
| F | 14 | 17 | 16 | 15 | 21 | 10 | 18 | 13 | 13 | 18 | 6 | 25 | 26 | 5 | 31 | 0 | | |
| M | 5 | 15 | 10 | 10 | 8 | 12 | 11 | 9 | 9 | 11 | 6 | 14 | 13 | 7 | 0 | 20 | | |
| NL | 16 | 27 | 23 | 20 | 29 | 14 | 27 | 16 | 19 | 24 | 12 | 31 | 39 | 4 | 29 | 14 | 43 | 0 |
| FM | 3 | 5 | 3 | 5 | 0 | 8 | 2 | 6 | 3 | 5 | 0 | 8 | 0 | 8 | 2 | 6 | 0 | 8 |

LEGENDA: FP: frontal proeminente; OP: orelhas proeminentes; PO: palato ogival; DL: dígitos longos; HA: hiperextensibilidade das articulações; CF: comprometimento fonoaudiológico; DM: deficiência mental; F: sexo feminino; M: sexo masculino; NL: gene FMR1 normal; FM: mutação completa do gene FMR1. Os algarismos 0 e 1 ao lado das abreviações referem-se à ausência e à presença da característica, respectivamente.

TABELA 26: Tabela de Burt com as frequências percentuais para os sinais clínicos, psicológicos, fonoaudiológicos e moleculares avaliados na pesquisa.

| | FP 0 | FP 1 | OP 0 | OP 1 | PO 0 | PO 1 | DL 0 | DL 1 | HA 0 | HA 1 | CF 0 | CF 1 | DM 0 | DM 1 | F | M | NL | FM |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|----|
| FP 0 | 37 | 0 | 20 | 18 | 20 | 18 | 31 | 6 | 16 | 22 | 8 | 29 | 25 | 12 | 27 | 10 | 31 | 6 |
| FP 1 | 0 | 63 | 31 | 31 | 37 | 25 | 25 | 37 | 27 | 35 | 16 | 47 | 51 | 12 | 33 | 29 | 53 | 10 |
| OP 0 | 20 | 31 | 51 | 0 | 29 | 22 | 31 | 20 | 24 | 27 | 18 | 33 | 41 | 10 | 31 | 20 | 45 | 6 |
| OP 1 | 18 | 31 | 0 | 49 | 27 | 22 | 25 | 24 | 20 | 29 | 6 | 43 | 35 | 14 | 29 | 20 | 39 | 10 |
| PO 0 | 20 | 37 | 29 | 27 | 57 | 0 | 41 | 16 | 35 | 22 | 16 | 41 | 53 | 4 | 41 | 16 | 57 | 0 |
| PO 1 | 18 | 25 | 242 | 22 | 0 | 43 | 16 | 27 | 8 | 35 | 8 | 35 | 24 | 20 | 20 | 24 | 27 | 16 |
| DL 0 | 31 | 25 | 31 | 25 | 41 | 16 | 57 | 0 | 31 | 25 | 16 | 41 | 47 | 10 | 35 | 22 | 53 | 4 |
| DL 1 | 6 | 37 | 20 | 24 | 16 | 27 | 0 | 43 | 12 | 31 | 8 | 35 | 29 | 14 | 25 | 18 | 31 | 12 |
| HA 0 | 16 | 27 | 24 | 20 | 35 | 8 | 31 | 12 | 43 | 0 | 12 | 31 | 37 | 6 | 25 | 18 | 37 | 6 |
| HA 1 | 22 | 35 | 27 | 29 | 22 | 35 | 25 | 31 | 0 | 57 | 12 | 45 | 39 | 18 | 35 | 22 | 47 | 10 |
| CF 0 | 8 | 16 | 18 | 6 | 16 | 8 | 16 | 8 | 12 | 12 | 24 | 0 | 22 | 2 | 12 | 12 | 24 | 0 |
| CF 1 | 29 | 47 | 33 | 43 | 41 | 35 | 41 | 35 | 31 | 45 | 0 | 76 | 55 | 22 | 49 | 27 | 61 | 16 |
| DM 0 | 25 | 51 | 41 | 35 | 53 | 24 | 47 | 29 | 37 | 39 | 22 | 55 | 76 | 0 | 51 | 25 | 76 | 0 |
| DM 1 | 12 | 12 | 10 | 14 | 4 | 20 | 10 | 14 | 6 | 18 | 2 | 22 | 0 | 24 | 10 | 14 | 8 | 16 |
| F | 27 | 33 | 31 | 29 | 41 | 20 | 35 | 25 | 25 | 35 | 12 | 49 | 51 | 10 | 61 | 0 | 57 | 4 |
| M | 10 | 29 | 20 | 20 | 16 | 24 | 22 | 18 | 18 | 22 | 12 | 27 | 25 | 14 | 0 | 39 | 27 | 12 |
| NL | 31 | 53 | 45 | 39 | 57 | 27 | 53 | 31 | 37 | 47 | 24 | 61 | 76 | 8 | 57 | 27 | 84 | 0 |
| FM | 6 | 10 | 6 | 10 | 0 | 16 | 4 | 12 | 6 | 10 | 0 | 16 | 0 | 16 | 4 | 12 | 0 | 16 |

LEGENDA: FP: frontal proeminente; OP: orelhas proeminentes; PO: palato ogival; DL: dígitos longos; HA: hiperextensibilidade das articulações; CF: comprometimento fonoaudiológico; DM: deficiência mental; F: sexo feminino; M: sexo masculino; NL: gene FMR1 normal; FM: mutação completa do gene FMR1. Os algarismos 0 e 1 ao lado das abreviações referem-se à ausência e à presença da característica, respectivamente.

Discussão

5. DISCUSSÃO.

No início deste trabalho esperávamos encontrar muitos casos de SXF na genealogia em estudo devido a grande quantidade de indivíduos com DM (n=18). Em apenas 8 destes casos o diagnóstico SXF com a FM no gene FMR1 foi confirmado. Acreditávamos que os outros casos pudessem ser, ainda, decorrentes de consangüinidade, o que não ocorreu, após a análise do heredograma.

Os casos de SXF confirmados através deste trabalho atingem a terceira, quarta e quinta gerações, envolvendo 6 dos 63 núcleos familiares. Não avaliamos os indivíduos das duas primeiras gerações, devido ao óbito. Porém, através da análise do heredograma, pudemos inferir sobre a presença de alterações no gene FMR1 em pelo menos três indivíduos da geração II, pais de portadoras da PM no gene FMR1. Ainda de acordo com o heredograma pudemos detectar que, considerando os indivíduos da genealogia sobre os quais obtivemos informações, o primeiro caso de alterações no gene FMR1 deu-se no indivíduo I-2.

Um dos objetivos de nosso estudo foi determinar as freqüências de 5 sinais clínicos comuns da SXF e identificar a possível associação de cada sinal com a FM, utilizando como grupo controle os indivíduos da genealogia que apresentavam o gene normal.

Os cinco sinais clínicos investigados foram observados em metade dos casos de afetados pela SXF (4/8). Em um paciente foram observados quatro sinais; em outro paciente foram observados três dos cinco sinais. Os outros dois

casos afetados pela SXF restantes apresentaram somente um dos cinco sinais, a presença de palato ogival.

A deficiência mental (DM) foi encontrada em todos os oito casos com a SXF. Em seis destes casos consideramos a deficiência mental como sendo de gravidade inespecífica, ou seja, indivíduos que apresentaram as habilidades intelectuais gerais demasiadamente prejudicadas e, portanto, são incapazes de responder aos testes. Nos outros dois casos os testes puderam ser realizados indicando DM moderada, como ocorre em 50% da população masculina afetada pela SXF.

Dentre o grupo de portadoras da PM, um caso apresentou DM moderada além de distúrbio de aprendizagem e de fala. De acordo com a literatura uma pequena porcentagem de portadores da PM pode apresentar déficit cognitivo.

Em cinco dos 10 casos de DM não afetados pela SXF encontrados na genealogia, a baixa pontuação é questionável, pois os mesmos mostraram desinteresse em realizar os testes psicológicos. Os testes deveria ser repetidos porém não houve condições temporais para sua realização. Em outros três casos de DM os testes revelaram imaturidade neurológica.

O comprometimento fonoaudiológico foi a única característica avaliada que mostrou-se associada a quaisquer mutações no gene FMR1, nesta genealogia. Os testes estatísticos de proporção revelaram forte associação do sinal tanto em relação à PM como à FM no gene FMR1. De acordo com a literatura, os portadores de PM podem apresentar déficit de atenção e memória. Os indivíduos portadores de PM no gene FMR1 avaliados em nosso estudo falharam no teste Token, que exige compreensão e memória para sua realização. Pudemos notar

que a baixa pontuação neste teste foi conseqüência da inabilidade em compreenderem as ordens complexas exigidas à medida em que aumentava a complexidade do teste.

Os testes estatísticos realizados determinaram que, além do comprometimento fonoaudiológico, a presença de deficiência mental e a presença de palato alto encontram-se associadas à FM na genealogia em estudo.

De acordo com os resultados de nossos testes estatísticos não pudemos determinar se as presenças de orelhas proeminentes, dígitos longos e hiperextensibilidade das articulações em nossos pacientes devam ser atribuídas às mutações no gene FMR1 ou se as mesmas aparecem como características familiares.

A análise estatística nos mostra que, apesar de não encontrarmos significância estatística para cada características isoladamente através dos testes de proporção, na análise fatorial de correspondências nossos dados indicam que todos os sinais avaliados estão fortemente relacionados a FM no gene FMR1. Esta relação torna-se evidente ao observarmos as posições relativos às presenças dos sinais no gráfico gerado.

Nossos dados são consistentes com a literatura no que tange à variabilidade de características físicas, psicológicas e fonoaudiológicas encontradas na SXF.

Os estudos comparativos previamente publicados avaliam a consistência dos achados clínicos comparando indivíduos afetados com indivíduos normais da população em geral. Não é de nosso conhecimento a existência de estudos genético-clínicos na SXF que tenham sido realizados apenas entre indivíduos de

uma mesma família. Este fato torna-se relevante por eliminar uma possível falsa correlação de características clínicas com as mutações no gene FMR1, uma vez que características clínicas como frontal alto e orelhas grandes e proeminentes, por exemplo, ocorrem na população em geral e podem ser características herdáveis normais.

O que também nos chama a atenção nesta genealogia é a presença nos indivíduos sem alterações no gene FMR1 de sinais clínicos freqüentes na SXF. A freqüência absoluta destes sinais na literatura é sempre dada em grupos de pacientes com o diagnóstico molecular prévio de SXF.

A ausência de características patognomônicas limita o potencial de rastreamento clínico dismórfico da SXF. No entanto, considerando a deficiência mental na população em geral, os diversos instrumentos de triagem clínica existentes podem ser utilizados como sinalizadores de risco para a SXF nestes indivíduos.

Acreditamos que, de acordo com nossos resultados, estes instrumentos devam ser utilizados com cautela na suspeição de indivíduos de uma mesma família onde a SXF já tenha sido diagnosticada, pois apesar de consistentes, os achados clínicos estudados não são exclusivos dos portadores da SXF.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A segregação do gene FMR1 na genealogia estudada deu-se em 5 gerações, com a presença de FM a partir da terceira geração. A PM no gene FMR1 foi confirmada em laboratório a partir da terceira geração. Pudemos inferir sobre a presença de PM em três casos na segunda geração, sendo os três do sexo masculino, pais de portadoras da PM e avós de afetados pela SXF. Ao indivíduo I-2 (sexo feminino) atribuímos o ponto de início da segregação do gene FMR1 alterado nesta família. A consangüinidade não foi fator causal da SXF em nenhum dos 6 núcleos familiares onde confirmamos a ocorrência de afetados e também não foi fator contribuinte para DM.

Dentre os indivíduos afetados pela SXF nesta genealogia observamos a presença de pelo menos um das cinco características clínicas mais freqüentes da SXF, estando o palato ogival presente em todos os casos. A deficiência mental e o comprometimento fonoaudiológico estiveram presentes em todos os portadores da FM no gene FMR1.

Encontramos entre os indivíduos da família que não apresentaram alterações no gene FMR1 a presença de sinais clínicos, de deficiência mental e de comprometimento fonoaudiológico não relacionados a SXF.

De acordo com nossos resultados concluímos que aos indivíduos do sexo masculino que apresentem deficiência mental e comprometimento fonoaudiológico deva ser oferecido o teste molecular de detecção da SXF.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBEDUTO L, MURPHY MM, CAWTHON SW, RICHMOND EK, WEISSMAN MD, KARADOTTIR S, O'BRIEN A. Receptive language skills of adolescents and young adults with down or fragile X syndrome. **Am J Ment Retard.** 108(3):149-60, 2003.
2. ABBEDUTO L, SELTZER MM, SHATTUCK P, KRAUSS MW, ORSMOND G, MURPHY MM. Psychological well-being and coping in mothers of youths with autism, Down syndrome, or fragile X syndrome. **Am J Ment Retard.** 109(3):237-54, 2004.
3. ALLINGHAM-HAWKINS, DJ, BABUL-HIRJI, R, CHITAYAT, D, HOLDEN, JJ, YANG, KY, e col. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the international collaborative POF in fragile X study -preliminary data. **Am. J. Med. Genet.**83: 322-325, 1999.
4. APA. American Psychiatric Association. **DSM-IV-TR- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 4a. ed., Text Revision. American Psychiatric Press, Washington, DC, 2000.
5. ARNAUD, E, RENIER, D, MARCHAC, D. Prognosis for mental function in scaphocephaly. **J Neurosurg.**, 83(3):476-9, 1995.
6. ASHLEY, CT, SUTCLIFF JS, KUNST, CB, LEINER, HÁ, EICHLER, EE e col. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. **Nat. Genet.** 4: 244-251, 1993a.
7. BAILEY A, PHILLIPS W, RUTTER M. Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives. **J Child Psychol Psychiatry.**, 37(1):89-126, 1996.
8. BAILEY DB JR, HATTON DD, MESIBOV G, AMENT N, SKINNER M. Early development, temperament, and functional impairment in autism and fragile X syndrome. **J Autism Dev Disord.**, 30(1):49-59, 2000.

9. BAILEY DB JR, HATTON DD, SKINNER M, MESIBOV G. Autistic behavior, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. **J Autism Dev Disord.**, 31(2):165-74, 2001.
10. BARKLEY, RA. A critique of current diagnostic criteria for attention deficit hyperactivity disorder: clinical and research implications. **J Dev Behav Pediatr.**, 6:343-52, 1990.
11. BEILINA A, TASSONE F, SCHWARTZ PH, SAHOTA P, HAGERMAN PJ. Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. **Hum. Mol. Genet.**,13(5): 543-9, 2004.
12. BELL, MV, HIRST MC, NAKAHORI, Y, MACKINNON, RN, ROCHE, A e col. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. **Cell.** 64: 861-866, 1991.
13. BENZÉCRI, J. Sur les variétés localement afines et projectives. **Bull. Soc. Math. France**, 88, 229-332, 1960. *Apud*: CHAIB FO., H. Aplicações de Análise Fatorial de Correspondências para Análise de Dados. *In*: ANDRADE, EXL, SAMPAIO, R, SILVA, GN. (Editores) Notas em Matemática Aplicada. Disponível em www.sbmac.org.br/boletim/pdf_2004/livro_09_2004.pdf
14. BERRY-KRAVIS E, LEWIN F, WUU J, LEEHEY M, HAGERMAN R, HAGERMAN P, GOETZ CG. Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. **Ann Neurol.**, 53(5):616-23, 2003.
15. BORGHGRAEF, M, FRYNS, JP, DIEBKENS, A, PYCK, K, VAN DEN BERGHE, H. Fragile (X) syndrome: a study of the psychological profile in 23 prepubertal patients. **Clin Genet.**, 32(3):179-86, 1987.
16. BOWEN P, BIEDERMAN B, SWALLOW KA. The X-linked syndrome of macroorchidism and mental retardation: further observations. **Am J Med Genet.**;2(4):409-14, 1978.

17. BROWN WT, FRIEDMAN E, JENKINS EC, BROOKS J, WISNIEWSKI K, RAGUTHU S, FRENCH JH. Association of fragile X syndrome with autism. **Lancet**, 1(8263):100, 1982a.
18. BROWN WT, JENKINS EC, FRIEDMAN E, BROOKS J, WISNIEWSKI K, RAGUTHU S, FRENCH J. Autism is associated with the fragile-X syndrome. **J Autism Dev Disord.**, 12(3):303-8, 1982b.
19. BROWN, V, JIN, P, CEMAN, S, DARNELL, JC, O'DONNELL, WT, TENENBAUM, SA, JIN, X, FENG, Y, WILKINSON, KD, KEENE, JD, DARNELL, RB, WARREN, ST. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. **Cell**, 107: 477-487, 2001.
20. BRUNBERG JA, JACQUEMONT S, HAGERMAN RJ, BERRY-KRAVIS EM, GRIGSBY J, LEEHEY MA, TASSONE F, BROWN WT, GRECO CM, HAGERMAN PJ. Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. **AJNR Am J Neuroradiol.**, 23(10):1757-66, 2002.
21. CASTETS, M, SCHAEFFER, C, BECHARA, E, SCHENCK, A, KHANDJIAN, EW, LUCHE, S, MOINE, H, RABILLOUD, T, MANDEL, JL, BARDONI, B. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. **Hum. Mol. Genet.**, 14(6):835-44, 2005.
22. CHAKRAVARTI, A. Fragile X founder effect? **Nat. Genet.** 1: 237-238, 1992.
23. CHEN LS, TASSONE F, SAHOTA P, HAGERMAN PJ. The (CGG)_n repeat element within the 5' untranslated region of the FMR1 message provides both positive and negative cis effects on in vivo translation of a downstream reporter. **Hum. Mol. Genet.**, 12(23):3067-74, 2003.
24. CHIANG PW, CARPENTER LE, HAGERMAN PJ. The 5'-untranslated region of the FMR1 message facilitates translation by internal ribosome entry. **J. Biol. Chem.**; 276(41):37916-21, 2001.

25. CHIURAZZI, P, GENUARDI, M, KOZAK, L. e col. Fragile X founder chromosomes in Italy: a few initial events and possible explanation for their heterogeneity. **Am. J. Med. Genet.** 64: 209-215, 1996b.
26. CHIURAZZI, P, KOZAK, L, NERI, G. Unstable triplets and their mutational mechanism: size reduction of the CGG repeat vs. germline mosaicism in the fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.** 51: 517-521, 1994.
27. CHIURAZZI, P, MACPHERSON, J, SHERMAN, S, NERI, G. Significance of linkage disequilibrium between fragile X locus and its flanking markers. **Am. J. Med. Genet.** 64: 203-208, 1996a.
28. CHIURAZZI, P, POMPONI, MG, WILLWIMSEN, R, OOSTRA, BA, NERI, G. in vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, 7: 109-113, 1998.
29. COHEN, IL, SUDHALTER, V, PFADT, A, JENKINS, EC, BROWN, WT, VIETZE, PM. Why are autism and the fragile-X syndrome associated? Conceptual and methodological issues. **Am. J. Hum. Genet.**, 48(2):195-202, 1991.
30. COHEN, IL, VIETZE, PM, SUDHALTER, V, JENKINS, EC, BROWN, WT. Effects of age and communication level on eye contact in fragile X males and non-fragile X autistic males. **Am. J. Med. Genet.**, 38(2-3):498-502, 1991.
31. CORNISH, K, KOGAN, C, TURK, J, MANLY, T, JAMES, N, MILLS, A, DALTON, A. The emerging fragile X premutation phenotype: Evidence from the domain of social cognition. **Brain and Cognition**, 57: 53-60, 2005.
32. CORNISH, KM, TURK, J, WILDING, J, SUDHALTER, V, MUNIR, F, KOOY, F, HAGERMAN, R. Annotation: Deconstructing the attention deficit in fragile X syndrome: a developmental neuropsychological approach. **J. Child Psychol. Psychiatry**, 45(6):1042-53, 2004.

33. CRNIC LS, HAGERMAN R. Preface: fragile X syndrome: frontiers of understanding gene-brain-behavior relationships. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**;10(1):1-2, 2004.
34. DARNEL, JC, JENSEN, KB, BROWN, V, JIN, P, WARREN, ST, DARNELL, RB. Fragile X mental retardation protein mRNA targets harboring intramolecular G-quartets encode proteins related to synaptic function. **Cell.** 107: 489-499, 2001.
35. DE BOULLE, K, VERKERK, AJMH, REYNIERS, E, VITS, L, HENCRICKX, J e col. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. **Nat. Genet.** 3: 31-35, 1993.
36. DE GRAAFF, E, WILLEMSSEN, R, ZHONG, N, DE DIE-SMULDERS, CE, BROWN, WT, FRELING, G, OOSTRA, B. Instability of the CGG repeat and expression of the FMR1 protein in a male fragile X patient with a lung tumor. **Am. J. Hum. Genet.**, 57(3):609-18, 1995.
37. DERENZI E, VIGNOLO LA. The Token Test: a sensitive test to detect receptive disturbances in aphasics. **Brain**; 85: 665-678, 1962.
38. DEVYS, D.; LUTZ, Y.; ROUYER, N.; BELLOCQ, J.-P.; MANDEL, J.-L. : The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. **Nature Genet.**, 4: 335-340, 1993.
39. DOMBROWSKY, C, LEVESQUE, S, MOREL, ML e col.. Premutation and intermediate-size FMR1 aleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome aleles. **Hum. Mol. Genet.**, 11: 371-378, 2002.
40. DSM-IV. **American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- IV.** Disponível em inglês: <http://www.appi.org/> .Acessado em agosto de 2006.
41. DYKENS, E, ORT, S, COHEN, I, FINUCANE, B, SPIRIDIGLIOZZI, G, LACHIEWICZ, A, REISS, A, FREUND, L, HAGERMAN, R, O'CONNOR, R. Trajectories and profiles of adaptive behavior in males with fragile X

syndrome: multicenter studies. **J. Autism Dev. Disord.**, 3:287-301, 1996.

42. DYKENS, EM, HODAPP, RM, LECKMAN, JF. Adaptive and maladaptive functioning of institutionalized and noninstitutionalized fragile X males. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.**,3:427-30, 1989.
43. DYKENS, EM, HODAPP, RM, LECKMAN, JF. **Behavior and development in fragile X syndrome.** Thousand Oaks, CA: Sage Publication Inc., 1994.
44. DYKENS, EM, HODAPP, RM, ORT, S, FINUCANE, B, SHAPIRO, LR, LECKMAN, JF. The trajectory of cognitive development in males with fragile X syndrome. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.**, 3:422-6, 1989.
45. DYKENS, EM. DNA meets DSM: the growing importance of genetic syndromes in dual diagnosis. **Ment. Retard.**, 34(2):125-7, 1996.
46. EICHLER, E. E.; NELSON, D. L.: Genetic variation and evolutionary stability of the FMR1 CGG repeat in six closed human populations. **Am. J. Med. Genet.**, 64: 220-225, 1996.
47. EICHLER, EE, HOLDEN, JJ, POPOVICH, BW, REISS, AL, SNOW, K e col. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. **Nat. Genet.** 8: 88-94, 1994.
48. EICHLER, EE, RICHARDS, S, GIBBS, RA, NELSON, DL. Fine structure of the human FMR1 gene. **Hum. Mol. Genet.**, 2: 1147-1153, 1993.
49. ESCALANTE, J.A., GRUNSPUN, H., FROTA-PESSOA, O. Severe Sex linked mental retardation. **J. Génét. Hum (Genova)**, 19: 137, 1971.
50. FAZZI, E; ORCESI, S; TELESCA, C; OMETTO, A; RONDINI, GE, LANZI, G. Neurodevelopmental outcome in very low birth weight infants at 24 months and 5 to 7 years of age: changing diagnosis. **Pediatric Neurology**, 17(3):240-248, 1997

51. FENG, Y, ABSHER, D, EBERHART, DE, BROWN, V, MALTER, HE, WARREN, ST. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I340N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. **Molec. Cell.** 1: 109-118, 1997.
52. FENG, Y, ZHANG, F, LOKEY, LK, CHASTAIN, JL, LAKKIS, L, EBERHART, D, WARREN, ST. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. **Science**, 268(5211):731-4, 1995.
53. FINEGAN, JA. Study of behavioral phenotypes: goals and methodological considerations. **Am. J. Med. Genet.**, 81(2):148-55, 1998.
54. FISCH GS. What is associated with the fragile X syndrome? **Am. J. Med. Genet.**, 48(2):112-21, 1993.
55. FISCH, GS, CARPENTER, N, HOLDEN, JJ, HOWARD-PEEBLES, PN, MADDALENA, A, BORGHGRAEF, M, STEYAERT, J, FRYNS, JP. Longitudinal changes in cognitive and adaptive behavior in fragile X females: a prospective multicenter analysis. **Am. J. Med. Genet.**, 83(4):308-12, 1999.
56. FISCH, GS, CARPENTER, N, HOWARD-PEEBLES, PN, MADDALENA, A, SIMENSEN, R, TARLETON, J, JULIEN-INALSINGH, C, CHALIFOUX, M, HOLDEN JJ. Lack of association between mutation size and cognitive/behavior deficits in fragile X males: a brief report. **Am. J. Med. Genet.**, 64(2):362-4, 1996.
57. FISCH, GS, CARPENTER, NJ, HOLDEN, JJ, SIMENSEN, R, HOWARD-PEEBLES, PN, MADDALENA, A, PANDYA, A, NANCE, W. Longitudinal assessment of adaptive and maladaptive behaviors in fragile X males: growth, development, and profiles. **Am. J. Med. Genet.**, 83(4):257-63, 1999.
58. FISCH, GS, HOLDEN, JJ, CARPENTER, NJ, HOWARD-PEEBLES, PN, MADDALENA, A, PANDYA, A, NANCE, W. Age-related language characteristics of children and adolescents with fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 83(4):253-6, 1999.

59. FISCH, GS, SIMENSEN, R, TARLETON, J, CHALIFOUX, M, HOLDEN, JJ, CARPENTER, N, HOWARD-PEEBLES, PN, MADDALENA, A. Longitudinal study of cognitive abilities and adaptive behavior levels in fragile X males: a prospective multicenter analysis. **Am. J. Med. Genet.**, 64(2):356-61, 1996.
60. FISHER, RA. On the mathematical foundations of theoretical statistics. **Philosoph. Transact. Royal Soc.**, A, 222: 309-368, 1922.
61. FRANKE, P, MAIER, W, HAUTZINGER M, WEIFFENBACH, O, GANSICKE, M, e col. Fragile-X carrier females: evidence for a distinct psychopathological phenotype? **Am. J. Med. Genet.**, 64: 334-339, 1996.
62. FREUND LS, REISS AL, HAGERMAN R, VINOGRADOV S. Chromosome fragility and psychopathology in obligate female carriers of the fragile X chromosome. **Arch. Gen. Psychiatry.**; 49(1):54-60, 1992.
63. FU, YH, KUHL, DP, PIZZUTI, A, PIERETTI, M, SUTCLIFF, JB, e col. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell.** 67: 1047-1058, 1991.
64. GARDNER, RJM e SUTHERLAND, GR. **Chromosome abnormalities and genetic counseling.** Third ed. Oxford University Press, Nova Iorque, p218-232, 2004.
65. GESELL A, AMATRUDA CS. **Diagnóstico do desenvolvimento, avaliação e tratamento do desenvolvimento neuropsicológico no lactente e na criança pequena: o normal e o patológico.** Terceira. Edição, Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1987.
66. GIRAUD, F, AYME, S, MATTEI, MG. Constitutional chromosomal breakage. **Hum. Genet.**, 34: 125-136, 1976.
67. GRECO CM, HAGERMAN RJ, TASSONE F, CHUDLEY AE, DEL BIGIO MR, JACQUEMONT S, LEEHEY M, HAGERMAN PJ. Neuronal intranuclear

inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. **Brain.**;125(Pt 8):1760-71, 2002.

68. GUSTAVSON KH, HOLMGREN G, BLOMQUIST HK, MIKKELSEN M, NORDENSON I, POULSEN H, TOMMERUP N. Familial X-linked mental retardation and fragile X chromosomes in two Swedish families. **Clin. Genet.**, . 19(2):101-10, 1981.
69. HADDAD LA, MINGRONI-NETTO RC, VIANNA-MORGANTE AM, PENA SD. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Hum. Genet.**, 97(6):808-12, 1996.
70. HAGERMAN PJ, GRECO CM, HAGERMAN RJ. A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X premutation carriers. **Cytogenet. Genome Res.**;100(1-4):206-12, 2003.
71. HAGERMAN PJ, HAGERMAN RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.**;10(1):25-30, 2004a.
72. HAGERMAN PJ, HAGERMAN RJ. The fragile-X premutation: a maturing perspective. **Am J Hum Genet.** 74(5):805-16, 2004b. Errata in: *Am J Hum Genet.*; 75(2):352, 2004.
73. HAGERMAN RJ, HAGERMAN PJ. Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behaviour relationships. **Rev Neurol.**; **33 Suppl 1:S** 51-7, 2001.
74. HAGERMAN, RJ, JACKSON, C, AMIRI, K, SILVERMAN, AC, O'CONNOR, R, SOBESKI, W. Girls with fragile X syndrome: Physical and Neurocognitive Status and Outcome. **Pediatrics**, 89(3): 495-400, 2002.
75. HAGERMAN RJ, HAGERMAN PJ. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. **Curr Opin Genet Dev.**; 12(3):278-83, 2002.
76. HAGERMAN RJ, LEAVITT BR, FARZIN F, JACQUEMONT S, GRECO CM, BRUNBERG JA, TASSONE F, HESSL D, HARRIS SW, ZHANG L, JARDINI T, GANE LW, FERRANTI J, RUIZ L, LEEHEY MA, GRIGSBY J, HAGERMAN PJ. Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome

(FXTAS) in females with the FMR1 premutation. **Am. J. Hum. Genet.**, 74(5):1051-6, 2004c.

77. HAGERMAN, PJ, HAGERMAN, RJ. The fragile X premutation: a maturing perspective. **Am. J. Hum. Genet.**, 74: 805-816, 2004a.
78. HAGERMAN, RJ e CRONISTER, A. **Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research.** 2a. Ed. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp 3-87, 1996.
79. HAGERMAN, RJ e SYNHORST, DP.: Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 17: 123-131, 1984
80. HAGERMAN, RJ, **Fragile X syndrome.** In: HAGERMAN, R.J. Neurodevelopmental disorders: diagnosis and treatment. Oxford University Press, New York, pp 61-132, 1999.
81. HAGERMAN, RJ, LEEHEY, M, HEINRICHS, W, TASSONE, F, WILSON, R, HILLS, J, GRIGSBY, J, GAGE, B, HAGERMAN, PJ. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. **Neurology**, 57: 127-130, 2001.
82. HANSON, DM, JACKSON, AW 3RD, HAGERMAN, RJ. Speech disturbances (cluttering) in mildly impaired males with the Martin-Bell/fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 23(1-2):195-206, 1986.
83. HARVEY, J, JUDGE, C, WIENER, S. Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. **J. Med. Genet.** 14: 46-50, 1977.
84. HECHT, F, SUTHERLAND, GR. Detection of fragile sites on human chromosomes. **Clin. Genet.**, 28(1):95-6, 1985.
85. HECHT, F, SUTHERLAND, GR. Detection of the fragile X chromosome and other fragile sites. **Clin. Genet.**, 26(4):301-3, 1984.
86. HEITZ, D, DEVYS D, IMBERT, G, KRETZ, C, MANDEL, JL. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major

determinant of the transition to full mutation. **J. Med. Genet.** 29: 794-801, 1992.

87. HORNSTRA, IK, NELSON, DL, WARREN, ST, YANG, TP. High resolution methylation analysis of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome. **Hum. Mol. Genet.** 2: 1659-1665, 1993.
88. HUANG, T, LI, L-Y, SHEN, Y, QIN, Z-L, WU, G-Y. Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons. **Am. J. Med. Genet.**, 64: 252-255, 1996.
89. HULL, C, HAGERMAN, RJ. A study of the physical, behavioral, and medical phenotype, including anthropometric measures, of females with fragile X syndrome. **Am. J. Dis. Child.**, 147(11):1236-41, 1993.
90. HUNDSCHIED RDL, BRAAT DD, KIEMENEY LA, SMITS A, THOMAS CM. Increased serum FSH in female fragile X premutation carriers with either regular menstrual cycles or on oral contraceptives. **Hum. Reprod.**, 16: 457-462, 2001.
91. HUNDSCHIED, RDL, SISTERMANS, EA, THOMAS, CMG, BRAAT, DDM, STRAATMAN, H, KIEMENET, LALM, OOSTRA, BA, SMITS, APT. Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. **Am. J. Hum. Genet.**, 66: 413-418, 2000.
92. ICD-10. **International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems.** 10a. Revisão. Versão 2006. Disponível em inglês: <http://www3.who.int/icd/currentversion/fr-icd.htm> e em português: <http://www.datasus.gov.br/cid10/webhelp/cid10.htm>. Acessado em agosto de 2006.
93. IRWIN, SA, PATEL, B, IDUPULAPATI, M, HARRIS, JB, CRISOSTOMO, RA e col. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 98: 161-167, 2001.

94. JACQUEMONT S, FARZIN F, HALL D, LEEHEY M, TASSONE F, GANE L, ZHANG L, GRIGSBY J, JARDINI T, LEWIN F, BERRY-KRAVIS E, HAGERMAN PJ, HAGERMAN RJ. Aging in individuals with the FMR1 mutation. **Am. J. Ment. Retard.**, 109(2):154-64, 2004a.
95. JACQUEMONT S, HAGERMAN RJ, LEEHEY MA, HALL DA, LEVINE RA, BRUNBERG JA, ZHANG L, JARDINI T, GANE LW, HARRIS SW, HERMAN K, GRIGSBY J, GRECO CM, BERRY-KRAVIS E, TASSONE F, HAGERMAN PJ. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. **JAMA**. 291(4):460-9, 2004b.
96. JACQUEMONT, S, HAGERMAN, RJ, LEEHEY, M, HALL, DA, LEVINE, RA, BRUNBERG, JA, ZHANG, L, JARDINI, T, GANE, LW, HARRIS, SW. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. **JAMA**, 291: 460-469, 224a.
97. JACQUEMONT, S, HAGERMAN, RJ, LEEHEY, M. Fragile X premutations tremor/ataxia syndrome: Molecular, clinical, and neuroimaging correlates. **Am. J. Hum. Genet.**, 72: 869-878, 2003.
98. JENNINGS M, HALL JG, HOEHN H. Significance of phenotypic and chromosomal abnormalities in X-linked mental retardation (Martin-Bell or Renpenning syndrome). **Am. J. Med. Genet.**;7(4):417-32, 1980.
99. JIN, P e WARREN, ST. Understanding the molecular basis of the fragile X syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, 9: 901-908, 2000.
100. KIRK SA, MCCARTHY J & KIRK WD . **Illinois Test of Psycholinguistic Abilities**. University of Illinois Press, Urbana, IL, USA, 1968.
101. KOBASHI, L. S.; SOUZA, DH ; RODRIGUEIRO, DA; SANTOS, R. C. S. ; MORETTI-FERREIRA, D. Síndrome de Down e Síndrome do X-Frágil (FRAXA) em um mesmo paciente. *In*: 45o Congresso Nacional de Genética, 1999, Gramado, RS. **Programa e Resumos do 45o Congresso Nacional de Genética**. p. 545, 1999.

102. KREMER, EJ, PRITCHARD, M, LYNCH, M, YU, S, HOLMAN, K e col. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CGG)n. **Science**, 252: 1711-1714, 1991.
103. LAGGERBAUER,B, OSTARECK, D, KEIDEL, FM, OSTARECK-LEDERER, A, FISCHER, U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. **Hum. Mol. Genet.**, 10: 329-338, 2001.
104. LEEHEY MA, MUNHOZ RP, LANG AE, BRUNBERG JA, GRIGSBY J, GRECO C, JACQUEMONT S, TASSONE F, LOZANO AM, HAGERMAN PJ, HAGERMAN RJ. The fragile X premutation presenting as essential tremor. **Arch. Neurol.**, 60(1):117-21, 2003.
105. LEWIN, B. **Genes VI**. Oxford University Press, Nova Iorque, 1260p, 1997.
106. LOESCH DZ, BUI QM, GRIGSBY J, BUTLER E, EPSTEIN J, HUGGINS RM, TAYLOR AK, HAGERMAN RJ. Effect of the fragile X status categories and the fragile X mental retardation protein levels on executive functioning in males and females with fragile X. **Neuropsychology**, 17(4):646-57, 2003.
107. LOESCH DZ, HUGGINS RM, BUI QM, EPSTEIN JL, TAYLOR AK, HAGERMAN RJ. Effect of the deficits of fragile X mental retardation protein on cognitive status of fragile x males and females assessed by robust pedigree analysis. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, 23(6):416-23, 2002.
108. LOESCH DZ, HUGGINS RM, BUI QM, TAYLOR AK, PRATT C, EPSTEIN J, HAGERMAN RJ. Effect of fragile X status categories and FMRP deficits on cognitive profiles estimated by robust pedigree analysis. **Am. J. Med. Genet. A.**, 122(1):13-23, 2003.
109. LOESCH DZ, HUGGINS RM, HAGERMAN RJ. Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**;10(1):31-41, 2004.
110. LUBS, HA. A marker X chromosome. **Am. J. Hum. Genet.**, 21: 231-244,1969.

111. LUGENBEEL, KA, PEIER, AM, CARSON, NL, CHUDLEY, AE, NELSON, DL. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. **Nat. Genet.** 10: 483-485, 1995.
112. MALTER, HE, IBER, JC, WILLEMSSEN, R, DE GRAAFF, E, TARLETON, LC e col. Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. **Nat. Genet.** 15: 165-169,1997.
113. MARTIN, J e BELL, J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. **Arch. Neurol. Psychiat.** 6: 154-157, 1943.
114. MCCONLOGUE L, BROW MA, INNIS MA. Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2'-deoxyguanosine. **Nucleic Acids Res.**, 16 (20):9869,1988.
115. MERENSTEIN, SA, SOBESKI, WE, TAYLOR, AK, RIDLLE, JE, TRAN, HX, HAGERMAN. **Molecular –clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation.** *In:* HAGERMAN, RJ e CRONISTER, A. Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research. 2a. Ed. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore , pp 3-87,1996.
116. MINGRONI-NETTO, RC, HADDAD, LA, VIANNA-MORGANTE, AM. The number of CGG repeats of the FMR1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism. **Am. J. Med. Genet.**, 64: 270-273, 1996.
117. MORTON, NE e MACPHERSN, JN. Population genetics of the fragile X syndrome: multiallelic model for the FMR1 locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89: 4215-4217, 1992.
118. NELSON, DL. **The fragile X mental retardation syndrome.** *In:* SHAW, DJ. Molecular Genetics of Human Inherited Disease. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, p91-116, 1995.
119. NIELSEN KB. Diagnosis of the fragile X syndrome (Martin-Bell syndrome). Clinical findings in 27 males with the fragile site at Xq28. **J. Ment. Defic. Res.**, (Pt 3):211-26, 1983.

120. NOLIN, SL, BROWN, WT, GLIKSMAN, A e col. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. **Am. J. Hum. Genet.** 72: 45-464, 2003.
121. OBERLÉ, I, HEILIG, R, MOISAN, JP, KLOEPFER, C, MATTEI, GM e col. Genetic analysis of the fragile X mental retardation syndrome with two flanking polymorphic DNA markers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 1016-1020, 1986.
122. OBERLÉ, I, ROUSSEAU, F, HEITZ, D, KRETZ, C, DEVYS, D e col. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science**, 252: 1097-1102, 1991.
123. O'DONNELL, WT e WARREN, ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. **Annu. Rev. Neurosci.** 25: 315-338, 2002.
124. OOSTRA, BA e WILLEMSSEN, R. FMR1 expression levels. **Hum. Mol. Genet. (Review)**, 12: 249-257, 2003.
125. OOSTRA, BA, JACKY, PB, BROWN, WT, ROUSSEAU, F. Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. National Fragile X Foundation. **J. Med. Genet.** 5:410-3, 1993.
126. OPTIZ, JM, WESTPHAL, JM, DANIEL, A. Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome. **Am. J. Med. Genet.** 17: 101-109, 1984.
127. PIERETTI, M, ZHANG, FP, FU, YH, WARREN, ST, OOSTRA, BA e col. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. **Cell.** 66: 817-822, 1991.
128. PLOMIN R, DEFRIES J C, MCCLEARN G E, MCGUFFIN P. **Behavioral genetics.** 4 ed. Worth Publishers, New York. 449p, 2001.
129. PORTO, C e GENTA, MB. **Psicodiagnóstico (testes psicológicos).** In: DIAMENT, A e CIPEL, S. Neurologia Infantil. Terceira edição, São Paulo: Editora Ateneu, , cap 9,p 75-82, 1996.

130. POZDNYAKOVA , I e REGAN, L. New insights into fragile X syndrome: relating genotype to phenotype at the molecular level. **FEBS J.** 272: 872-878, 2005.
131. PRICE, DK, ZHANG, F, ASHLEY, CT, WARREN, ST. The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CTT 5' untranslated repeat and encodes an RNA-binding protein. **Genomics.** 31: 3-12, 1996.
132. PRIMERANO B, TASSONE F, HAGERMAN RJ, HAGERMAN P, AMALDI F, BAGNI C. Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. **RNA.** 12:1482-8, 2002.
133. PROGENY DESKTOP 6 - Progeny Software, LLC. www.progeny2000.com.
134. PROUTY, LA, ROGERS, RC, STEVENSON, RE, DEAN, JH, PALMER, KK, SIMENSEN, RJ, COSTON, GN, SCHWARTZ, CE. Fragile X syndrome: growth, development, and intellectual function. **Am. J. Med. Genet.**, 30(1-2):123-42, 1988.
135. RAVEN, J.C. **Matrices progressivas. Escala Geral (Guide to using progressives matrices,** 1938. Londres,Lewis,HK) Trad.e adapt. CAMPOS, F. Rio de janeiro, CEPA, 1977.
136. REISS AL, FREUND L. Behavioral phenotype of fragile X syndrome: DSM-III-R autistic behavior in male children. **Am. J. Med. Genet.**; 43(1-2):35-46, 1992.
137. REISS, AL, FREUND, L, ABRAMS, MT, BOEHM, C, KAZAZIAN, H. Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: A controlled study. **Am. J. Hum. Genet.**, 52: 884-894, 1993.
138. REISS, A.L., HAGERMAN, R.J., VINOGRADOV, S., ABRAMS, M., KING, R.J. Psychiatric disability in female carriers of the fragile X chromosome. **Arch. Gen. Psychiatry,** 45: 25-30, 1988.
139. REYNIERS, E.; VITS, L.; DE BOULLE, K.; VAN ROY, B.; VAN VELZEN, D.; DE GRAAFF, E.; VERKERK, A. J. M. H.; JORENS, H. Z. J.; DARBY, J. K.; OOSTRA, B.; WILLEMS, P. J. : The full mutation in the FMR-1 gene

of male fragile X patients is absent in their sperm. **Nature Genet.** 4: 143-148, 1993.

140. RHOADS FA, OGLESBY AC, MAYER M, JACOBS PA. Marker X syndrome in an oriental family with probable transmission by a normal male. **Am. J. Med. Genet.** 12(2):205-17, 1982
141. RHOADS FA. X-linked mental retardation and fragile-X or marker-X syndrome. **Pediatrics.** 69(5):668-9, 1982.
142. ROGERS SJ, WEHNER DE, HAGERMAN R. The behavioral phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, 22(6):409-17, 2001.
143. ROJAS DC, BENKERS TL, ROGERS SJ, TEALE PD, REITE ML, HAGERMAN RJ. Auditory evoked magnetic fields in adults with fragile X syndrome. **Neuroreport.**, 12(11):2573-6, 2001.
144. ROSS, MT, GRAFHAM, DV, COFFEY, AJ, SCHERES, S, MCLAT, K, e col. The DNA sequence of the Human X chromosome. **Nature.** 434: 325-337, 2005.
145. SAETA, BRP e SOTO, SN. **Testes psicológicos na infância e na adolescência.** In: ASSUNÇÃO JR, F. *Psiquiatria da Infância e da Adolescência*, São Paulo, Editora Maltese, cap 11, p 89-99, 1994.
146. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T.; HRSG. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York., 1989.
147. SANTOS, FR, PENA, SD, EPPLEN, JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Hum. Genet.**, 90(6):655-6, 1993
148. SHAW, DJ. **Molecular Genetics of Human Inherited Disease.** John Wiley and Sons Ltd, Chichester, p92, 1995.

149. SHERMAN, S.L., MORTON, N.E., JACOBS, P.A. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. **Ann. Hum. Genet.**, 48 (1): 21, 1984.
150. SIOMI, H.; SIOMI, M. C.; NUSSBAUM, R. L.; DREYFUSS, G. : The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. **Cell**, 74: 291-298, 1993.
151. SIOMI, M. C.; ZHANG, Y.; SIOMI, H.; DREYFUSS, G.: Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. **Molec. Cell. Biol.**, 16: 3825-3832, 1996
152. SMITH, KT, COFFEE, B, REINES, D. Occupancy and synergistic activation of the FMR1 promoter by Nrf-1 and Sp1 in vivo. **Hum. Mol. Genet.**, 13: 1611-1621, 2004.
153. SNOW, K, DOUD, LK, HAGERMAN, RJ, PERGOLIZZI, RG, ERSTER, SH, THIBODEAU, SN. Analysis of a CGG sequence at the FMR1 locus in fragile X families and in the general population. **Am. J. Hum. Genet.**, 53: 1217-1228, 1993.
154. SOBESKI, WE, TAYLOR, BF, PENNINGTON, JE, RIDDLE, JE, HAGERMAN, RJ. **Molecular / clinical correlations in females with fragile X**. 7th International workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. Tromso, Noruega, 1995. In: HAGERMAN, RJ e CRONISTER, A. Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research. 2a. Ed. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore , pp 3-87,1996.
155. SOBESKY, WE, HULL, CE, HAGERMAN, RJ. Symptoms of schizotypal personality disorder in fragile X women J. **Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**. 33: 247-255, 1994.
156. STEVENSON, RE, SCHWARTZ, CE, SCHROER, RJ. **X Linked Mental retardation**. Oxford monographs on medical genetics (n 39). Oxford Univ. Press, New York, 422p, 2000.

157. SUDHALTER, V, MARANION, M, BROOKS, P. Expressive semantic deficit in the productive language of males with fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 43(1-2):65-71, 1992.
158. SUDHALTER, V, SCARBOROUGH, HS, COHEN, IL. Syntactic delay and pragmatic deviance in the language of fragile X males. . **Am. J. Med. Genet.**, 38(2-3):493-7, 1991.
159. SUTCLIFFE, JS, NELSON, DL, ZHANG, F, PIERETTI, M, CASKEY, CT, SAXE, D, WARREN, ST. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, 6:397-400, 1992.
160. SUTHERLAND, G.R. Marker X chromosome and mental retardation. **N. Engl. J. Med.**, 296: 1415, 1977.
161. SUTHERLAND, G.R., ASHFORTH, P.L.C. X-linked mental retardation with macro-orchidism and the fragile site at Xq27 or 28. **Hum. Genet.**, 48: 117, 1979.
162. TAMANINI, F, WILLEMSSEN, R, VAN UNEN, L, BONTEKOE, C, GALJAARD, H, OOSTRA, BA, HOOGEVEN, AT. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. **Hum. Mol. Genet.**, 6 (8): 1315-1322, 1997.
163. TASSONE F, HAGERMAN PJ. Expression of the FMR1 gene. **Cytogenet. Genome Res.**;100(1-4):124-8, 2003.
164. TASSONE F, HAGERMAN RJ, GARCIA-AROCENA D, KHANDJIAN EW, GRECO CM, HAGERMAN PJ. Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. **J. Med. Genet.**, 41(4):e43, 2004.
165. TASSONE, F, HAGERMAN, RJ, TAYLOR, AK, ANE, LW, GODFREY, TE, HAGERMAN, PJ. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in fragile X syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, 66: 6-15, 2000.
166. TASSONE, F, HAGERMAN, RJ, TAYLOR,AK, MILLS, JB, HARRIS, SW, GANE, LW, HAGERMAN, PJ. Clinical Involvement and Protein

Expression in Individuals With the FMR1 Premutation. **Am. J. Med. Genet.**, 91:144-152, 2000.

167. TASSONE, F., HAGERMAN, R. J., ILKÉ, D.N., DYER, P.N., LAMPE, M., WILLEMSSEN.R., OOSTRA, B.A., TAYLOR, A.K FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile x syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 84: 250-261, 1999.
168. TERRACIANO, A, CHIURAZZI, P, NERI, G. Fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet. Part C (Semin. Med. Genet.)**, 137C: 32- 37, 2005.
169. TERRACIANO, A, POMPONI, MG, MARINO, GME, CHIURAZZI, P, RINALDI, MM, DOBOSZ, M, NERI, G. Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. **Euro. J. Hum. Genet.** 12: 333-336, 2004.
170. THOMPSON, NM, GULLEY, ML, ROGENESS, GA, CLAYTON, RJ, JOHNSON, C e col. Neurobehavioral characteristics of CGG amplification status in fragile X females. **Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatric Genetics)** 54: 378-383, 1994.
171. TURNER, G., WEBB, T., WAKE, S., ROBINSON, H., Prevalence of fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, 64: 196-197, 1996.
172. VAN DER OUWELAND,AMW, DEELEN, WH, KUNST, CB, UZIELL, M-LG, NELSON, DL e col. Loss of mutation at the FMR1 locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes. **Hum. Mol. Genet.**, 3: 1823-1827, 1994.
173. VAN ESCH, H. The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. **Eur. J. Med Genet.**, 49: 1-8, 2006.
174. VERKERK, A.J.M.H., PIERETTI, M., SUTCLIFFE, J.S., FU, Y.-H., KUHL, D.P.A., PIZZUTI, A., REINER, O., RICHARD, S., VICTORIA, M.F., ZHANG, F., EUSSSEN, B.E., VAN OMMEN, G.J.B., BLONDEN, L.A.L., RIGGINS, G.J., CHASTAIN, J.L., KUNST, C.B., GALJAARD, H., CASKEY, C.T., NELSON, D.L., OOSTRA, B.A., WARREN, S.T., Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG coincident with a

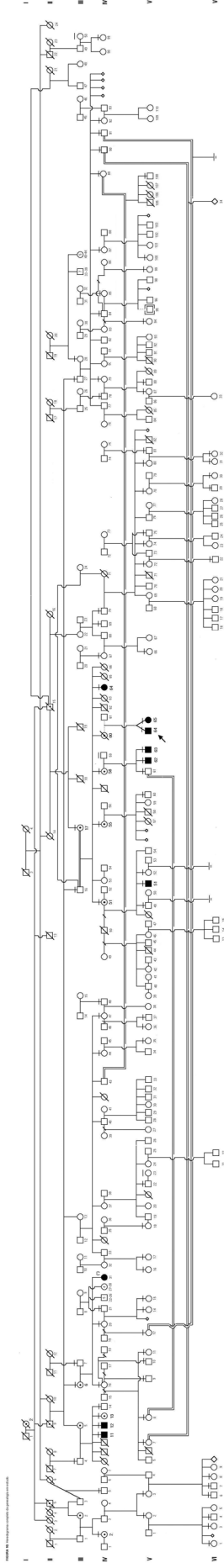
breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, 65: 905-914, 1991.

175. VILKMAN E, NIEMI J, IKONEN U. Fragile X speech phonology in Finnish. **Brain Lang.**, 34(2):203-21, 1988.
176. VINCENT A, HEITZ D, PETIT C, KRETZ C, OBERLE I, MANDEL JL. Abnormal pattern detected in fragile-X patients by pulsed-field gel electrophoresis. **Nature**, 349: 624-6, 1991.
177. WAN, L, DOCKENDORFF, TC, JONGENS, TA, DREYFUSS, G. Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster Homolog of the Fragile X Mental Retardation Protein. **Mol. Cell. Biol.**, 22: 8536–8547, 2000.
178. WANG, Y.-C.; LI, S.-Y. : Response to Vincent and Gurling. (Letter) **Hum. Mutat.** 12: 432 only, 1998.
179. WANG, Y.-C.; LIN, M.-L.; LIN, S. J.; LI, Y.-C.; LI, S.-Y. : Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome. **Hum. Mutat.**,. 10: 393-399, 1997.
180. WARREN ST, SHERMAN SL. **The Fragile X Syndrome**. *In*: SCRIVER, C. R., BEAUDET, A. L., SLY, W. S., AND VALLE, D., Editors. *Metabolic Basis Of Inherited Disease*, 8th Ed. New York: Mcgraw-Hill, 2001; Pp 257-1289.
181. WARREN, S. T.; KNIGHT, S. J. L.; PETERS, J. F.; STAYTON, C. L.; CONSALEZ, G. G.; ZHANG, F. P.: Isolation of the human chromosomal band Xq28 within somatic cell hybrids by fragile X site breakage. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 87: 3856-3860, 1990.
182. WARREN, S. T.; ZHANG, F.; LICAMELI, G. R.; PETERS, J. F.: The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of fragile sites. **Science** 237: 420-423, 1987.
183. WECHSLER, D. **Wechsler Intelligence Scale for Children (3^a ed.) (WISC-III)**: Manual. San Antonio: Psychological Corporation, 1991.

184. WILLEMSEM, R, HOOGEVEEN-WESTERVELD, M, RIES, S, HOLSTEGE, J, SEVERIJNEN, L, NIEUWENHUIZEN, IM, SCHRIER, M, MIENTJES, EJ, OOSTRA, BA. The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, 12: 949-959, 2003.
185. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The ICD-10 classification of mental and behavioral disorders: clinical descriptors and diagnostic guidelines**. Geneva: World Health Organization, 1992.
186. YU, S., PRITCHARD, M., KREMER, E., LYNCH, M., NANCARROW, J., BAKER, E., Holman, K., Mulley, J.C., Warren, S.T., Schlessinger, D., Sutherland, G.R., Richards, R.I. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. **Science**, 252: 1179-1181, 1991.
187. ZHANG, Y, O'CONNOR, JP, SIOMI, MC, SRINIVASAN, S, DUTRA, A, NUSSBAUM, RL, DREYFUSS, G. The fragile mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. **EMBO J.** 14: 5358-5366, 1995.
188. ZHANG, YQ, BAILEY, AM, MATTHIES, HJ, RENDEN, RB, SMITH, MA, SPEESE, SD, RUBIN, GM, BROADIE, K. Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. **Cell**, 107(5):591-603, 2001.
189. ZHANG, YQ, FRIEDMAN, DB, WANG, Z, WOODRUFF, E 3RD, PAN, L, O'DONNELL, J, BROADIE, K. Protein expression profiling of the drosophila fragile X mutant brain reveals up-regulation of monoamine synthesis. **Mol. Cell. Proteomics**, 3:278-90, 2005.
190. ZHANG, YQ, MATTHIES, HJ, MANCUSO, J, ANDREWS, HK, WOODRUFF, E 3RD, FRIEDMAN, D, BROADIE, K. The Drosophila fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis. **Dev. Biol.**, 270(2):290-307, 2004.

Heredograma

FIGURA 10: Heredograma completo da genealogia em estudo.



LEGENDA:

- ⊕ pre-mutação no gene FMR1
- ⊕^(*) síndrome de Down e mutação completa no gene FMR1
- ⊕ mutação completa no gene FMR1
- ⊕ gene FMR1 normal
- ⊕ portador(a) obrigatório de pré-mutação no gene FMR1

Anexos

ANEXO I:

Guias de correspondência entre a posição no heredograma e o número do caso, separados por geração.

Geração III

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 4 | 5 | 6 | 7 | 13 | 16 | 17 | 27 | 28 | 50 |
| Caso | 16 | 15 | 29 | 30 | 64 | 5 | 4 | 21 | 22 | 93 |

Geração IV

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 1 | 2 | 5 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 16 | 20 |
| Caso | 96 | 95 | 82 | 40 | 17 | 18 | 20 | 19 | 31 | 32 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 21 | 31 | 33 | 44 | 47 | 48 | 51 | 55 | 58 | 59 |
| Caso | 53 | 33 | 67 | 66 | 65 | 68 | 1 | 8 | 6 | 14 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 64 | 67 | 70 | 69 | 78 | 79 | 84 | 85 | 87 | 89 |
| Caso | 7 | 79 | 44 | 83 | 54 | 55 | 57 | 58 | 23 | 73 |

| | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 90 | 91 | 92 | 98 | 99 |
| Caso | 27 | 26 | 49 | 94 | 97 |

Geração V

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 2 | 3 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 | 14 | 15 | 16 |
| Caso | 90 | 88 | 37 | 38 | 39 | 42 | 36 | 34 | 35 | 51 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 17 | 18 | 19 | 22 | 23 | 35 | 36 | 37 | 38 | 49 |
| Caso | 52 | 76 | 74 | 77 | 78 | 75 | 70 | 72 | 71 | 41 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 51 | 52 | 54 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 |
| Caso | 2 | 28 | 3 | 9 | 80 | 10 | 12 | 13 | 107 | 11 |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 66 | 72 | 74 | 75 | 78 | 80 | 81 | 87 | 88 | 94 |
| Caso | 100 | 43 | 47 | 46 | 87 | 85 | 81 | 62 | 56 | 61 |

| | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| Posição | 96 | 98 | 99 | 100 | 108 | 110 |
| Caso | 60 | 59 | 24 | 25 | 69 | 50 |

Geração VI

| | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| Posição | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 22 | 24 |
| Caso | 101 | 102 | 92 | 91 | 103 | 104 | 105 | 89 | 45 | 48 |

| | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Posição | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 |
| Caso | 98 | 99 | 106 | 86 | 63 |

ANEXO II:

Guia de correspondência entre o número do caso e a posição no heredograma.

| Caso | Posição |
|-------------|----------------|
| 1 | IV-51 |
| 2 | V-51 |
| 3 | V-54 |
| 4 | III-17 |
| 5 | III-16 |
| 6 | IV-58 |
| 7 | IV-64 |
| 8 | IV-55 |
| 9 | V-59 |
| 10 | V-61 |
| 11 | V-65 |
| 12 | V-62 |
| 13 | V-63 |
| 14 | IV-59 |
| 15 | III-5 |
| 16 | III-4 |
| 17 | IV-11 |
| 18 | IV-12 |
| 19 | IV-14 |
| 20 | IV-13 |
| 21 | III-27 |
| 22 | III-28 |
| 23 | IV-87 |
| 24 | V-99 |
| 25 | V-100 |
| 26 | IV-91 |
| 27 | IV-90 |
| Caso | Posição |

| 28 | V-52 |
|-------------|----------------|
| 29 | III-6 |
| 30 | III-7 |
| 31 | IV-16 |
| 32 | IV-20 |
| 33 | IV-31 |
| 34 | V-14 |
| 35 | V-15 |
| 36 | V-12 |
| 37 | V-7 |
| 38 | V-8 |
| 39 | V-9 |
| 40 | V-10 |
| 41 | V-49 |
| 42 | V-11 |
| 43 | V-72 |
| 44 | IV-70 |
| 45 | VI-22 |
| 46 | V-75 |
| 47 | V-74 |
| 48 | VI-24 |
| 49 | IV-92 |
| 50 | V-110 |
| 51 | V-16 |
| 52 | V-17 |
| 53 | IV-21 |
| 54 | IV-78 |
| Caso | Posição |
| 55 | V-79 |

| 56 | V-88 |
|-------------|----------------|
| 57 | IV-84 |
| 58 | IV-85 |
| 59 | V-98 |
| 60 | V-96 |
| 61 | V-94 |
| 62 | V-87 |
| 63 | VI-33 |
| 64 | III-13 |
| 65 | IV-47 |
| 66 | IV-44 |
| 67 | IV-33 |
| 68 | IV-48 |
| 69 | V-108 |
| 70 | V-36 |
| 71 | V-38 |
| 72 | V-37 |
| 73 | IV-89 |
| 74 | V-19 |
| 75 | V-35 |
| 76 | V-18 |
| 77 | V-22 |
| 78 | V-23 |
| 79 | IV-67 |
| 80 | V-60 |
| 81 | V-81 |
| Caso | Posição |
| 82 | IV-5 |
| 83 | IV-69 |

| | |
|-----|--------|
| 85 | V-80 |
| 86 | VI-32 |
| 87 | V-78 |
| 88 | V-3 |
| 89 | VI-9 |
| 90 | V-2 |
| 91 | VI-5 |
| 92 | VI-4 |
| 93 | III-50 |
| 94 | IV-98 |
| 95 | IV-2 |
| 96 | IV-1 |
| 97 | IV-99 |
| 98 | VI-29 |
| 99 | VI-30 |
| 100 | V-66 |
| 101 | VI-1 |
| 102 | VI-3 |
| 103 | VI-6 |
| 104 | VI-7 |
| 105 | VI-8 |
| 106 | VI-31 |
| 107 | V-64 |

*...Acho que sou
muito menos voltado para o
passado do que para o futuro.*

Ilya Prigogine
