Investigação de alteração no gene FMR1 e correlação com as alterações clínicas em indivíduos com diagnóstico de Síndrome de X-Frágil

Amanda Escher Chagas[1] (IC)*, Jeovana Souza Cardoso[2] (IC), Thaís Cidália Vieira Gigonzac[3,4] (PQ), Marc Alexandre Duarte Gigonzac[3,4] (PQ)

[1] Fisioterapia, PVIC - Programa Voluntário de Iniciação Científica da UEG, Escola Superior de Educação Física e Fisioterapia do Estado de Goiás, amandaechagas@gmail.com
[2] Fisioterapia, PVIC - Programa Voluntário de Iniciação Científica da UEG, Escola Superior de Educação Física e Fisioterapia do Estado de Goiás
[3] Docente, Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, GO
[4] Pesquisador (a), Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/LaGene/SES-GO

Introdução: Os portadores da Síndrome do X-Frágil (SXF) apresentam amplo espectro de características clínicas que podem se diferir entre pacientes com a pré-mutação e com mutação completa.
Objetivo: Analisar as principais alterações clínicas em pacientes com a SXF atendidos no sistema único de saúde e associá-las ao tipo de mutação no gene FMR1.
Materiais e métodos: Foram estudados 20 pacientes encaminhados por médicos assistentes das redes municipal e estadual de saúde ao LaGene (SES-GO) que possuíram indicação clínica de SXF. Analisou-se as alterações genotípicas através da padronização de reações de PCR, capaz de detectar mutações completas e pré-mutações. Realizou-se então, a correlação com as alterações fenotípicas descritas no encaminhamento médico.
Resultados: Dentro da amostra, 15% dos indivíduos obtiveram confirmação da alteração genotípica pelo LaGene (SES-GO). Os pacientes com mutação completa dos alelos apresentaram como indicação clínica o transtorno do espectro autista (TEA) e a deficiência intelectual, além de estigmas e histórico familiar. Enquanto que o paciente com pré-mutação apresentou dismorfismos faciais e TEA.
Conclusão: A manifestação desta condição genética é bastante heterogênea devido a variabilidade fenotípica e, portanto, uma análise que relacione os tipos de mutação com as principais alterações clínicas mostra-se uma ferramenta eficiente e auxiliadora do rastreamento clínico.

Palavras-chave: Síndrome x-frágil. Diagnóstico. Doenças genéticas.

Introdução

O estudo, monitoramento e método diagnóstico das doenças genéticas tiveram importante avanço nos últimos anos. Porém, os defeitos congênitos ainda apresentam relevância crescente como causa de prejuízo e de sofrimento à saúde da população sendo que, no Brasil, os impactos das doenças genéticas vêm aumentando progressivamente. Portanto, obter a confirmação laboratorial das enfermidades de origem genética é fundamental para a associação e correlação às características clínicas apresentadas pelo paciente. Além permitir obter a detecção e tratamento precoce, prevenção da ocorrência, atendimento dos problemas uma vez

ocorridos, prevenção das complicações e minimização dos danos com um atendimento multidisciplinar (HOROVITZ; LLERENA; MATTOS, 2005).

Reconhecendo a importância da identificação e confirmação de condições genéticas relacionadas à indicação clínica, trazemos à tona especificadamente a Síndrome do X-Frágil, por ser considerada a principal etiologia hereditária e a segunda fonte genética de Deficiência Intelectual (DI), além de ter uma ocorrência significativa em homens de 1: 2500 a 1: 4000, sendo responsável por 4% a 8% de todos os casos de deficiência intelectual no sexo masculino (YONAMINE, 2001).

A Síndrome do X Frágil (SXF) é majoritariamente associada à expansão de uma sequência de trinucleotídeos (Citosina, Guanina, Guanina) presentes na região promotora do gene FMR1, situado no lócus Xq27.329. Em indivíduos normais, as repetições CGG dispõem de 6 a 54 unidades, indivíduos que apresentam uma expansão de 50 até 200 repetições apresentam uma pré-mutação e pacientes com mais de 200 repetições possuem a mutação completa. O gene FMR1 codifica a proteína FMRP, que se liga ao RNAm, e sua ação reguladora da transcrição-tradução é essencial na maturação e função das sinapses. A mutação completa impede a expressão da proteína FMR1 através da metilação da região promotora e resulta na síndrome em indivíduos afetados (NOLIN, SAH, GLICKSMAN *et al*, 2013; VASCONCELOS, 2004).

Os portadores de SXF apresentam amplo espectro de transtornos de linguagem, comportamento e aprendizagem, além disso, a mutação do gene FMR1 representa uma das maiores causas genética de transtornos globais do desenvolvimento (TGD) conhecidas até o presente. As características clínicas podem se diferir entre pacientes com a pré-mutação e com a mutação completa. Os pacientes diagnosticados com a síndrome apresentam com maior frequência quadros clínicos de DI, história familiar de DI ou autismo, hiperextensibilidade articular, macroquidismo, face alongada, orelhas grandes, contato ocular pobre, hiperatividade, comportamento autista like, dentre outros (RAMOS; PILLA; BRUNONI, 2013).

Quanto às características físicas, alguns indícios nos recém-nascidos podem antecipar uma suspeita precoce da síndrome, como a macrocefalia e hipotonia. Em

jovens e adultos essas características estarão mais bem marcadas no sexo masculino, sendo que os indivíduos apresentarão rosto alongado e estreito com leve projeção da mandíbula para frente, orelhas proeminentes com implantação mais baixa e macrorquidia após a puberdade. Clinicamente, as mulheres com a síndrome não apresentam alterações importante, pode-se dizer de um modo geral que a maioria das mulheres são assintomáticas, tendo a maior queixa em relação ao baixo desenvolvimento intelectual (MARTINS, 2005).

A variabilidade nas apresentações clínicas torna essa síndrome peculiar e incentiva a elaboração e aprimoramento de testes qualitativos para identificar os tipos de mutações no gene FMR1 dos pacientes e associá-las ao conjunto de sinais clínicos apresentados, sendo este, o objetivo do presente estudo.

Material e Métodos

Os pacientes foram encaminhados por médicos assistentes das redes municipal e estadual de saúde ao LaGene (SES-GO). Após esclarecimentos sobre o projeto, os pacientes foram convidados a participar do estudo que atende a todos os itens da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (PUC). A amostra foi composta por 20 pacientes. Os responsáveis legais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) permitindo a participação do paciente no projeto.

Para a análise genética das alterações genotípicas foram colhidas amostras de 5mL de sangue periférico de cada paciente. A extração de DNA foi feita através do Kit de extração de DNA QIAamp®DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). A quantificação da concentração de DNA foi realizada em um espectrofotometro NanoVueTM Plus (GE Healthcare Life Sciences). Ambos os procedimentos seguiram o protocolo sugerido pelo fabricante.

Após a extração do DNA, foram padronizadas reações de PCR com iniciadores específicos, de acordo com o conjunto de reagentes comerciais AmplideX® FMR1 PCR (Asuragen®), seguindo as instruções do fabricante. Esse ensaio é específico para a detecção de repetições CGG do gene FMR1, sendo capaz de detectar mutações completas até mais de 1300 repetições CGG, além das

pré-mutações. Após as reações de PCR, foi padronizada e realizada uma corrida eletroforética em capilar de 36 cm através de um analisador genético (ABI- 3500, Applied Biosystems®).

Os resultados gerados no analisador genético foram exportados para o Software GeneMarker®, versão 2.6.2, da SoftGenetics®. Neste, foram calibrados os padrões de corrida capilar (ROX 1000) e configurado para análise de fragmentos de sequências repetitivas CGG no gene FMR1. Os eletroferogramas gerados foram então analisados e plotados em planilhas do Excel® (Microsoft Office 365®) para devida determinação genotípica e correlação com as alterações clínicas feitas no encaminhando pelos médicos assistentes das redes municipal e estadual de saúde ao LaGene (SES-GO).

Resultados e Discussão

Para a seleção dos participantes da pesquisa utilizou-se como critério de inclusão os pacientes que foram encaminhados desde o ano de 2014, via Sistema Único de Saúde (SUS), com indicação clínica da Síndrome de X Frágil. Foram excluídos todos aqueles pacientes que possuíam a ficha de identificação incompleta e resultados inconclusivos de X Frágil.

Ao todo foram selecionados vinte pacientes, dos quais sete são do sexo feminino e treze do sexo masculino, como podemos ver na figura 1, as idades variam entre três e dezoito anos, sendo que a média etária é de 9,5 anos.

Figura 1- Divisão da amostra por sexo

A amostragem predominantemente masculina é justificada por Martins (2005) pois, a Síndrome do X-frágil é uma condição ligada ao cromossomo X, o que justifica a maior incidência da síndrome em pacientes do sexo masculino, já que há apenas um cromossomo X, este será defeituoso e não haverá outro cromossomo sadio para compensar, diferentemente das mulheres. Sendo que a expressão fenotípica é menos comum, e mais branda, em indivíduos do sexo feminino.

Em relação à etnia, no presente estudo, têm-se majoritariamente pacientes caucasianos, onze, apenas um negro e oito pacientes pardos. Um estudo feito por Bagni, *et al* (2012), mostrou que a prevalência de pré-mutação difere em vários grupos étnicos, sendo maior em pessoas de descendência europeia mista em comparação com afro-americanos e hispânicos (tanto para homens quanto para mulheres).

As indicações clínicas dos pacientes do presente estudo que apontaram que a suspeita da síndrome foram principalmente a deficiência intelectual, o retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, a face típica, a presença de manias e o histórico familiar.

O comportamento de pacientes com SXF normalmente inclui o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), com impulsividade e ansiedade significativas, bem como comportamentos que incluem linguagem repetitiva, e as manias, que podem aparecer em comportamentos de estereotipias de mão, balanço e às vezes batidas de cabeça (BAGNI *et al*, 2012). Os homens afetados apresentam diferentes níveis de sintomas que variam de leves a graves e em um estudo mais recente, os autores Luo, Wu e Duan (2016) trazem que os sintomas mais frequentemente alvo de tratamento nos homens incluem ansiedade, atenção, hiperatividade e raiva ou agressão.

Além disso, notou-se que o autismo está, com frequência relacionado aos pacientes com a Síndrome do X Frágil. De acordo com Rosot, Franco e Riechi (2017) os indivíduos com a SXF que apresentam comportamentos autísticos são mais afetados cognitivamente, apresentar ou não tais comportamentos possui um estreito efeito na compreensão verbal, vocabulários e raciocínio matricial.

Em um estudo de Boy *et al* (2001), o relato de casos familiares de retardo mental compatíveis com herança ligada ao cromossomo X foi observado em 100% dos pacientes com a síndrome do X frágil. Os autores Lozano, Rosero, Hagerman (2014) reforçam que as mutações do FMR1 são dinâmicas, pois geralmente se expandem entre gerações, especialmente quando transmitidas por uma mulher a seus filhos, quando ela pode se expandir de uma pré-mutação para uma mutação completa.

A chamada face típica, são características pertencentes ao fenótipo físico da Síndrome do X Frágil, há quatro que são consideradas principais e estão presentes na maioria dos homens afetados são elas a face alongada com fronte e queixo salientes, orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações e macroorquidismo, em geral após a puberdade (ROSOT, FRANCO e RIECHI, 2017). A presença de dismorfismos faciais aparece como forte indicativo clínico para o encaminhamento para análise genética e confirmação da síndrome.

Dos vinte pacientes investigados a partir do encaminhamento com indicação clínica da síndrome, apenas três obtiveram a confirmação genética da alteração genotípica, confirmando a presença da síndrome. Destes, todos são do sexo masculino e possuem TEA, sendo que dois pacientes apresentaram resultado de mutação completa de alelos, um com 249 repetições e outro com 233 repetições. Apenas um paciente apresentou uma pré-mutação de alelos com 134 repetições, como visto na tabela 1.

Paciente	Idade	Mutação	Indicação Clínica
P1	16 anos	Completa	TEA; Deficiência Intelectual; Estigmas
P2	18 anos	Completa	TEA; Deficiência Intelectual; Histórico familiar
P3	15 anos	Pré-mutação	TEA; Face típica.

Tabela 1 - Relação dos pacientes com Síndrome do X Frágil

Dentro deste estudo, apesar de uma amostra ainda pequena, percebeu-se que 15% dos indivíduos com indicação clínica obtiveram confirmação genética da alteração genotípica pelo LaGene (SES-GO). Sendo que 65% dos pacientes foram do sexo masculino, resultado que corrobora para demais estudos que apresentam a incidência maior nos homens. Os pacientes com mutação completa dos alelos (repetição acima de 200) apresentaram como indicação clínica a presença de TEA, deficiência de intelectual, agregando a isso a presença de estigmas e o histórico familiar. Enquanto que o paciente com pré-mutação (50 até 200 repetições) teve como indicação clínica a presença de dismorfismos faciais, TEA e não apresentou deficiência intelectual.

Segundo Lozano, Rosero e Hagerman (2014) o nível de FMRP correlaciona-se diretamente com o QI. Pacientes do sexo masculino com a mutação completa com alelos não metilados ou apenas parcialmente metilados produzem mais FMRP do que aqueles com alelos totalmente metilado. Os níveis mais altos de FMRP explicam o QI tipicamente mais alto (acima de 70) em indivíduos com alta função e SXF. Portanto, as células de mutação completas têm um déficit de FMRP e as células de pré-mutação produzem um excesso de RNAm de FMR1, levando à toxicidade do mRNA, mas níveis relativamente normais de FMRP.

Outro achado comum em pacientes portadores da pré-mutação do gene FMR1 é a FXTAS (Síndrome de Tremor e Ataxia associada ao X frágil), sendo uma doença neurodegenerativa de início tardio que afeta principalmente homens acima dos 50 anos de idade (CAPELI, 2010). O paciente que apresenta a pré-mutação, no presente estudo, não apresenta a FXTAS devido à baixa idade, mas o teste genético e o diagnóstico precoce da SXF apresentam-se como forte referência preditiva.

Em geral, as habilidades adaptativas diminuem na SXF da adolescência para a idade adulta. Isso enfatiza a importância da intervenção precoce com programas comportamentais e cognitivos intensivos e tratamentos direcionados para melhorar ou prevenir o declínio cognitivo (LOZANO, ROSERO E HAGERMAN, 2014).

Considerações Finais

O estudo possibilitou analisar as principais características clínicas presentes nos pacientes com suspeita da Síndrome do X Frágil que levam os médicos atendentes a encaminha-los para a análise genética para confirmar o diagnóstico. Os critérios são variáveis devido a variabilidade fenotípica que os indivíduos possam apresentar e, portanto, uma análise que relacione os tipos de mutação com as principais alterações clínicas mostra-se uma ferramenta eficiente e auxiliadora do rastreamento clínico.

É válido ressaltar que a manifestação desta condição genética é bastante heterogênea, e apesar das características fenotípicas serem avaliadas de forma isolada não devem ser desconsiderados outros fatores que possam contribuir na intervenção terapêutica.

A análise genética, juntamente com o diagnóstico clínico precoce atua como uma forte referência preditiva que permite uma intervenção terapêutica assertiva e o mais breve possível, além de fornecer a possibilidade do aconselhamento familiar quanto aos aspectos genéticos. Portanto, enfatiza-se a necessidade de mais estudos na área com propósito de investigar as correlações entre genótipo e fenótipo na SXF para melhor compreensão da síndrome.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Estadual de Goiás, ao LaGene (SES-GO), ao professor orientador Marc Gigonzac e à professora Thaís Cidália Vieira Gigonzac por permitir e auxiliar no desenvolvimento e contribuição deste estudo para a comunidade acadêmica.

Referências

BAGNI, C. *et al*. Fragile X Syndrome: Causes, Diagnosis, Mechanisms, and Therapeutics. **Journal of Clinical Investigation** 122.12: 4314–4322, 2012.

BOY, R. *et al*. Síndrome do X frágil: estudo caso-controle envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. **Arq. Neuro-**

Psiquiatr., São Paulo, v. 59, n. 1, p. 83-88, mar. 2001. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2001000100017&lng=en&nrm=iso>. Access on 03 July 2018. http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2001000100017.

CAPELLI, L. P. *et al*. The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). **Arq. Neuro-Psiquiatr**., São Paulo, v. 68, n. 5, p. 791-798, Oct. 2010.

HOROVITZ, D. D. G.; LLERENA JR., J. C.; MATTOS, R. A. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 1055-1064, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2005000400008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 22 Mar, 2017.

LUO, S., WU, L., DUAN, R. Molecular medicine of fragile X syndrome: based on known molecular mechanisms. **World Journal of** Pediatrics. Volume 12, Issue 1, pp 19–27, 2016.

LOZANO, R, ROSERO, C. A., HAGERMAN, R. J. Fragile X spectrum disorders. **Intractable & rare diseases research**, 3(4), 134-146, 2014.

MARTINS, M. S. A. Síndrome do X frágil. **Revista Nucleus**, Ituverava, v.3, n.2, maio/nov, 2005.

NOLIN, S. L., SAH, S., GLICKSMAN, A., *et al*. Fragile X AGG Analysis Provides New Risk Predictions for 45–69 Repeat Alleles. **American journal of medical genetics** Part A. 2013;0(4):771-778. doi:10.1002/ajmg.a.35833.

RAMOS, M. A. P., PILLA, A. L., BRUNONI, D. Deficiência Intelectual. In: LOPES, A. C. **Clínica médica: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2013.

ROSOT, N., FRANCO, V. D. F., RIECHI, T. I. J. S. A Síndrome do X Frágil e o estabelecimento de fenótipos cognitivo-comportamentais: uma revisão sistemática de literatura. **Ciências & Cognição**, v. 22(1), pp. 030-040, 2017.

VASCONCELOS, M. M. Retardo Mental. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80 (2 Supl):S71-S82:Mental retardation, developmental delay, neurogenetics, cerebral plasticity, 2004. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/%0D/jped/v80n2s0/v80n2Sa09.pdf>. Acesso em: 22 mar, 2017.

YONAMINE, S. M. **A comunicação em indivíduos com a síndrome do cromossomo X frágil.** Campinas: Faculdade Ciências Médicas, 2001. Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Campinas, São Paulo, 2001. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000212252>. Acesso em: 22 Mar, 2017.