



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ**

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS RARAS EM SÍNDROME DO X FRÁGIL**

**CURITIBA**

**2019**

**ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ**

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS RARAS EM SÍNDROME DO X FRÁGIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Roberto Hirochi Herai

**CURITIBA**

**2019**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

Cruz, Ana Carolina Pinto da  
C857i Identificação de variantes genéticas raras em síndromes do X frágil / Ana  
2019 Carolina Pinto da Cruz ; orientador: Roberto Hirochi Herai. – 2019.  
54 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2019  
Bibliografia: f. 89-100

1. Genética médica. 2. Síndrome do cromossomo X frágil. 4. Doenças raras.  
I. Herai, Roberto Hirochi. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 616.042



## **AGRADECIMENTOS**

À PUCPR, pelo espaço e estrutura cedida para a realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Roberto H. Herai, pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

À Sabrina P. Muggiati, Rafaela P. M. Kaesemodel, Luz María Romero, Vanessa Schubert e Laís Seben do Instituto Lico Kaesemodel pela parceria firmada ao longo deste projeto.

A todos os colegas do Laboratório Experimental Multiusuário, em especial Adriano Ferrasa, Irenice Cairo da Silva, Alessandro Afornali, Eduardo B. Cunha e Bruno Guerra, pelo apoio, incentivo, dedicação e principalmente por facilitar o desenvolvimento dos experimentos, fornecendo materiais, suporte técnico e conhecimento científico.

Ao Laboratório de Células Tronco da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD, USA) pela colaboração essencial neste trabalho. Em especial, agradeço às pesquisadoras Dra. Fernanda Cugola e Dra. Angela Macia Ortega por terem realizado o sequenciamento genético e a Dra. Isabela Fernandes, Dr. Alysson R. Muotri e MSc. Dylan Phan pela colaboração na elaboração de artigos científicos.

Agradeço à Dra. Janaina Sena de Souza do Laboratório de Neurociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Agradeço a todas as famílias participantes desta pesquisa, pois sem a ajuda, compreensão e colaboração delas este trabalho não seria possível.

## RESUMO

**Introdução:** A Síndrome do X Frágil (SXF) é uma condição do neurodesenvolvimento que afeta principalmente a interação social, o aprendizado e a coordenação motora. Sua principal causa é uma expansão da repetição CGG na região 5'UTR do gene *FMR1*, que afeta a produção e funcionamento normal da proteína FMRP. Para o diagnóstico da SXF, é realizado um teste genético que limita-se à contagem de repetições do trinucleotídeo CGG no gene *FMR1*, e desta forma impossibilitando a detecção de variantes genéticas deletérias em outras regiões deste gene. **Objetivo:** Detectar variantes genéticas raras no gene *FMR1* em indivíduos com características fenotípicas da SXF e que não apresentam mutação completa de repetições CGG. **Metodologia:** A população desta pesquisa foi reunida em parceria com o Instituto Lico Kaesemodel (ILK), que permitiu a coleta de dados (referente às características físicas e comportamentais) de 167 fichas cadastrais de indivíduos geneticamente positivos e 54 de indivíduos negativos para a SXF. A coleta destes dados permitiu identificar as características mais frequentes nos 167 indivíduos positivos e foram utilizados para a construção de um *checklist* para avaliar a ocorrência em potencial de SXF em indivíduos que apresentam características da síndrome. O *checklist* foi utilizado para avaliar e selecionar probandos com teste genético negativo, e que posteriormente foram submetidos à coleta de saliva/raspagem bucal. Em seguida, foi extraído DNA das amostras e realizado sequenciamento dos éxons juntamente com as regiões de junção éxon/intron do gene *FMR1*. Os dados sequenciados foram analisados por ferramentas de bioinformática. **Resultados:** A análise de frequência de características dos 167 indivíduos positivos, permitiu observar que déficit de atenção, ansiedade, estereotípias, deficiência intelectual, fala perseverante, hiperatividade e histórico familiar de deficiência intelectual foram observados em mais 63% da população. A partir da classificação das características analisadas foi desenvolvido um *checklist* que permite indicar, a partir do uso de um intervalo de confiança ( $score \geq 42,97$ ), se uma pessoa com as características da síndrome deve ou não realizar o teste genético. Para tal, *checklist* proposto foi aplicado nos indivíduos negativos, e permitiu selecionar 33 indivíduos para posterior sequenciamento e análise do gene *FMR1*. A análise *in silico* de tais dados permitiu identificar 10 variantes raras em 9 probandos distintos. Dentre as variantes encontradas, reportamos pela primeira vez a substituição c.631-2A>C. A variante c.631-2A>C é predita como deletéria pois causa problemas no reconhecimento do sítio receptor de *splicing*. **Conclusões:** Esta pesquisa permitiu identificar variantes genéticas raras no gene *FMR1* que enriquecerão o conhecimento genético a respeito da síndrome, e que poderão ser utilizadas para diagnósticos futuros após serem confirmadas como causais da SXF.

Palavras-chave: Síndrome do X Frágil; gene *FMR1*; variantes genéticas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Fragile X syndrome (FXS) is a neurodevelopmental condition that affects social interaction, learning and motor coordination. Its main cause is an expansion of the CGG repeat in the 5'UTR region of the *FMR1* gene, affecting the production and normal functioning of the FMRP protein. For the diagnosis of SXF, a genetic test that is limited to the counting of repetitions of the CGG trinucleotide in the *FMR1* gene is made, and this way it is impossible to detect deleterious genetic variants in other regions of this gene.

**Objective:** Detect rare genetic variants in *FMR1* gene on individuals with phenotypic characteristics of FXS and that do not present complete mutation of CGG repetitions.

**Methodology:** The population of this research was gathered in partnership with the Lico Kaesemodel Institute (ILK), which allowed the collection of data (referring to physical and behavioral characteristics) of 167 registration records of genetically positive individuals and 54 of individuals negative for FXS. The collection of these data allowed to identify the most frequent characteristics in 167 positive individuals and were used to construct a checklist to evaluate the potential occurrence of FXS in individuals with symptoms of the syndrome. The checklist was used to evaluate and select probands with negative test, which were submitted to collection of saliva/buccal scraping. Subsequently, DNA was extracted from the samples and sequenced of all exons along with the exon / intron junction regions of the *FMR1* gene. Sequenced data were analyzed by bioinformatics tools.

**Results:** The frequency analysis of symptoms of the 167 positive individuals showed that attention deficit, anxiety, stereotypies, intellectual disability, persistent speech, hyperactivity and family history of intellectual disability were observed in 63% of the population. From the classification of the characteristics analyzed, we developed a checklist that allows us to indicate, from the use of a confidence interval (score  $\geq 42.97$ ), whether a person with the characteristics of the syndrome should perform the genetic test. For such, the proposed checklist was applied to the negative individuals, and allowed the selection of 33 individuals for subsequent sequencing and analysis of the *FMR1* gene. *In silico* analysis of these data allowed to identify 10 rare variants in 9 different probands. Among the variants found, we first reported the change c.631-2A> C. The variant c.631-2A>C is predicted as deleterious because it causes problems in the recognition of the splicing receptor site.

**Conclusions:** This research allowed the identification of rare genetic variants in the *FMR1* gene that will enrich the genetic knowledge about the syndrome, and which could be used for future diagnoses after being confirmed as causes of FXS.

Keywords: Fragile X syndrome; *FMR1* gene; genetic variants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Características observadas na Síndrome do X Frágil.....	14
Figura 2	- Representação da transcrição e tradução do gene <i>FMR1</i> nos diferentes comprimentos de repetição CGG e desfecho clínico.....	18
Figura 3	- <i>Locus</i> do gene <i>FMR1</i> indicando as variantes pontuais identificadas pela RSL.....	22
Figura 4	- Localização das variantes genéticas encontradas ao longo da proteína FMRP em indivíduos com SXF ou com fenótipos correlatos.....	23
Figura 5	- <i>Locus</i> do gene <i>FMR1</i> indicando as deleções identificadas pela RSL..	27
Figura 6	- Exemplos de resultados de testes moleculares de rotina para análise de repetições CGG.....	33
Figura 7	- Frequência das características observadas nos 167 indivíduos geneticamente positivos para SXF.....	39
Figura 8	- Distribuição dos valores de <i>score</i> na população positiva (167 indivíduos).....	41
Figura 9	- Distribuição dos valores de <i>score</i> na população positiva (167 indivíduos) e negativa (54 indivíduos) para SXF.....	44
Figura 10	- <i>Locus</i> do gene <i>FMR1</i> e suas respectivas isoformas de <i>splicing</i> dos transcritos codificantes de proteína.....	49
Figura 11	- Descrição das etapas realizadas para seleção dos indivíduos participantes desta pesquisa.....	50
Figura 12	- Relação do número de amostras que amplificaram para cada primer utilizado na amplificação dos éxons do gene <i>FMR1</i> .....	55
Figura 13	- Frequência das variantes genéticas encontradas no gene <i>FMR1</i> de 9 indivíduos não portadores de mutação completa e com características relacionadas a SXF.....	58



Figura 14	- Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do éxon 8 do gene <i>FMR1</i> .....	64
Figura 15	- Localização da variante c.631-2A>C responsável por uma substituição intrônica que afeta o sítio receptor de <i>splicing</i> .....	65
Figura 16	- Análise <i>in silico</i> da alteração na função de <i>splicing</i> provocada pela substituição c.631-2A>C por meio das ferramentas de predição Nnsplíce e <i>Human Splicing Finder</i> .....	68
Figura 17	- Esquema demonstrando o gene <i>FMR1</i> com o evento de <i>splicing</i> ocorrendo normalmente e alterado.....	69
Figura 18	- Eletroferograma de três participantes correspondente ao sequenciamento do íntron 13 do gene <i>FMR1</i> .....	71
Figura 19	- Localização da variante c.1276-93A>T responsável por uma substituição no íntron 13 do gene <i>FMR1</i> .....	72
Figura 20	- Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do éxon 17 (3'UTR) do gene <i>FMR1</i> .....	73
Figura 21	- Localização da variante c.*162A>T responsável por uma substituição na região regulatória 3'UTR do gene <i>FMR1</i> .....	74
Figura 22	- Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do éxon 3 do gene <i>FMR1</i> .....	77
Figura 23	- Localização da variante c.15-8A>C responsável por uma substituição no íntron 2 do gene <i>FMR1</i> .....	78
Figura 24	- Análise <i>in silico</i> da alteração na função de <i>splicing</i> provocada pela substituição c.105-8A>C por meio das ferramentas de predição Nnsplíce <i>Human Splicing Finder</i> .....	80
Figura 25	- <i>Splicing</i> do pré-mRNA com a formação de <i>ariat</i> .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Fenótipo observado nos indivíduos com variantes que alteraram as sequências de aminoácidos da proteína FMRP.....	23
Tabela 2	- Relação dos casos de mosaicismos envolvendo deleções encontrados na literatura.....	28
Tabela 3	- Características encontradas em SXF e consideradas em seis <i>checklists</i> descritos na literatura.....	31
Tabela 4	- Descrição das informações obtidas a partir das fichas dos indivíduos cadastrados no Instituto Lico Kaesemodel.....	37
Tabela 5	- <i>Checklist</i> proposto com Pesos para cada característica da população positiva para SXF.....	40
Tabela 6	- Isoformas de <i>splicing</i> do gene <i>FMR1</i> descritas na base RefSeq.....	44
Tabela 7	- Primers desenhados com utilização da ferramenta Primer3 para amplificação dos éxons do gene <i>FMR1</i> .....	44
Tabela 8	- Indivíduos selecionados com base no <i>score</i> gerado pelo <i>checklist</i> criado ( $\geq 42,97$ ) .....	51
Tabela 9	- Relação das características mais frequentes na população geneticamente positiva e negativa para SXF.....	52
Tabela 10	- Resultados de concentração e pureza de DNA extraído dos 20 indivíduos participantes.....	53
Tabela 11	- Distribuição percentual da frequência de amostras quanto ao sexo..	53
Tabela 12	- Características dos 9 indivíduos que apresentaram algum tipo de variante genética no <i>locus</i> do gene <i>FMR1</i> .....	55
Tabela 13	- Análise do <i>locus</i> do gene <i>FMR1</i> de 20 probandos.....	57
Tabela 14	- Anotação das variantes genéticas em ferramentas de previsão do possível impacto de substituição de aminoácidos na proteína.....	63
Tabela 15	- Impacto da variante genética c.*1062A>T (rs11798323) na interação miRNA-mRNA segundo a base de dados PolymiRTS.....	75
Tabela 16	- Impacto da variante genética c.*1062A>T (rs11798323) na interação miRNA-mRNA segundo a base de dados MirSNP.....	76

## LISTA DE SIGLAS

3'UTR	Região não traduzida 3'
5'UTR	Região não traduzida 5'
BAM	<i>Binary Alignment Map</i>
BDGP	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Dbr1	<i>Lariat debranching enzyme</i>
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>
DI	Deficiência Intelectual
DOI	<i>Digital Object Identifier</i>
DOR	Diminuição da reserva ovariana
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
<i>FMR1</i>	<i>Fragile X mental retardation 1</i>
FMRP	<i>Fragile X mental retardation protein</i>
FOP	Falência Ovariana Precoce
FXTAS	Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil
ILK	Instituto Lico Kaesemodel
LEM	Laboratório Experimental Multiusuários
MC	Mutação completa
NnsplICE	<i>BDGP Splice Site Prediction by Neural Network</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	Pré-mutação
PolyPhen2	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analysis</i>
PSD-95	<i>Post Synaptic Density 95</i>
PolymiRTS	<i>Polymorphism in microRNAs and their Target Sites</i>
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
QI	Quociente de inteligência
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RSL	Revisão sistemática de literatura
SB	<i>Southern blot</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
<i>SLC6A4</i>	<i>Serotonin transporter</i>
SNV	Variante de um único nucleotídeo
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
SXF	Síndrome do X Frágil
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro do autismo
VCF	<i>Variant call format</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Genética da Síndrome do X Frágil .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Variantes genéticas não-CGG no gene <i>FMR1</i> .....</b>	<b>20</b>
1.2.1. Variante de um único nucleotídeo (SNV).....	20
1.2.2. Deleções .....	25
1.2.3. Mosaicismos.....	28
<b>1.3. Diagnóstico da SXF.....</b>	<b>29</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>35</b>
<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Comitê de ética em pesquisa e obtenção dos participantes da pesquisa .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Proposta de um <i>checklist</i> com base nas características de indivíduos com SXF para seleção dos probandos .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3. Coleta de amostras biológicas, extração e quantificação de DNA .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4. Desenho de primers e sequenciamento do gene <i>FMR1</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5. Análise por bioinformática das variantes no gene <i>FMR1</i> e seu possível papel na proteína FMRP.....</b>	<b>46</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Aplicação de um <i>checklist</i> para seleção de indivíduos para a pesquisa .....</b>	<b>48</b>
5.1.1. Características fenotípicas de indivíduos com Síndrome do X Frágil .....	52
<b>5.2. Análise do material genético dos participantes da pesquisa.....</b>	<b>53</b>
<b>5.3. Identificação de variantes genéticas no gene <i>FMR1</i> .....</b>	<b>54</b>
5.3.1. Características das variantes genéticas encontradas .....	55
5.3.2. Predição <i>in silico</i> do efeito das variantes na proteína FMRP .....	61

5.3.3. Impacto das variantes genéticas raras não-CGG no gene <i>FMR1</i> .....	82
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>84</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>8. ATIVIDADES COMPLEMENTARES.....</b>	<b>88</b>
8.1. Prêmio.....	88
8.2. Artigos publicados .....	88
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE A - REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA PARA IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS RARAS NO GENE <i>FMR1</i> ASSOCIADAS COM SXF.....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE B - VARIANTES GENÉTICAS DESCRITAS NO BANCO DE DADOS CLINVAR PARA O GENE <i>FMR1</i>.....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE C - VARIANTES PONTUAIS PREVIAMENTE IDENTIFICADAS NO GENE <i>FMR1</i> DE INDIVÍDUOS COM ATRASO NO DESENVOLVIMENTO E/OU DEFICIÊNCIA INTELECTUAL .....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE D – VARIANTES PONTUAIS PREVIAMENTE IDENTIFICADAS NO GENE <i>FMR1</i> DE INDIVÍDUOS COM FENÓTIPO TÍPICO DE SXF .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE E – RELAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS EM 167 INDIVÍDUOS POSITIVOS PARA SXF (PORTADORES DE MUTAÇÃO COMPLETA) UTILIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DE UM <i>CHECKLIST</i>.....</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICE F – RELAÇÃO DE PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS ÉXONS DO GENE <i>FMR1</i> .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE G - FINANCIAMENTOS E COLABORAÇÕES DESTA PESQUISA.....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO CEP: APROVAÇÃO CONFORME PARECER Nº 2.199.666.....</b>	<b>129</b>

**ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... 130**

**ANEXO C – *CHECKLIST* DO X FRÁGIL (DO INGLÊS *FRAGILE X CHECKLIST*)  
PROPOSTO POR HAGERMAN E COLABORADORES (1991)..... 131**

## 1. INTRODUÇÃO

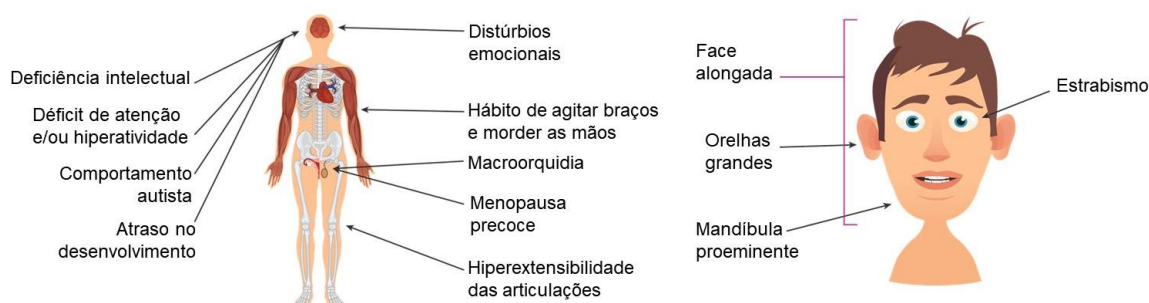
A Síndrome do X Frágil (SXF) [OMIM: 3624], descrita pela primeira vez por Martin e Bell (1943), é uma condição humana de origem genética e hereditária associada com o cromossomo X, e é considerada a causa mais comum de deficiência intelectual herdada (CRAWFORD; ACUÑA; SHERMAN, 2001). Embora o número exato de pessoas que apresentam SXF seja desconhecido, sabe-se que ela afeta todos os grupos étnicos e que sua prevalência pode variar entre as populações (PEPRAH, 2012; NIU *et al.*, 2017). Peprah (2012) reuniu estudos genéticos que permitiram estimar a prevalência da SXF entre diferentes populações. Na Austrália, estima-se que 1 em cada 4.350 indivíduos (1/4.350) possuem a SXF (TURNER *et al.*, 1996). Outros países considerados no estudo envolvem a Estônia (1/27.115) (PUUSEPP *et al.*, 2008), o Japão (1/10.000) (OTSUKA *et al.*, 2010), a Holanda (1/6.045) (DE VRIES *et al.*, 1997), Taiwan (1/10.000) (TZENG *et al.*, 2005), o Reino Unido (1/5.530) (MURRAY *et al.*, 1996; YOUINGS *et al.*, 2000), o Egito (0,9/1.000) (MEGUID *et al.*, 2007) e os Estados Unidos da América (1/5.161) (COFFEE *et al.*, 2009). No Brasil, ainda não há dados estatísticos sobre a prevalência da SXF, e há somente dois trabalhos indiretos que determinaram a frequência da SXF em coortes de homens com deficiência intelectual. Haddad e colaboradores (1999) identificaram que entre 256 homens com deficiência intelectual, 5 possuíam a SXF (2%). Em outro estudo feito na região nordeste do Brasil (São Luiz, Maranhão) (VIVEIROS *et al.*, 2015), foram encontrados 2 indivíduos positivos para SXF de um total de 238 homens (0,84%) com deficiência intelectual de etiologia desconhecida.

A fim de fornecer uma estimativa precisa da prevalência da SXF, Hunter e colaboradores (2014) desenvolveram uma revisão sistemática com meta-análise, em que determinaram a incidência estimada de 1 para cada 7.000 homens e 1 para cada 11.000 mulheres. Este estudo considerou dados de populações dos Estados Unidos, Canadá, Austrália, regiões da Europa, Ásia e outros. Tais dados são utilizados como referencial pelo *Center for Disease Control and Prevention* (2018).

Na SXF, observa-se indivíduos com diferentes graus de comprometimento intelectual, que pode ir desde dificuldades no aprendizado até deficiência intelectual mais grave (SERPA, 2008). A deficiência intelectual (DI) reflete a função cortical perturbada durante e após a idade do desenvolvimento (SAUNA-AHO *et al.*, 2018). Trata-se de uma

deficiência caracterizada por limitações significativas tanto no funcionamento intelectual (tipicamente com quociente de inteligência (QI) abaixo de 70) como no comportamento adaptativo (habilidades conceituais, sociais e/ou práticas) (HESSL *et al.*, 2016), que se correlaciona também com outras condições, onde incluem-se autismo (HOEKSTRA *et al.*, 2009), Síndrome de Rett (ZOGHBI; BEAR, 2012) e epilepsia (VISSERS; GILISSEN; VELTMAN, 2016).

Além da deficiência intelectual, outras características observadas na SXF incluem hiperatividade, déficit de atenção, distúrbios emocionais (como ansiedade e impulsividade), comportamento autista e atraso no desenvolvimento motor e no desenvolvimento da linguagem (THURMAN *et al.*, 2014; BAGNI; GREENOUGH, 2005; HAGERMAN *et al.*, 2017; STONE; LOS, 2018). As características físicas como face alongada, orelhas grandes em abano, queixo proeminente, estrabismo, macroorquidia (aumento do volume testicular), hábito de agitar os braços e morder as mãos, também são características observadas em indivíduos portadores da SXF (Figura 1) (HAGERMAN *et al.*, 1991; CARVALHO, 2003).



**Figura 1 – Características observadas na Síndrome do X Frágil.**

Fonte: Adaptado de REUS, 2017.

Apesar dessas manifestações não serem exclusivas aos portadores da síndrome (AMARAL; MELO, 2017), estudos mostram taxas elevadas de co-ocorrência destas características entre os indivíduos com SXF. Um estudo feito com 1276 famílias que possuíam pelo menos um filho portador da síndrome, mostrou múltiplas condições associadas a SXF (BAILEY *et al.*, 2008): atraso no desenvolvimento (observado em 96% dos homens e 64% das mulheres), problemas de atenção (84% homens, 67% mulheres), ansiedade (70% homens, 56% mulheres), hiperatividade (66% homens, 30% mulheres),



depressão (12% homens) e convulsões (18% homens, 7% mulheres). Outra co-ocorrência de comorbidade observada na SXF é o transtorno do espectro do autismo (TEA). Apesar dos números relatados de pessoas com SXF que também têm TEA sejam amplamente variados nos estudos (entre 5% e 60%) (DEVITT; GALLAGHER; REILLY, 2015), já é bem estabelecida a co-ocorrência de TEA e SXF.

Por ser de herança ligada ao cromossomo X, mulheres com SXF são tipicamente afetadas de forma menos severa do que os homens (BIANCALANA *et al.*, 2015). Estudos demonstram que aproximadamente 25% das mulheres com SXF apresentam um QI abaixo de 70 (a média mundial varia entre 95 e 105 pontos), e as demais geralmente apresentam um QI na faixa limítrofe abaixo da média (QI entre 75 a 90) (CHASTE *et al.*, 2012; LOZANO; ROSERO; HAGERMAN, 2014). A partir dos estudos realizados, estima-se que aproximadamente 43% das mulheres com SXF são capazes de alcançar independência na vida adulta (HARTLEY *et al.*, 2011). Esta heterogeneidade fenotípica é explicada pelo fato de que as mulheres podem apresentar a mutação em apenas um dos alelos do cromossomo X, e no outro, alelo normal (CORNISH; TURK; HAGERMAN, 2008; CHASTE *et al.*, 2012), o qual é suficiente para produzir proteína FMRP funcional (CRAWFORD; ACUÑA; SHERMAN, 2001; LIGSAY; HAGERMAN, 2016), devido a inativação aleatória de uma cópia do cromossomo X. Como o nível de proteína FMRP está correlacionado com o QI dos indivíduos (KAUFMANN *et al.*, 1999), a faixa de comprometimento de mulheres com SXF será determinado pela porcentagem de células com cromossomo X normal ativo, pois isso determinará a quantidade de FMRP produzida (LOZANO; ROSERO; HAGERMAN, 2014).

Em indivíduos do sexo masculino com a mutação responsável pela síndrome, a produção da proteína FMRP encontra-se alterada. Desta forma, quase todos os homens com SXF apresentam deficiência intelectual moderada a grave e com QI médio inferior a 55 pontos (RASPA; WHEELER; RILEY, 2017).

### **1.1. Genética da Síndrome do X Frágil**

A principal causa da SXF é uma expansão dos trinucleotídeos CGG no gene *FMR1* (do inglês *Fragile X mental retardation 1*) localizado no cromossomo X (Figura 2a). *FMR1* é um gene codificante de proteína, constituído por 17 éxons e que abrange 38 Kb no *locus* Xq27.3 do genoma nuclear (EICHLER *et al.*, 1993) (Figura 2a-b). Esse gene é

transcrito em um mRNA de 4,8 Kb de tamanho, que servirá de molde para a síntese da proteína FMRP (do inglês *Fragile X Mental Retardation Protein*) (BAGNI; GREENOUGH, 2005), a qual é constitutiva em vários tecidos do organismo, sendo mais expresso em células neuronais, nos testículos e na placenta (MCLENNAN *et al.*, 2011; PUGIN *et al.*, 2017).

Embora ainda não sejam conhecidas todas as funções desta proteína, estudos têm demonstrado que ela está ligada ao transporte de mRNAs do núcleo para o citoplasma da célula, conduzindo-os também até os ribossomos para a síntese de proteínas (KIM; BELLINI; CEMAN, 2009; TABET; VITALE; MOINE, 2016). No sistema nervoso central, estima-se que aproximadamente 4% (BHAKAR; DÖLEN; BEAR, 2012; SETHNA; MOON; WANG, 2014) de todo o mRNA cerebral liga-se à proteína FMRP, a qual, por sua vez irá regular a tradução destes transcritos (ARSENAULT *et al.*, 2016), incluindo aqueles relacionados às sinapses dos neurônios (CONTRACTOR, 2013). Desta forma, a ausência da proteína FMRP interfere principalmente na regulação da sinalização sináptica entre células neurais (DARNELL; RICHTER, 2012; CONTRACTOR, 2013; LOZANO; ROSERO; HAGERMAN, 2014; KUMARI; USDIN, 2016).

Exemplos de proteínas reguladas por FMRP incluem: PSD-95 (do inglês *Post Synaptic Density 95*) (ARSENAULT *et al.*, 2016) crucial para a integridade sináptica e plasticidade cerebral; RAC1 (do inglês *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) (BONGMBA *et al.*, 2011), importante para a formação e maturação de sinapses neuronais e assim como as do grupo das proteínas SOD (do inglês *Superoxide Dismutase*) (BECHARA *et al.*, 2009), reguladoras do estado de oxidação-redução celular.

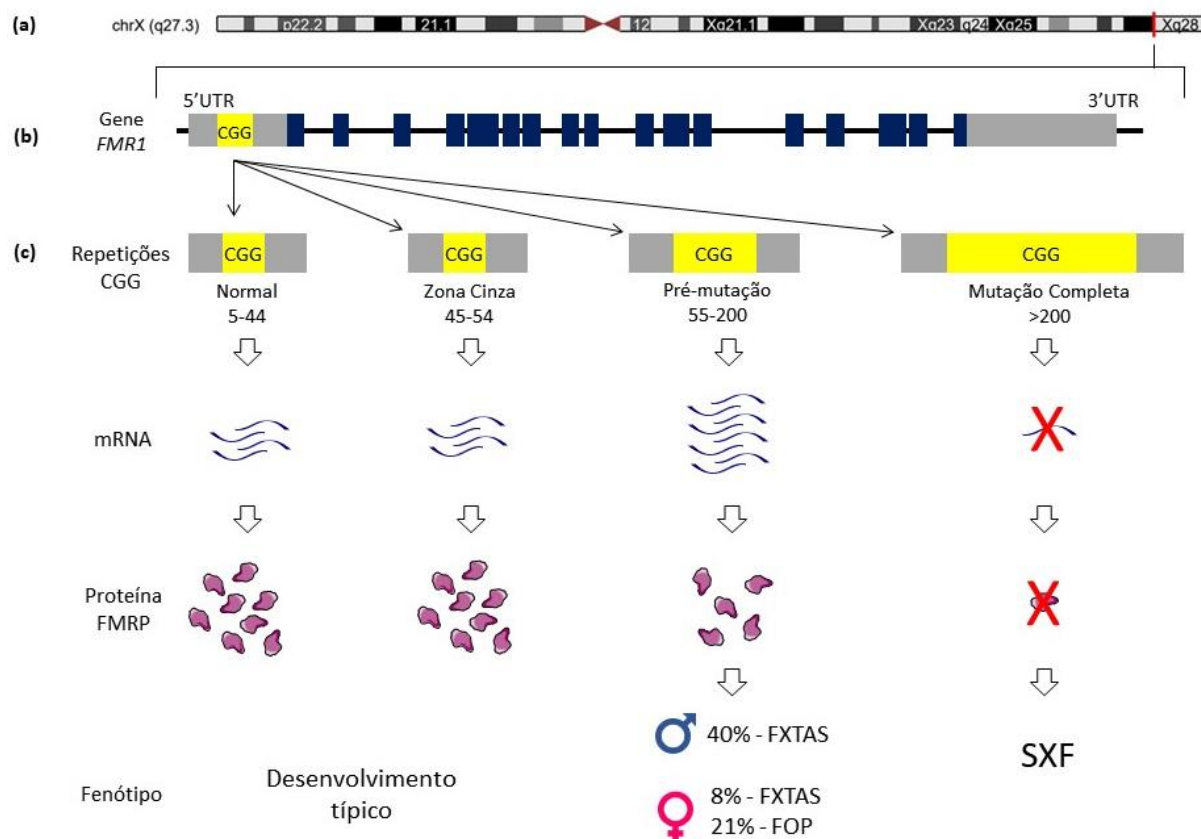
A mutação deletéria mais comumente encontrada no gene *FMR1* ligada à SXF é decorrente da expansão, em tandem, do número de cópias da sequência de bases CGG (citosina-guanina-guanina) em sua extremidade não traduzível 5' (5'UTR) (ROY CHOWDHURY *et al.*, 2017). As repetições CGG causam hipermetilação no gene *FMR1* e conseqüentemente a perda parcial ou total da expressão da proteína FMRP (PENAGARIKANO; MULLE; WARREN, 2007). Por se tratar de uma mutação genética instável, conhecida como paradoxo de Sherman, o acúmulo de expansões CGG no gene *FMR1* ocorre em etapas ao longo de diferentes gerações. Neste acúmulo, o risco das manifestações clínicas aumentam através do número de gerações por onde a mutação

é transmitida, sendo que o número das sequências CGG tende a expandir-se mais facilmente nos filhos quando são segregadas a partir de suas mães biológicas portadoras de uma expansão CGG de tamanho superior a 54 repetições (FU *et al.*, 1991; MACPHERSON; MURRAY, 2016). Por exemplo, na prole de mulheres portadoras da mutação, mas fenotipicamente normais, aproximadamente 29% das crianças (20% dos meninos e 9% das meninas) são afetadas. Caso a mãe portadora seja afetada, o risco para sua prole aumenta para cerca de 40%. Já filhas de homens portadores normais, todas serão portadoras, mas nunca afetadas (MORGANTE, 1997).

Neste contexto, dependendo do número de repetições CGG, ela pode ser classificada em 4 formas alélicas: normal (entre 5 a 44 repetições), intermediário ou zona cinza (entre 45 a 54 repetições), pré-mutado (PM, 55 a 200 repetições), e mutação completa (MC, maiores do que 200 repetições) (CHAUDHARY *et al.*, 2014; MCLENNAN *et al.*, 2011) (Figura 2c).

A média de repetições CGG em indivíduos neurotípicos é de 29 a 30 sequências (PEPRAH, 2012), as quais são interrompidas por uma sequência AGG a cada 9 ou 10 repetições CGG (DEAN; MUTHUSWAMY; AGARWAL, 2016). Estudos indicam que estas sequências AGG podem levar a uma maior estabilidade do *FMR1*, reduzindo assim o risco de expansões futuras no gene (NOLIN *et al.*, 2013, 2015; YRIGOLLEN *et al.*, 2012).

Os alelos de tamanho intermediários (ou zona cinza), entre 45 a 54 repetições, podem indicar instabilidade na segregação das repetições CGG. Estudos mostram que aproximadamente 30% dos alelos intermediários são herdados de forma instável (NOLIN *et al.*, 2003). Entretanto, estes alelos não representam risco comprovado para a ocorrência de mutação completa em uma única geração (BIANCALANA *et al.*, 2015; NOLIN *et al.*, 2003).



**Figura 2 - Representação da transcrição e tradução do gene *FMR1* nos diferentes comprimentos de repetição CGG e desfecho clínico.** (a) Cromossomo X humano com o locus do gene *FMR1* (Xq27.3) (linha vermelha) (b) Gene *FMR1* composto por 17 éxons (azul) e as regiões 5'UTR e 3'UTR (cinza). Na região 5'UTR temos as repetições das bases CGG (amarelo) (c) As quatro formas alélicas das repetições CGG: repetições CGG entre 5-54 (alelo normal e zona cinza) levam a transcrição e tradução do mRNA normal e expressão normal de FMRP. Na pré-mutação (55-200 repetições CGG), os níveis de expressão de mRNA estão aumentados mas a expressão de FMRP é reduzida, aumentando o risco de desenvolver a Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil (FXTAS) nos homens e Falência Ovariana Precoce (FOP) nas mulheres. A mutação completa (>200 repetições CGG) leva ao silenciamento do gene *FMR1* resultando na falta de FMRP que leva à SXF.

Fonte: Adaptado de HAGERMAN *et al.*, 2009; WILLEMSSEN; LEVENGA; OOSTRA, 2011.

Alelos de pré-mutação, entre 55 a 200 repetições, representam risco de expansão nas gerações subsequentes (SITZMANN *et al.*, 2018). Embora não cause a SXF, a pré-mutação está associada com duas doenças de penetrância incompleta. A primeira delas é a Falência Ovariana Precoce (FOP), que ocorre em aproximadamente 21% das mulheres pré-mutadas. A segunda doença é a Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil (FXTAS, do inglês *Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*), que ocorre em 4% dos homens pré-mutados e também em 8% das mulheres pré-mutadas com mais de 50 anos (BIANCALANA *et al.*, 2015; DEAN; MUTHUSWAMY; AGARWAL, 2016). Na pré-

mutação, os níveis de mRNA de *FMR1* variam entre 2 a 10 vezes a mais se comparada a de indivíduos com alelo normal e neurotípicos (TASSONE *et al.*, 2000; USDIN; KUMARI, 2015; ESLAMI *et al.*, 2018). Embora isso já tenha sido observado por outros trabalhos, ainda não há uma descrição de qual mecanismo genético e celular realiza tal controle, embora acredita-se que repetições CGG longas reduzem a eficácia de tradução do transcrito gerado (KUMARI; USDIN, 2016). Estudos mostram que marcas de cromatina ativa são encontradas na extremidade 5' UTR de *FMR1* em portadores de pré-mutação (USDIN; KUMARI, 2015), e que há um aumento da transcrição associada com maior abundância de histonas acetiladas na região promotora do gene *FMR1* (USDIN *et al.*, 2014). Além disso, estudos *in vitro* indicam que longos trechos de repetições CGG excluem os nucleossomos, podendo desta forma aumentar a acessibilidade dos fatores de transcrição na região promotora do gene (USDIN *et al.*, 2014; USDIN; KUMARI, 2015).

Na mutação completa, com ocorrência acima de 200 repetições CGG, todos os homens e aproximadamente 50% das mulheres são afetados com SXF. A mutação completa gera disfunção do gene *FMR1* devido ao aumento da metilação das repetições CGG (PEPRAH, 2012). Esta hipermetilação silencia a transcrição de *FMR1*, o que conseqüentemente causa repressão da tradução da proteína FMRP por não haver mRNA para que seja traduzido (PEPRAH, 2012).

Entre os indivíduos com SXF, há também um grupo denominado "mosaico", os quais apresentam tamanhos diferentes das repetições CGG em diferentes células do corpo. Tais mosaicos podem apresentar também três ou mais populações de células com diferentes tamanhos de alelos, variações genéticas e diferentes padrões de metilação, o que também pode contribuir com a grande variedade de características fenotípicas observadas na condição sindrômica da SXF (LOZANO; ROSERO; HAGERMAN, 2014).

Embora há trabalhos indicando que 99% dos casos de SXF sejam causados pela expansão da repetição CGG em *FMR1* (BIANCALANA *et al.*, 2015), ainda é impossível estimar tal frequência percentual pois todos os exames genéticos de rotina para a síndrome são baseados na contagem de repetições CGG. Entretanto, já foram descritos outros tipos de variantes genéticas presentes no gene *FMR1* e que podem levar à perda

da função do gene, ocasionando assim a SXF ou fenótipos semelhantes (MILA *et al.*, 2018; SITZMANN *et al.*, 2018).

## **1.2. Variantes genéticas não-CGG no gene *FMR1***

Variantes genéticas, não associadas as repetições CGG também são relatadas no gene *FMR1* de indivíduos com deficiência intelectual e/ou atraso no desenvolvimento. A partir de uma Revisão Sistemática da Literatura (Apêndice A), foi possível observar que variantes genéticas no gene *FMR1* dividem-se em três classes: variante de um único nucleotídeo (SNV, do inglês *single nucleotide variant*), deleções e mosaicismos.

Variantes genéticas descritas na base de dados ClinVar (LANDRUM *et al.*, 2014) para o gene *FMR1* (Apêndice B) não foram incluídas na revisão da literatura pelo fato de não apresentarem detalhes do indivíduo em que foi detectada, além de também apresentarem dados conflitantes associadas com o impacto da variante (se benigna ou patogênica, por exemplo). Nas subseções seguintes são descritas cada uma das classes de variantes genéticas identificadas na RSL.

### **1.2.1. Variante de um único nucleotídeo (SNV)**

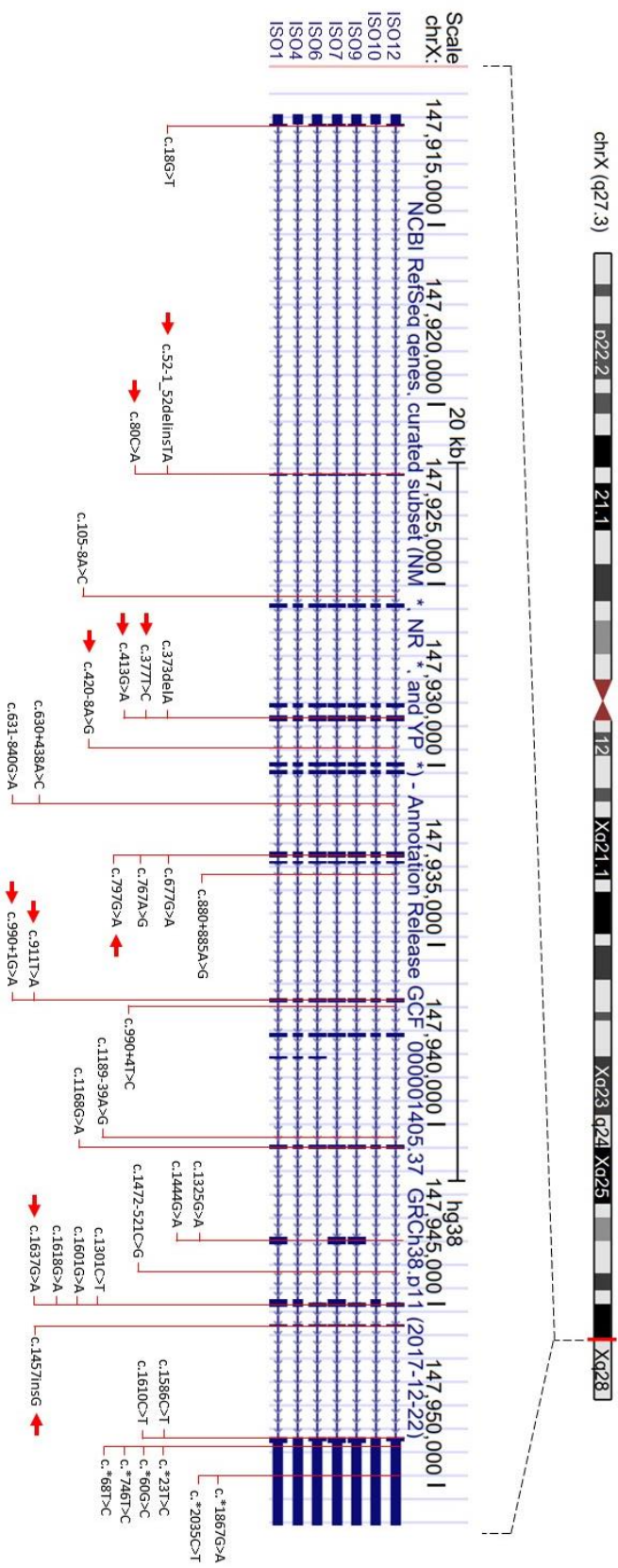
A partir de trabalhos baseados no uso de técnicas de sequenciamento genético em larga escala, foram encontradas 40 SNVs que distribuem-se ao longo de todas as isoformas de splicing do gene *FMR1* (Figura 3), e também em sua região promotora (c.-413C>G, c.-332G>C, c.-293T>C e c.-254A>G). Destas variantes SNV, 20 foram relatadas em regiões codificantes de proteína (c.18G>T, c.52-1\_52delinsTA, c.80C>A, c.373delA, c.377T>C, c.413G>A, c.677G>A, c.767A>G, c.797G>A, c.911T>A, c.1168G>A, c.1325G>A, c.1444G>A, c.1601G>A, c.1610C>T, c.1618G>A, c.1301C>T, c.1586C>T, c.1637G>A e c.1457insG), 9 SNVs foram reportadas em regiões de íntrons (c.105-8A>C, c.420-8A>G, c.630+438A>C, c.631-840G>A, c.880+885A>G, c.990+1G>A, c.990+4T>C, c.1189-39A>G e c.1472-521C>G), e 6 SNVs na região regulatória 3'UTR (c.\*23T>C, c.\*60G>C, c.\*746T>C, c.\*68T>C, c.\*1867G>A e c.\*2035C>T).

Entre as SNVs relatadas, os indivíduos portadores apresentaram um amplo espectro de fenótipos: 30 foram relatadas em indivíduos com atraso no desenvolvimento e/ou deficiência intelectual (Apêndice C), características que embora gerais, estão

associadas à SXF e 10 foram relatadas em indivíduos com características típicas da síndrome (Apêndice D).

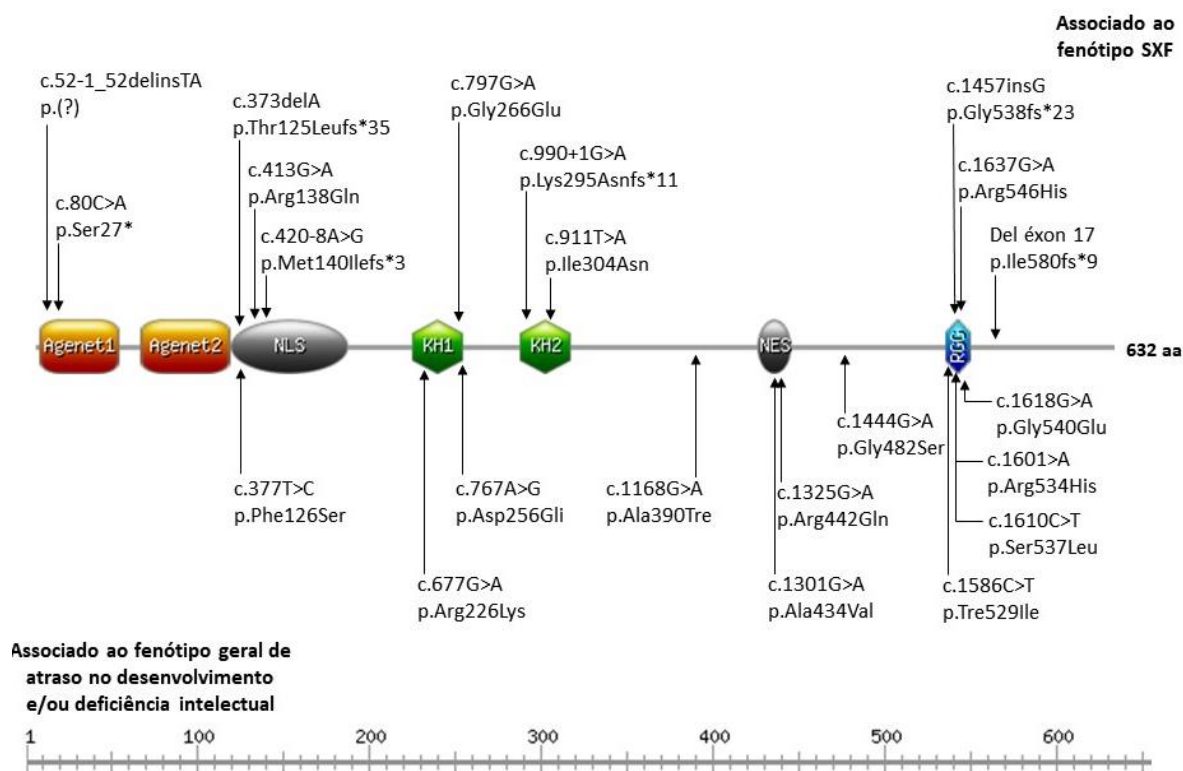
A maioria das variantes relatadas em regiões não codificantes do gene (17 de um total de 19 variantes), foram encontradas em indivíduos com atraso no desenvolvimento e/ou deficiência intelectual (Apêndice D). As exceções a isso são para a variante c.420-8A>G localizada no íntron 5 do gene, e para a variante c.990+1G>A localizada no íntron 10 do gene (QUARTIER *et al.*, 2017).

No total, 21 SNVs descritas apresentaram algum efeito ou alteração na proteína FMRP (Figura 4). Das quais, 6 são responsáveis por gerar um *stop* códon prematuro na síntese de FMRP (c.52-1-52delinsTA, p.Ser27\*, p.Thr125Leufs\*35, p.Met140lfeufs\*3, p.Lys295Asnfs\*11, p.Gly538fs\*23). Todas as variantes que resultaram em *stop* códon prematuro foram encontradas em indivíduos com características típicas da SXF como face alongada e características autistas. Já a maioria das mutações não sinônimas (em 12 de um total de 15) foram encontradas em indivíduos com diferentes graus de deficiência intelectual e/ou atraso no desenvolvimento (Tabela 1).



**Figura 3 - Locus do gene *FMR1* indicando as variantes pontuais identificadas pela RSL.** Todas as variantes estão listadas nos éxons e introns do gene *FMR1* (chrX:147,911,951-147,951,127) no genoma de referência humano GRCh38, com 39,177 bases de comprimento. Variantes que ocorrem na região promotora do gene (c.-413C>G, c.-332G>C, c.-293T>C e c.-254A>G) não são mostradas na figura. As variantes destacadas com setas vermelhas, representam aquelas encontradas em indivíduos com fenótipo associado a SXF.





**Figura 4 – Localização das variantes genéticas encontradas ao longo da proteína FMRP em indivíduos com SXF ou com fenótipos correlatos.** As variantes indicadas na parte superior foram encontradas em indivíduos com características de SXF (Associado com fenótipo SXF). As variantes indicadas abaixo foram encontradas em indivíduos com deficiência intelectual e/ou atraso no desenvolvimento. Abreviações: Agenet, domínios do tipo Agenet; KH, domínio de homologia à heteronucleoproteína K; NES, sinal de exportação nuclear; NLS, sinal de localização nuclear; RGG, domínio rico em glicina-arginina (RGG-box).

**Tabela 1 – Fenótipo observado nos indivíduos com variantes que alteraram as sequências de aminoácidos da proteína FMRP.** Variante: corresponde à variante genética encontrada; Efeito na proteína: alteração nos aminoácidos da proteína FMRP; Impacto da variante: tipo de variante e seu efeito na constituição química do gene; Fenótipo: refere-se à condição/características observadas no indivíduo que carrega a variante genética reportada.

(continua)

Variante	Efeito na proteína	Impacto da variante	Fenótipo
c.18G>T	p.Val6=	Sinônima	Atraso no desenvolvimento
c.377T>C	p.Phe126Ser	Não sinônima	Transtornos de desenvolvimento
c.413G>A	p.Arg138Gln	Não sinônima	Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento e convulsões; Atraso no desenvolvimento, comportamento autista, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, convulsões, hábito de agitar as mãos, rosto alongado, orelhas grandes, mãos macias, dedos hiperextensíveis e pés planos.
c.677G>A	p.Arg226Lys	Não sinônima	Deficiência intelectual moderada a grave
c.767A>G	p.Asp256Gli	Não sinônima	Deficiência intelectual moderada a grave
c.1168G>A	p.Ala390Tre	Não sinônima	Deficiência intelectual moderada a grave
c.1325G>A	p.Arg442Gln	Não sinônima	Transtornos de desenvolvimento

(conclusão)

Variante	Efeito na proteína	Impacto da variante	Fenótipo
c.1444G>A	p.Gly482Ser	Não sinônima	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento
c.1601G>A	p.Arg534His	Não sinônima	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento
c.1618G>A	p.Gly540Glu	Não sinônima	Deficiência intelectual
c.1301C>T	p.Ala434Val	Não sinônima	Deficiência intelectual moderada a grave
c.1586C>T	p.Tre529Ile	Não sinônima	Deficiência intelectual moderada a grave
c.1610C>T	p.Ser537Leu	Não sinônima	Deficiência intelectual moderada a grave
c.52-1_52delinsTA	p.(?)	<i>Stopgain</i>	Face alongada, testa e orelhas proeminentes, macroorquidia, hiperextensibilidade das articulações, características autistas e atraso no desenvolvimento.
c.80C>A	p.Ser27*	<i>Stopgain</i>	Deficiência intelectual, dismorfismo facial, macroorquidismo, epilepsia, características autistas e pouco uso de linguagem
c.373delA	p.Thr125Leufs*3 5	<i>Frameshift</i>	Características dismórficas, face alongada, testa e orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das junções, características autistas, TDAH, atraso no desenvolvimento e comprometimento da linguagem.
c.420-8A>G	p.Met140lifs*3	<i>Frameshift</i>	Atraso na linguagem, rosto alongado, estereotipias e características de comportamento repetitivo, com agitação das mãos e ansiedade.
c.797G>A	p.Gly266Glu	Não sinônima	Atraso no desenvolvimento associado a comportamentos e características físicas comumente associadas a SXF
c.911T>A	p.Ile304Asn	Não sinônima	atraso no desenvolvimento, face alongada, orelhas grandes, mandíbula proeminente e macroorquidismo.
c.990+1G>A	p.Lys295Asnfs* 11	<i>Frameshift</i>	Habilidades motoras e de comunicação atrasadas. Características de comportamento repetitivo, assim como agitar as mãos e evitar contato físico. Testa alta, rosto grosseiro, boca larga, orelhas de tamanho normal mas formato anormal. Traços autistas.
c.1637G>A	p.Arg546His	Não sinônima	Deficiência intelectual, face alongada, mandíbula proeminente e testa grande.
c.1457insG	p.Gly538fs*23	<i>Frameshift</i>	Características físicas e comportamentais típicas de SXF e deficiência intelectual moderada a grave.

Entre as 21 SNVs com algum efeito na FMRP, apenas duas ocorreram em regiões intrônicas, uma no íntron 5 (p.Met140lifs\*3, c.420-8A>G) e outra no íntron 10 (p.Lys295Asnfs\*11, c.990+1G>A) (QUARTIER *et al.*, 2017), e ambas produziram como consequência eventos de *splicing* aberrante. A primeira, que ocorreu no íntron 5 gerou retenção de 7 nucleotídeos do íntron 5, resultando em um *frameshift* que ocasionou o

surgimento de um *stop* códon prematuro. A segunda, que ocorreu no Íntron 10, causou a perda total do éxon 10, resultando também em um *frameshift* que levou ao surgimento de *stop* códon prematuro.

Apesar das variantes intrônicas serem menos estudadas quando comparadas às exônicas, estas também podem apresentar papel deletério na função de um gene e, assim, causar problemas fenotípicos no organismo. Os íntrons apresentam regiões de extrema importância para o correto funcionamento do mecanismo de *splicing* (WANG, 1997; CALAIS, 2014).

A consequência mais comum das mutações que alteram os sítios de *splicing* é a remoção de um ou mais éxons, seguida da ativação incorreta dos sítios doador (5') e receptor (3'), e também retenção de íntrons inteiros no mRNA final após o término do *splicing* (NAKAI; SAKAMOTO, 1994; VOŘECHOVSKÝ, 2006). Quando não há o reconhecimento das junções *íntron/éxon* ou há uma falha durante o processo de remoção dos *íntrons*, o correto processamento do mRNA é afetado, podendo ocasionar uma geração de proteínas defeituosas ou deletérias (CARTEGNI; CHEW; KRAINER, 2002).

### 1.2.2. Deleções

As deleções envolvendo o gene *FMR1* (Figura 5) podem ser divididas em duas classes. Na primeira, estão as grandes deleções, que envolvem a deleção de vários outros genes além do *FMR1* (Figura 5b). Na segunda classe, estão aquelas que ocorreram exclusivamente no *locus* do gene *FMR1* (Figura 5c).

Dentre as deleções da primeira classe, foi encontrada uma de herança materna, que incluiu as bandas Xq26.3-Xq27.3, totalizando uma deleção de 13 Mb. Ela foi encontrada em um indivíduo do sexo masculino com deficiência intelectual e características faciais consistentes com a SXF (WOLFF *et al.*, 1997). Esta mesma região deletada, porém com tamanho de 12 Mb (WOLFF *et al.*, 1997), foi reportada em uma mulher com DI moderada a severa, rosto longo e estreito, queixo proeminente e orelhas grandes.

Outra doença associada a grandes deleções é a Falência ovariana precoce (FOP), responsável pela falência gonadal antes dos 40 anos de idade (LEAL DE ASSUMPÇÃO, 2014). Uma deleção *de novo* de 67,355 Mb (Xq21.31-Xq28) ocorreu em apenas um dos

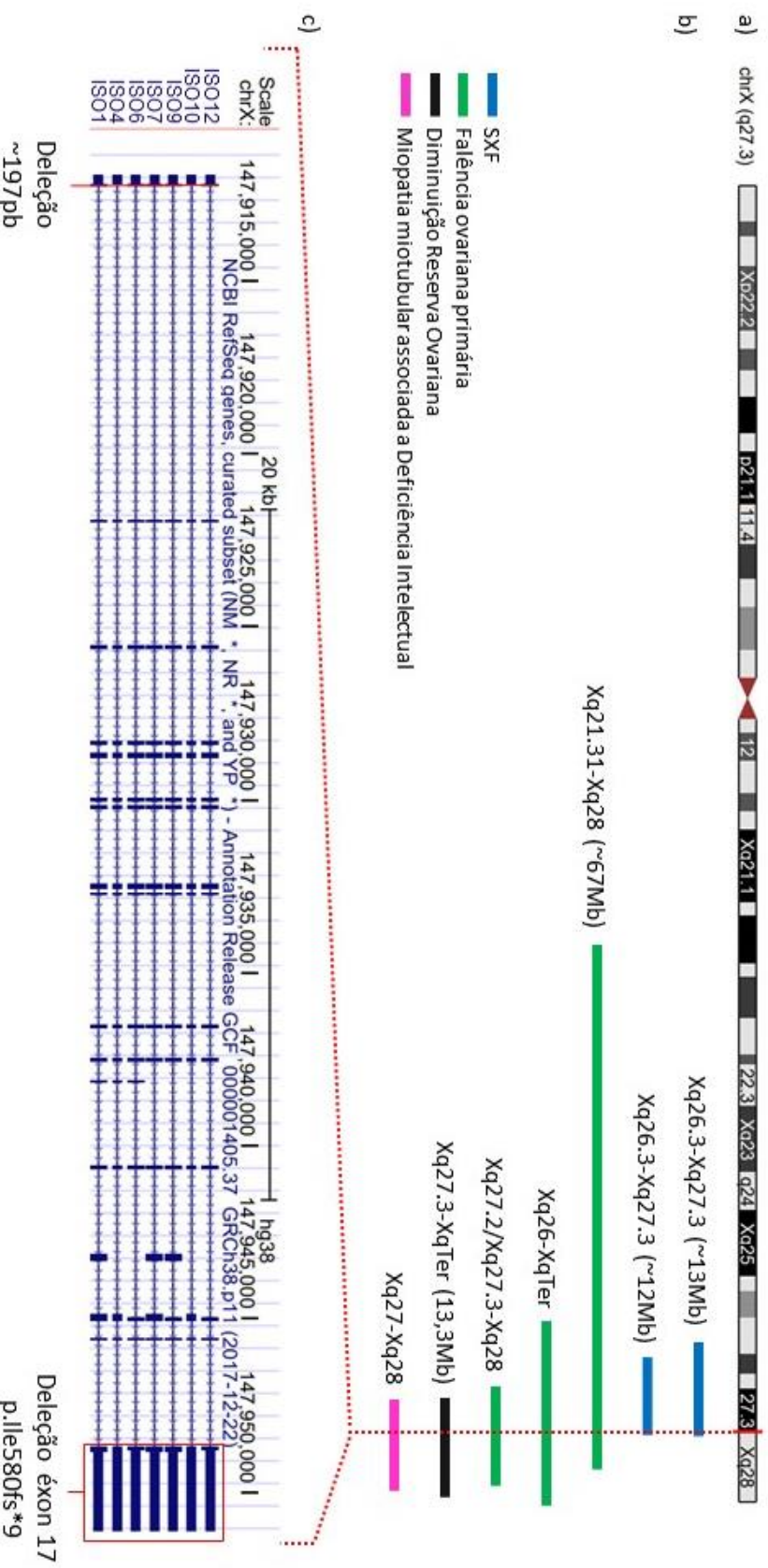
cromossomos X de uma mulher com FOP (BEKE *et al.*, 2013). O outro cromossomo X, normal e ativo não possuía o alelo *FMR1* metilado. Esta região consiste em 795 genes, dos quais 10 já foram associados à FOP, incluindo o *FMR1*. Outra deleção *de novo* que também removeu *FMR1*, ocorreu na citobanda Xq26-Xqter (FERREIRA *et al.*, 2010). Uma outra deleção de herança materna, como no máximo 1,5 Mb (Xq27.2/Xq27.3-Xq28) (EGGERMANN *et al.*, 2005), foi encontrada em uma mulher com FOP e que apresentou sinais leves de Síndrome de Turner. FOP também é associada à pré-mutação, ocorrendo em aproximadamente 21% das mulheres pré-mutadas (BIANCALANA *et al.*, 2015; DEAN; MUTHUSWAMY; AGARWAL, 2016).

Diminuição da reserva ovariana (DOR, do inglês *Diminished ovarian reserve*), desordem de infertilidade primária caracterizada por uma redução no número ou na qualidade dos oócitos foi associada a uma translocação no cromossomo X (der(X)t(X;18)(q27;q22)). A análise genética definiu uma deleção subtelomérica que abrangeu 13,3 Mb de Xq27.3-Xqter, e uma duplicação que abrangeu 13,4 Mb, de 18q22.1-18qter (FUSCO *et al.*, 2011).

Por último, em miopatia miotubular, uma doença caracterizada por hipotonia grave e fraqueza muscular generalizada (LAPORTE *et al.*, 1996), foi associada a uma mulher com deleção heterozigótica *de novo* na banda Xq27-Xq28 (DAHL *et al.*, 1995). No estudo, os autores sugerem que o atraso no desenvolvimento, em particular o atraso maior na linguagem, pode ser uma manifestação da SXF, já que o gene *FMR1* está incluído na região deletada.

Dentre as deleções de classe 2, foi descrita no éxon 1 do gene, com 197 pb (VIVEIROS, 2013), envolvendo parte da região das repetições CGG. Ela foi encontrada em um indivíduo do sexo masculino com fenótipo típico de SXF: deficiência intelectual, fala repetitiva, macroorquidismo, mandíbula proeminente, orelhas grandes, pés planos, TDAH, pobre contato visual, convulsões e comportamento autista.

Outra deleção de classe 1 foi encontrada em 3 irmãos com características típicas da SXF (QUARTIER *et al.*, 2017). A deleção encontrava-se em heterozigose na mãe assintomática, e era idêntica nos 3 irmãos. Esta deleção removeu o éxon 17 do gene *FMR1* e o sítio receptor de *splicing* no mRNA de *FMR1*, levando a um *frameshift* que resultou em um *stop* códon prematuro (p.Ile580fs\*9).



**Figura 5 - Locus do gene *FMR1* indicando as deleções identificadas pela RSL. (a):** representação do cromossomo X. A linha vermelha pontilhada representa a posição do gene *FMR1* (ChrX:q27.3); **(b):** localização de 7 deleções responsáveis pela eliminação de vários genes incluindo *FMR1* e encontradas em indivíduos com características da SXF. Falência ovariana precoce, diminuição da reserva ovariana e Miopatia miotubular associada a deficiência intelectual; **(c):** representação do gene *FMR1* com a localização de duas deleções que ocorreram exclusivamente no gene *FMR1*.

### 1.2.3. Mosaicismos

Os mosaicismos genéticos em SXF caracterizam-se pela presença de tamanhos diferentes de repetições CGG entre diferentes células, sendo mais comum entre indivíduos com mutação completa e pré-mutação CGG (BIANCALANA *et al.*, 2015). Ao todo, foram encontrados 9 casos de mosaicismos que envolveram, além dos alelos MC e/ou PM, também deleções e um caso de mosaicismo germinativo (Tabela 2).

**Tabela 2 – Relação dos casos de mosaicismos envolvendo deleções encontrados na literatura.** Mosaico, refere-se ao tipo de mosaico; Genótipo, refere-se à composição genética do mosaicismo; Fenótipo, refere-se à condição/características observadas no indivíduo com mosaicismo; referência, refere-se a lista individual de todos os trabalhos consultados.

(continua)			
Mosaico	Genótipo	Fenótipo	Referência
Mo:MCDel	Presença de MC (6,5 kb) e deleção de ~100 pb	Fenótipo clínico de SXF. A deleção não prejudicou a transcrição e tradução de FMRP, que estava presente em 28% dos linfócitos do indivíduo.	DE GRAAFF <i>et al.</i> , 1996
Mo:MCDel	Presença de MC metilada (300 a 350 repetições CGG) e deleção de 905 pb. Esta deleção engloba as repetições CGG e exclui um start codon (ATG).	SXF com ausência de proteína FMRP, pois nem o alelo com MC e nem com a deleção puderam ser transcritos.	AROCENA <i>et al.</i> , 2000
Mo:MCMe PMDel	Presença de MC (6–8 kb, 10%), PM (3.2 kb) e MC não metilada (3.5 kb, 37%) e uma deleção (menor que 2.8 kb, 53%) que abrange toda a região das repetições CGG mais 42pb a montante da mesma.	Dificuldade de aprendizagem, mas sem atraso mental. FMRP é expressa em apenas 22% das células e o nível de mRNA é elevado em 3,6 vezes.	HAN <i>et al.</i> , 2006
Mo:MCPM Del	Presença de 2 alelos MC metilados (230 e 450 CGGs), um alelo PM (170 CGGs, 25%) e uma deleção de 175pb (15%).	Indivíduo de uma família SXF clássica, mas sem o fenótipo característico da síndrome. Expressão de FMRP em linfócitos foi de 18%.	GOVAERTS <i>et al.</i> , 2007
Mo:Ndel	Presença de alelo normal (23 CGGs) e deleção de 1,013,395pb, sendo responsável pela deleção de todo gene <i>FMR1</i> e seu gene vizinho <i>FMR1NB</i> . A deleção estava presente em 90% dos linfócitos e o alelo normal em 10%.	Indivíduo apresentando perfil cognitivo e comportamental com características compatíveis com SXF.	COFFEE <i>et al.</i> , 2008
Mo:MCMe	Mosaico de tamanho de MC não metilada (tamanho de repetição CGG variando de 180 a 410)	FXTAS com o nível de mRNA de <i>FMR1</i> 7 vezes maior que a média normal e níveis de expressão de FMRP reduzidos (38% do normal).	SANTA MARÍA <i>et al.</i> , 2014
Mosaico germinativo	Deleção de 300 kb em Xq27.3 abrangendo todo o gene <i>FMR1</i> (NC_000006.12:g.146414070_146715778del)	Mosaicismo encontrado na mãe assintomática de um menino com SXF: atraso no desenvolvimento físico e linguístico e transtorno do espectro autista.	JIRAANONT <i>et al.</i> , 2016

(conclusão)			
Mosaico	Genótipo	Fenótipo	Referência
Mo:MCMe Del	Presença de alelos MC não metilados e metilados e uma microdeleção que envolve uma sequência de ~80 pb no promotor <i>FMR1</i> , bem como perda completa da repetição CGG em parte das células.	SXF e características clínicas compatíveis com FXTAS.	HWANG <i>et al.</i> , 2016
Mo:MCMe Del	presença de alelos com MC (metilada e não-metilada) e com um alelo abrangendo uma deleção a repetição CGG presente em 13% das células. A percentagem total de células transportando alelos de mutação completa rmetilada foi de ~60%.	TDAAH, ansiedade, mordida de dedos, contato visual deficiente, palpitar das mãos, face longa e orelhas proeminentes	JIRAANONT <i>et al.</i> , 2017

Abreviações: Mo:MCDel, mosaicismo para mutação completa e deleção; Mo:MCMePMDel, mosaicismo para mutação completa, estado de metilação, Pré-Mutação e deleção; Mo:MCPMDel, mosaicismo para mutação completa, pré-mutação e deleção; Mo:Ndel, mosaicismo para alelo normal e deleção; Mo:MCMe, mosaicismo para mutação completa e estado de metilação; Mo:MCMeDel, mosaicismo para mutação completa, estado de metilação e deleção; MC, Mutação completa; PM, Pré-Mutação; SXF, Síndrome do X Frágil; FXTAS, Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil.

### 1.3. Diagnóstico da SXF

O diagnóstico clínico da SXF é baseado nas características físicas e comportamentais dos indivíduos (HAGERMAN; AMIRI; CRONISTER, 1991). Embora a SXF esteja bem caracterizada a nível clínico, os sintomas apresentados por indivíduos acometidos por ela ainda se confundem com o de síndromes correlatas ao dos transtornos do espectro do autismo (TEA). Além disso, os sintomas são pouco específicos e não muito aparentes durante os primeiros meses de vida do indivíduo, tornando-se evidentes somente à medida que o desenvolvimento intelectual e cognitivo da criança começa. Isso pode levar a demora no diagnóstico da síndrome, estudos indicam que aproximadamente 37% das famílias em que algum membro tinha suspeita de SXF, foram necessárias inúmeras visitas ao médico antes de o diagnóstico ser concluído (BAILEY *et al.*, 2009). Com o objetivo de tornar o diagnóstico da SXF mais eficiente, existem na literatura *checklists*, que correspondem a um questionário com questões objetivas aplicado diretamente ao paciente para avaliar um conjunto de características físicas e comportamentais que foram observadas em pessoas com SXF. O uso destes *checklists* têm se mostrado uma ferramenta importante de suporte à clínica (CHRISTOFOLINI *et al.*, 2007, 2009) para auxiliar na identificação de indivíduos com SXF que devem ser conduzidos para realização de teste genético para análise da expansão CGG no gene *FMR1*.

Na literatura científica, existem seis *checklists* que são utilizados por outros trabalhos (BUTLER *et al.*, 1991; HAGERMAN; AMIRI; CRONISTER, 1991; LAING *et al.*, 1991; GIANGRECO *et al.*, 1996; LIMPRASERT *et al.*, 2000; FRITSCH, 2011) para avaliar diferentes características físicas, comportamentais e de linguagem das pessoas (Tabela 7). Tais *checklists* sugerem que algumas características são mais frequentes em indivíduos com SXF e os indicam como melhores preditores da síndrome. Hagerman e colaboradores (1991), identificaram que fala perseverante (93%), orelhas grandes ou proeminentes (93%) e testículos grandes (91%) são significativamente mais frequentes ( $p < 0,005$ ) em indivíduos com SXF. Além disso, também possuem característica comportamental de serem defensivos tatilmente (79%), apresentarem pobre contato visual (97%) e também um histórico familiar significativo de deficiência intelectual (79%) ( $p < 0,05$ ). Já Butler e colaboradores (1991) destacam que vinco símio (36,8%), vinco plantar (83,3%), hiperextensibilidade das articulações (57,9%), orelhas grandes (94,7%), testículos grandes (84,2%) e histórico familiar de deficiência intelectual (73,7%) são bons preditores de SXF, porém não apresentaram dados estatísticos para demonstrar significância nos dados. Por outro lado, Giangreco e colaboradores (1996) identificaram que vincos símios e hiperextensibilidade juntamente com macroorquidia não são bons parâmetros para diferenciar indivíduos com SXF, se geneticamente positivos ou negativos, ao contrário de orelhas grandes e proeminentes que são consideradas melhores para diferenciar os dois grupos. Neste estudo não foram descritas as frequências e significância de cada característica. Boy e colaboradores (2001) observaram que histórico familiar de deficiência intelectual e pobre contato visual está significativamente associado em indivíduos com SXF pré-puberais ( $p < 0,05$ ), já nos indivíduos da síndrome em fase pós-puberais destacam-se: orelhas grandes, testa proeminente e macroorquidismo. Em outro estudo realizado em uma população de 20 homens finlandeses com SXF, as características mais frequentes foram macroorquidia (89%), orelhas grandes (84%), fala perseverante (68%), vinco plantar (68%), timidez (68%), hiperextensibilidade (57%), pobre contato visual (57%) e hiperatividade/déficit de atenção (57%) (ARVIO; PEIPPO; SIMOLA, 1997). Neste mesmo trabalho, Arvio, Peippo e Simola (1997) destacam que agressividade (arrogância e o uso de palavrões) foi uma característica comportamental típica de homens com SXF (42%).



Apesar de tais estudos terem observado que há sintomas com maior ou menor frequência significativa em SXF, os *checklists* avaliados não fazem uso das informações de frequência relativas às características físicas e comportamentais presentes em indivíduos com SXF (Tabela 3). A característica ansiedade, por exemplo, considerada um fator chave que inibe ou impede a relação interpessoal em meninos com SXF (comparando-se com meninos com TEA não síndrômico) (THURMAN *et al.*, 2014) e observada em 70% dos homens e 56% das mulheres com a síndrome (BAILEY *et al.*, 2008), não é considerada em nenhum dos *checklists* analisados. Outras características não consideradas incluem atraso no desenvolvimento motor e atraso na linguagem.

**Tabela 3 – Características encontradas em SXF e consideradas em seis *checklists* descritos na literatura.**

Características	HAGERMAN; AMIRI; CRONISTER, 1991	BUTLER <i>et al.</i> , 1991	LAING <i>et al.</i> , 1991	GIANGRECO <i>et al.</i> , 1996	ARVIO; PEIPPO; SIMOLA, 1997	LIMPRASERT <i>et al.</i> , 2000
Deficiência Intelectual	X	X		X		
Hiperatividade	X	X				
Déficit de atenção	X	X		X	X	X
Defensivo tatilmente	X	X			X	
Agitar as mãos	X	X			X	
Morder as mãos	X	X			X	
Pobre contato visual	X	X			X	
Fala perseverante	X	X			X	
Articulações hiperextensíveis	X	X			X	
Orelhas grandes ou proeminentes	X	X	X	X	X	X
Face alongada			X	X		X
Testículos grandes	X	X			X	X
Vinco símio ( <i>Simian crease</i> ) <sup>a</sup>	X	X			X	
Histórico familiar de deficiência intelectual	X	X	X	X	X	X
Comportamento autista				X		
Vinco plantar <sup>b</sup>		X			X	
Olhos azuis pálidos ( <i>pale blue eyes</i> )		X				
Personalidade <sup>c</sup>			X			
<i>Body habitus</i> <sup>d</sup>			X			
Voz alta					X	
Timidez					X	
Uso de palavras					X	
Estilo arrogante na fala					X	
<b>Total de itens avaliados</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>5</b>

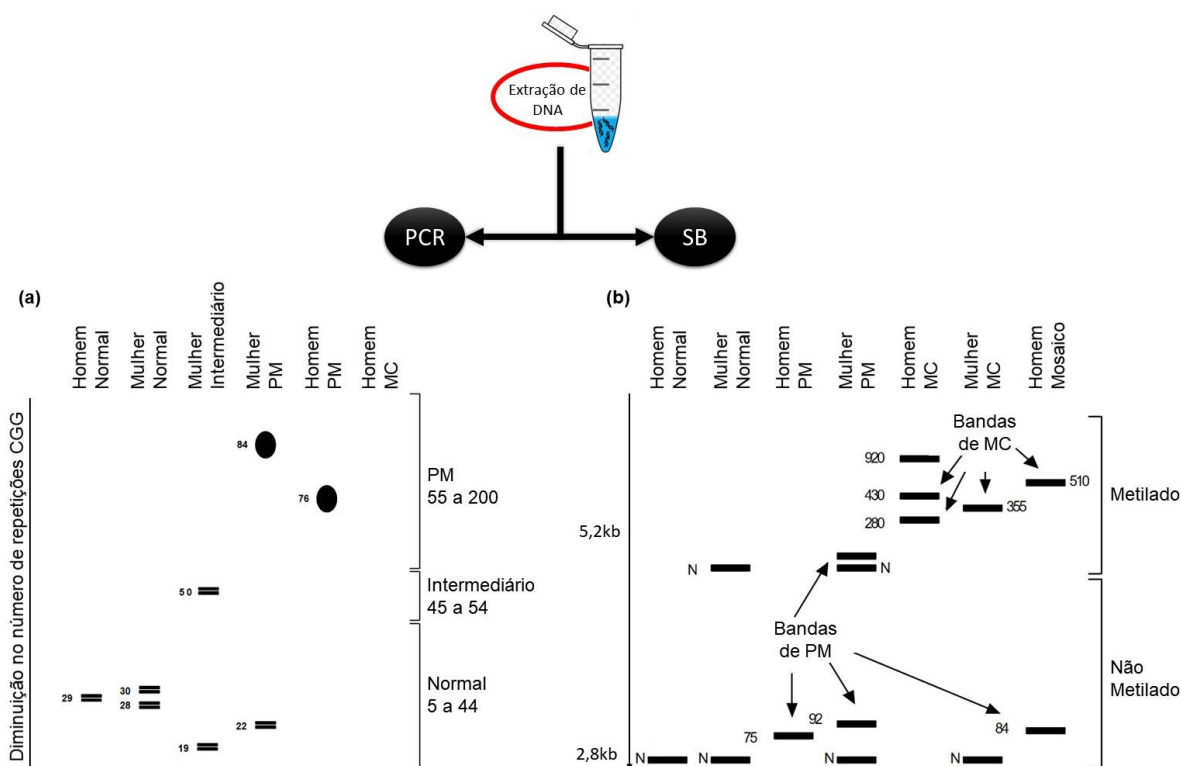
<sup>a</sup> consiste na presença de uma única linha que se estende ao longo da palma da mão; <sup>b</sup> Presença de vincos anormalmente profundos (sulcos/rugas) na pele da planta do pé; <sup>c</sup> Timidez inicial e falta de contato visual, seguida de simpatia e verbosidade com padrões de fala ecológica; <sup>d</sup> Corpo esguio e alta estatura, ombros arredondados, articulações dos dedos hiperextensíveis e falta de pelos no corpo. GIANGRECO *et al.*, 1996, ARVIO; PEIPPO; SIMOLA, 1997 e LIMPRASERT *et al.*, 2000 consideram as características hiperatividade e déficit de atenção como um único item a ser avaliado.

Além disso, tais *checklists*, apesar de identificarem as características mais preditivos para a síndrome, deixam de avaliar de forma diferenciada tais características. A utilização de um *checklist* que trate cada característica de forma diferenciada pode permitir identificar de forma mais eficiente se indivíduos com suspeitas da síndrome devem ou não ser encaminhados para teste genético.

Neste contexto, o uso de um *checklist* é utilizado como uma ferramenta complementar para selecionar os indivíduos que apresentam características da síndrome para que sejam encaminhados para realização de teste genético para análise da expansão CGG no gene *FMR1*.

Os testes genéticos de rotina para o diagnóstico da SXF são baseados em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e *Southern blot* (SB) (Figura 6). Ambas são utilizadas para verificar a quantidade de repetições CGG existente em uma amostra de DNA para determinar a presença da mutação completa da SXF (CARVALHO, 2003). Na análise baseada no uso do PCR (Figura 6a), são utilizados *primers* para amplificar a região das repetições CGG (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013), porém não é possível estimar o nível de metilação do gene *FMR1* (SHERMAN; PLETCHER; DRISCOLL, 2005; MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Na técnica de *Southern blot* (Figura 6b) não é possível obter a mesma resolução da PCR para identificar com precisão a quantidade das repetições CGG (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Entretanto, esta técnica permite detectar eficientemente expansões CGG de tamanho igual ou maiores do que mutações completas, e também determinar o estado de metilação do gene *FMR1* (SHERMAN; PLETCHER; DRISCOLL, 2005; BIANCALANA *et al.*, 2015). Desta maneira, o ideal é que laboratórios de testes genéticos para a SXF possuam os dois métodos disponíveis para realizar de forma complementar as análises para aqueles casos em que uma das técnicas apresentar resultado inconclusivo com relação ao tamanho e/ou metilação das repetições CGG no gene *FMR1* (SHERMAN; PLETCHER; DRISCOLL, 2005; MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

Ambas as técnicas, por serem limitadas à região 5'UTR do gene, não permitem detectar outras variantes genéticas (Não-CGG) já descritas para o gene *FMR1*.



**Figura 6 – Exemplos de resultados de testes moleculares de rotina para análise de repetições CGG.** As bandas são desenhadas para simular a maneira como elas realmente aparecem. **(a)** Ilustração dos produtos de amplificação por PCR. Os exemplos dados são: Homem normal: 29 repetições; Mulher normal: 3 e 28 repetições; Mulher intermediário: 5 repetições (alelo intermediário) e 19 repetições (alelo normal); Mulher PM: 84 repetições (PM) e 22 repetições (alelo normal); Homem PM: 76 repetições; Homem MC: sem banda normal. A MC deve ser confirmada por SB. **(b)** Ilustração dos resultados por SB, onde N refere-se a bandas normais. Os exemplos dados são: Homem normal: uma única faixa de tamanho normal, não metilada; Mulher normal: duas bandas de tamanho normal, uma não-metilada (cromossomo X ativo) e outra metilada (X inativo); Homem PM: uma banda de tamanho aumentado (não metilada) de 75 repetições (dimensionadas por PCR); Mulher PM: padrão de quatro bandas com uma forma não-metilada (no X ativo) e outra metilada (X inativo) de ambas as bandas de PM e normal. Esta PM tem 92 repetições (dimensionadas por PCR); Homem MC: Banda(s) com >2 repetições, metilada. Neste caso, existem três tamanhos diferentes de MC, 28, 43 e 92 repetições; Mulher MC: Banda com > 2 repetições, metilada. Esta MC tem 355 repetições (dimensionada por SB); Homem mosaico: MC e PM. Neste caso, a mutação completa tem 51 repetições (dimensionadas por SB) e a PM tem 84 repetições (dimensionadas por PCR). PCR, Reação em cadeia da polimerase; SB, *Southern blot*; PM, Pré-mutação; MC, Mutação completa. Fonte: Adaptado de TAYLOR, 2018.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar das repetições CGG estarem relacionadas com 99% dos casos de SXF (BIANCALANA *et al.*, 2015), há evidências de que outros tipos de mutações, como SNVs (MYRICK *et al.*, 2014) e deleções (WOLFF *et al.*, 1997) envolvendo parcialmente ou totalmente o *locus* do gene *FMR1*, também podem levar aos fenótipos da síndrome. Apesar de tais tipos de variantes serem raramente reportadas, sua detecção é inviabilizada principalmente devido a metodologia utilizada para diagnóstico molecular da síndrome. Embora muito eficientes, elas limitam-se apenas à identificação de expansão das repetições do tipo CGG na região 5'UTR do gene *FMR1* (BIANCALANA *et al.*, 2015), restringindo assim a detecção de outros tipos de variantes genéticas que também podem ser deletérias para a função do gene. Desta forma, a identificação de novos casos de indivíduos com características típicas da SXF e com variantes genéticas raras no gene *FMR1*, recorrentes ou novas, não restritas à expansão de CGG na região 5'UTR do gene, podem fornecer novos biomarcadores genéticos para diagnóstico da síndrome. Além disso, a identificação de mutações raras no gene *FMR1* também permitirá expandir os conhecimentos acerca da genética da SXF, que ainda se concentram nas repetições do tipo CGG.

Desta forma, o uso de metodologias, como o sequenciamento genético, para identificação de variantes raras em indivíduos com características típicas da SXF, é de extrema importância para contribuir com uma melhor caracterização genética da condição e para o desfecho clínico e aconselhamento genético destes indivíduos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Detectar mutações genéticas raras no gene *FMR1* em indivíduos com características da Síndrome do X Frágil e sem a presença de mutação completa de repetições CGG.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Os seguintes objetivos específicos são propostos para esta pesquisa:

- a) Selecionar indivíduos com características de SXF para posteriormente sequenciar os éxons e regiões de junções íntrons/éxons do gene *FMR1*;
- b) Analisar os dados sequenciados por ferramentas de bioinformática para detectar variantes genéticas no gene *FMR1*;
- c) Anotar as variantes genéticas encontradas em *FMR1*, e investigar por métodos *in silico* os possíveis impactos na função da proteína FMRP.

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Comitê de ética em pesquisa e obtenção dos participantes da pesquisa**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação Paranaense de Cultura – PUCPR (Pontifícia Universidade Católica do Paraná), conforme parecer nº 2.199.666 (Anexo A).

Todos os participantes e/ou seus respectivos responsáveis legais foram informados a respeito da pesquisa, verbalmente e por escrito, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

A população de indivíduos considerados nesta pesquisa foi reunida por meio de uma colaboração com o Instituto Lico Kaesemodel (ILK) (Curitiba, Paraná). O ILK é uma entidade sem fins lucrativos que tem por objetivo promover ações beneficentes junto à sociedade, educando, divulgando e contribuindo ativamente em pesquisas relacionadas aos transtornos do espectro do autismo e condições correlatas, como a SXF. Os indivíduos cadastrados no ILK são encaminhados para consultas médicas e exames clínicos e genéticos para auxiliar no desfecho clínico dos mesmos. O ILK, na forma de uma colaboração científica, forneceu acesso aos registros de famílias cadastradas até dezembro de 2017 e auxiliou diretamente no contato com os participantes da pesquisa, exclusivamente para coleta de amostras. Este contato foi realizado primeiramente via telefone, no qual foi explicado o propósito do estudo. Havendo interesse da família em participar da pesquisa, partimos para a etapa de assinatura do TCLE e obtenção das amostras biológica. Para os participantes residentes em Curitiba e região metropolitana, a assinatura do TCLE e coleta de amostra foi feita diretamente na residência dos indivíduos participantes ou nas dependências do ILK, em datas pré-agendadas. Já os casos residentes em outras cidades/estados, impossibilitando o deslocamento dos participantes e dos pesquisadores, o material para coleta foi enviado e recebido por correio. Nestes casos, o TCLE e o material necessário para coleta foram enviados junto com um manual de instruções claras do procedimento a ser seguido para a coleta. Em ambos os casos, os pesquisadores ficaram a disposição para esclarecer eventuais dúvidas.

Para seleção, todos os cadastros do ILK de indivíduos que apresentam condições neurológicas variadas, incluindo aqueles que possuem diagnóstico positivo da SXF foram analisados. Para os casos com resultado para o teste genético (determinado anteriormente por PCR e/ou *Southern blot*) da expansão CGG, os mesmos foram analisados e divididos em dois grupos: grupo positivo foi considerado aquele com indivíduos que apresentaram mutação completa para expansão CGG (>200 repetições CGG), e grupo negativo aquele formado por indivíduos sem mutação completa para expansão CGG (<200 repetições CGG).

A ficha de cadastro do instituto, é preenchida pelo pai/responsável do indivíduo e é composta por 19 questões (Tabela 4), que consideram informações clínicas básicas e características do indivíduo.

**Tabela 4 - Descrição das informações obtidas a partir das fichas dos indivíduos cadastrados no Instituto Lico Kaesemodel.**

Característica
1. Deficiência Intelectual (DI) ou dificuldades de aprendizado
2. Hiperatividade
3. Déficit de atenção
4. Atraso para começar a falar
5. Atraso para começar a caminhar/engatinhar
6. Defensivo tatilmente
7. Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)
8. Comportamento agressivo em situações de estimulação
9. Pobre contato visual
10. Fala perseverante (ao falar repete e confunde as informações)
11. Hiperextensibilidade (Articulações mais flexíveis que o normal)
12. Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes
13. Macroorquidia (aumento do volume testicular)
14. Ansiedade
15. Calosidade nas mãos decorrente do hábito de mordê-las
16. Diagnóstico de autismo
17. Histórico familiar de Deficiência Intelectual
18. Histórico familiar de Menopausa precoce
19. Histórico familiar de Ataxia

Devido a metodologia utilizada para cálculo de *score* (pontuação 0 para sintomas ausentes, 1 para sintomas borderline ou presente no passado e 2 para sintomas definitivamente presentes), os *checklists* disponíveis na literatura não puderam ser

utilizados para a seleção dos indivíduos a partir dos dados que constavam na ficha do ILK. Desta forma, resolvemos adotar uma abordagem semelhante para a detecção de possíveis indivíduos com SXF por meio da construção de um *checklist* próprio.

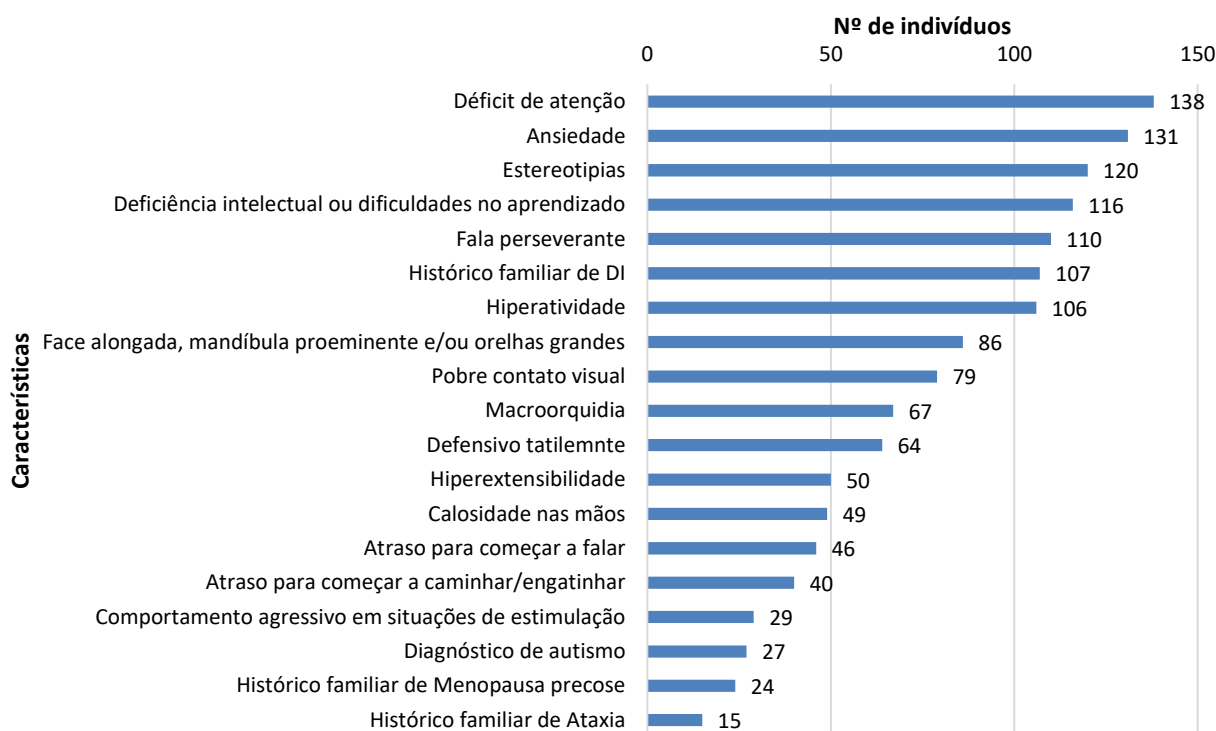
#### **4.2. Proposta de um *checklist* com base nas características de indivíduos com SXF para seleção dos probandos**

Inicialmente, foram analisadas todas as fichas do grupo positivo para a síndrome (com teste genético indicando mutação completa (>200 repetições CGG) por *Southern blot*), correspondendo a 167 fichas, das quais 160 (96%) correspondem a dados de indivíduos do sexo masculino e 7 (4%) do sexo feminino (Apêndice E). Para cada item listado na tabela 4, foi atribuída uma pontuação, sendo 0 (sintoma ausente) ou 1 (sintoma presente). Quando não havia resposta para qualquer um dos itens, considerou-se o sintoma ausente (0). Esta análise, limitou a pesquisa aos dados fornecidos pelos pais/responsáveis dos indivíduos.

A partir desta coleta de dados, foi determinado as características mais frequentes nos indivíduos positivos para a SXF. Tais dados foram então utilizados para a construção de um *checklist*, no qual cada característica observada na SXF foi associada a um peso de acordo com sua frequência de ocorrência na síndrome.

A análise dos dados de 167 indivíduos com SXF e com mutação completa de CGG comprovado por teste genético (PCR e/ou *Southern blot*), mostrou que as características mais frequentes nesta população foram (Figura 7): déficit de atenção, ansiedade, estereotipias, deficiência intelectual ou dificuldades no aprendizado, fala perseverante, histórico familiar de deficiência intelectual e hiperatividade.





**Figura 7 - Frequência das características observadas nos 167 indivíduos geneticamente positivos para SXF.**

Com base na observação de que indivíduos com SXF possuem um conjunto de características mais frequentes (Figura 7) - por exemplo, déficit de atenção ocorreu em 138 dos 167 indivíduos, enquanto hiperextensibilidade das articulações ocorreu em 50 dos 167 indivíduos - realizamos uma classificação destas características analisadas. Para tal, a partir dos dados de frequência observados na população de probandos com SXF desta pesquisa, foi atribuído um peso equivalente a cada característica física e comportamental observada. Assim, criamos um método em que o peso (P) de cada característica (S) foi designado por meio da razão entre a somatória da ocorrência de todas as características ( $S_{s,i}$ , onde  $i=1..p$ , sendo p igual a quantidade de indivíduos) pela somatória da ocorrência de todas as características observadas (TS) (Equação 1).

$$Peso_s = \frac{\sum_{i=1}^{i=p} S_{s,i}}{\sum_{j=1}^{j=TS} (\sum_{i=1}^{i=p} S_{j,i})} \times 100$$

**Equação 1** – Fórmula para cálculo do Peso atribuído para cada característica analisada pela pesquisa (listados na Figura 7). P, peso; S, característica; TS, ocorrência de todas as características observadas.

Por exemplo, o cálculo do peso referente à característica déficit de atenção foi feito da seguinte maneira:

$$Peso_{\text{déficit de atenção}} = \frac{138}{1404} \times 100$$

**Equação 2** – Exemplo de aplicação da equação 1 para o cálculo do peso referente à característica déficit de atenção.

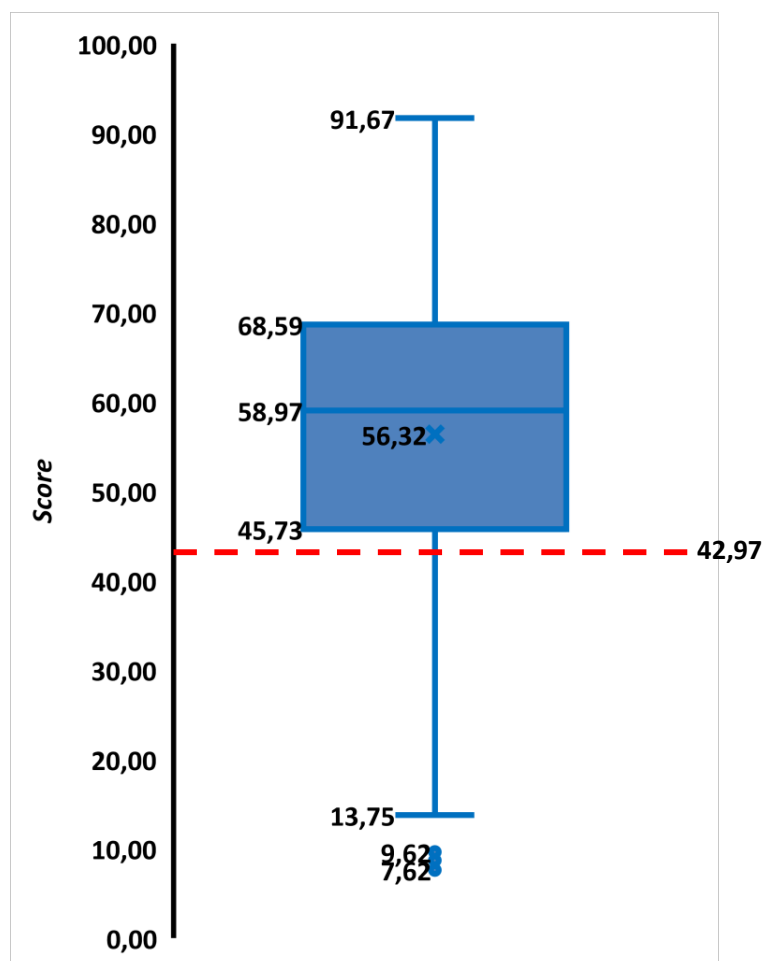
Após a determinação dos pesos percentuais de cada característica da população de probandos analisada, foi criada uma tabela correspondente ao *checklist* proposto por esta pesquisa (Tabela 5). Para cada característica analisada, é feito o somatório dos pesos que determinará o *score* de um indivíduo testado com o *checklist*.

**Tabela 5 – Checklist proposto com Pesos para cada característica da população positiva para SXF.**

Característica	Frequência da presença da característica	Peso atribuído (%)
Déficit de atenção	138	9,83
Ansiedade	131	9,33
Estereotípias	120	8,55
Deficiência Intelectual ou dificuldades no aprendizado	116	8,26
Fala perseverante	110	7,83
Histórico familiar de Deficiência Intelectual	107	7,62
Hiperatividade	106	7,55
Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	86	6,13
Pobre contato visual	79	5,63
Macroorquidia (aumento do volume testicular)	67	4,77
Defensivo tatilmente	64	4,56
Hiperextensibilidade das articulações	50	3,56
Calosidade nas mãos	49	3,49
Atraso para começar a falar	46	3,28
Atraso para começar a caminhar/engatinhar	40	2,85
Comportamento agressivo em situações de estimulação	29	2,07
Diagnóstico de autismo	27	1,92
Histórico familiar de Menopausa precoce	24	1,71
Histórico familiar de Ataxia	15	1,07
TOTAL	1404	100

A partir da somatória dos pesos atribuídos a cada característica (conforme Tabela 5) foi calculado o *score* dos 167 indivíduos positivos para SXF. Aplicando uma análise de variância, determinou-se que o *score* médio da população positiva para SXF é de 56,32, com intervalo de confiança de 2,76. Observou-se também que 5% da população positiva

para SXF apresenta *score* entre 45,73 e 68,59 (Figura 8). Aplicando-se o intervalo de confiança, os indivíduos positivos para SXF apresentaram *score* mínimo de 42,97.



**Figura 8 – Distribuição dos valores de *score* na população positiva (167 indivíduos).** A linha pontilhada representa o *score* mínimo de 42,97 (ponto de corte) observado na população positiva. Positivos correspondem a indivíduos com mutação completa (>200 repetições CGG).

A seleção dos indivíduos participantes da pesquisa se deu a partir da aplicação do *checklist* proposto no grupo negativo para SXF (formado por indivíduos com <200 repetições CGG), utilizando o *score* mínimo de 42,97 como critério de seleção. Desta forma, apenas os indivíduos negativos com *score*  $\geq 42,97$  foram selecionados.

Após a aplicação do *checklist* proposto para seleção dos indivíduos da pesquisa, os participantes foram reavaliados com base no *Checklist* do X Frágil (do inglês *Fragile X Checklist*) (HAGERMAN; AMIRI; CRONISTER, 1991). Neste questionário (Anexo C), são obtidas as seguintes informações dos indivíduos: deficiência intelectual,

hiperatividade, períodos curtos de atenção, defensivo tatilmente, agita as mãos, morde as mãos, pobre contato visual, fala perseverante, hiperextensibilidade, orelhas grandes ou proeminentes, testículos grandes, palma da mão com linhas do tipo vinco símio ou linha sydney e histórico familiar de deficiência intelectual. Para cada resposta, foi atribuído um valor, que pode ser 0 (ausente), 1 (*borderline* ou presente no passado) ou 2 (definitivamente presente). Ao término, os resultados foram somados para gerar um *score* para cada participante. Segundo Hagerman e colaboradores (1991), indivíduos com *score* a cima de 6 possuem chances de apresentar SXF, indicando necessidade de diagnóstico genético.

#### **4.3. Coleta de amostras biológicas, extração e quantificação de DNA**

Após aprovação do projeto pelo CEP (Anexo A) e assinatura do TCLE (ANEXO B), as amostras biológicas dos indivíduos selecionados foram obtidas a partir de saliva, usando o kit de auto coleta da Oragene DNA OG-500 (DNA Genotek Inc., Canadá). Este kit fornece um tubo de coleta (para 2 ml de saliva) com 1 ml de reagente que inativa bactérias e nucleases presentes na amostra, e também estabilizam a amostra antes da extração do DNA (BIRNBOIM, 2011; GARBIERI *et al.*, 2017). A todos os participantes, foi solicitado jejuar por pelo menos 30 minutos antes da coleta de uma quantidade equivalente a 2 ml de saliva. Para aqueles indivíduos que apresentaram alguma incapacidade em realizar a coleta nos tubos Oragene, as amostras foram coletadas utilizando raspagem *swabs*. A raspagem foi realizada em todo o comprimento das bochechas internas com *swab* estéril, cerca de 20 vezes em movimento circular. Os *swabs* foram colocados no tubo do kit Oragene. Após a coleta, cada amostra foi identificada e armazenada à temperatura ambiente até a extração de DNA (IWASLOW; DESBOIS; BIRNBOIM, 2011).

Os experimentos de extração de DNA foram realizados no Laboratório Experimental Multiusuários (LEM) da PUCPR. O DNA foi extraído com base no protocolo para purificação manual de DNA recomendado pelo fabricante usando o reagente PrepIT-L2P (DNA Genotek Inc, Canadá).

As amostras foram misturadas suavemente por inversão 5 vezes e incubadas a 50°C em banho-maria *overnight*. Em seguida, transferiu-se 500 µl da amostra para um microtubo (1,5 ml), a qual foi submetida à lise através da adição de 20 µl (1/25 do volume)

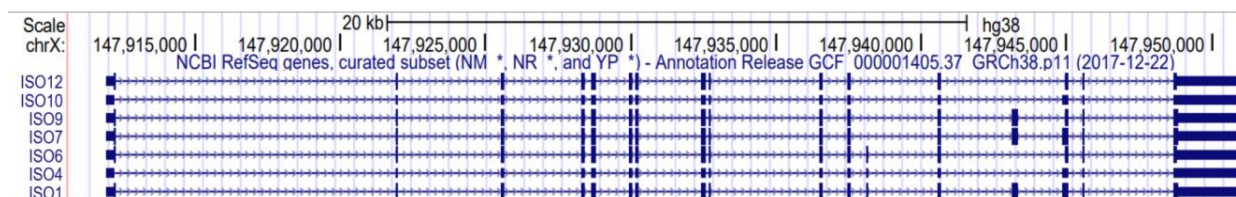
do reagente PrepIT-L2P, seguido de agitação em vórtex por 5 segundos e incubação em gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se em temperatura ambiente durante 10 minutos a 13400 rpm e transferiu-se cuidadosamente, com a ponta de uma pipeta, o sobrenadante para um novo microtubo. O *pellet* contendo impurezas foi eliminado. Em seguida, adicionou-se 600 µl de etanol 100% à temperatura ambiente e misturou-se suavemente por inversão 10 vezes, seguido de repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos para a precipitação do DNA. Em seguida, a amostra foi centrifugada à temperatura ambiente durante 4 minutos a 13400 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi pipetado cuidadosamente para não perturbar o *pellet* contendo DNA e eliminado. O *pellet* foi submetido a um banho de etanol 70% (250 µl) à temperatura, seguido por repouso *overnight* à temperatura ambiente para garantir a completa remoção do etanol da amostra. Em seguida o DNA foi reidratado em 100µl de água ultrapura Milli-Q e vortexado por 5 segundos. Para garantir uma reidratação completa do DNA, a amostra foi incubada à temperatura ambiente de um dia para o outro, seguido de vórtex por 5 segundos.

A quantidade e a pureza do DNA genômico extraído foram determinadas por absorvância em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

Após a determinação da concentração, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento genético e em seguida armazenadas em freezer a -20°C.

#### **4.4. Desenho de primers e sequenciamento do gene *FMR1***

O DNA foi amplificado por PCR com uso de 15 pares de *primers* específicos para amplificar todos os éxons e também os sítios de *splicing* (sítio doador e receptor de *splicing*) dos íntrons do gene *FMR1*, considerando todas as 5 isoformas de *splicing* dos transcritos codificantes de proteína (Figura 9, Tabela 6) de tal gene. Os *primers* (Tabela 7) foram desenhados através do programa Primer3 (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER *et al.*, 2012), tomando-se como base a sequência de nucleotídeos (chrX:147,911,852-147,951,325) extraída do genoma de referência humano GRCh38 e seguindo os seguintes critérios: a) garantir produtos de amplificação com tamanho superior a 400 nucleotídeos e inferior a 900 nucleotídeos; b) garantir amplificação de pelo menos 25 nucleotídeos dos íntrons anteriores e posteriores aos éxons e c) desconsiderar primers com efeito *off-target* para garantir especificidade.



**Figura 9 – Locus do gene *FMR1* e suas respectivas isoformas de *splicing* dos transcritos codificantes de proteína.** As 7 isoformas de *splicing* subdividem-se em: 5 transcritos que codificam para a proteína FMRP (ISO12, ISO9, ISO7, ISO6 e ISO1,) e 2 transcritos não codificantes (ISO1 e ISO4), conforme detalhado na Tabela 6.

**Tabela 6 – Isoformas de *splicing* do gene *FMR1* descritas na base RefSeq.** ID: refere-se à identificação da isoforma; Cód. RefSeq Transcrito: código RefSeq da isoforma de *splicing* do transcrito do gene *FMR1*; Éxons: quantidade de éxons do transcrito; CDS: tamanho da região codificante; Cod. RefSeq Proteína: código RefSeq da proteína FMRP.

ID	Cód. RefSeq Transcrito	Éxons	CDS	Tamanho em nucleotídeos	Cod. RefSeq Proteína
ISO1	NM_002024	17	1899pb	4411pb	NP_002015
ISO4	NR_033699	16	-	4215pb	RNA não codificante
ISO6	NM_001185075	16	1614pb	4140pb	NP_001172004
ISO7	NM_001185076	16	1836pb	4348pb	NP_001172005
ISO9	NM_001185082	16	1761pb	4273pb	NP_001172011
ISO10	NR_033700	15	-	4152pb	RNA não codificante
ISO12	NM_001185081	15	1551pb	4077pb	NP_001172010

**Tabela 7 - Primers desenhados com utilização da ferramenta Primer3 para amplificação dos éxons do gene *FMR1*.** Primer ID: nomenclatura padrão utilizada para cada par de primer; Éxons, refere-se aos éxons do gene *FMR1* amplificados pelo primer; *Forward Primer*: primer para amplificação no sentido 5' – 3'; *Reverse Primer*: primer para amplificação no sentido 3' – 5'; Produto (pb): tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb).

Primer ID	Éxons	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	Produto (pb)
P1	1	CGTGACGTGGTTTCAGTGTT	AAGGAAGGGCGAAGATGG	699
P2	2	CGAGATGTTGAAATCTGTGGAG	GGTTTCTTTCTTCACATTCAAGG	561
P3	3	TGTTGCTGTATTGTGTTTAGAGAAA	TAGTGGGCAAAGGAACTTGC	593
P4	4 e 5	GTATCTCTGCCTACCTCGGG	TTGCCAAAGTCCACCAAATTT	789
P5	6 e 7	TGTATGTGTAATCTGCCTGCA	GCTCCCCATATTCAAGTTGTGG	459
P6	8 e 9	GACCCCTCATATACAGGGTCAA	AAAAGAACAGATCATATTTCAAAGACT	584
P7	10	AGCGTACCCTTTTGTGCAA	GTGACTAATCCAAACTCACTGCA	629
P8	11 e 12	GCTAAATAAAGTCTTAAATTGGTCCTT	TGTTAACAAGGGGAATAAACATTAAA	824
P9	13	TCTGATACGTTTAAAAGGTTGCT	GGCTATGTACAGGATTGCCTAAA	592
P10	14	TCCTATCATGAAGAAGTCCCCA	GGAAACCATGTAGCGGCAA	651
P11	15 e 16	CCTGAAACGTCTCTGGAAGC	AAATCTCAAACCTACCATATTCAAACAA	892
P12		TCTTGTCAGGCCAATTACAGA	TGGA AAAAGTGGACCAAACA	700
P13	17	TCTCGTATAGAAGTCTTCATGAAATG	CCTGCTTCCAATGTTTCTTAGAC	700
P14		GGAAGGTCATTTCCATGTATGC	AAAATCCAATCTGTTGTCGCTAA	695
P15		GCTCTTGGGCAATATTCTCTG	CCCCACATATCATTAGTTTTTGTGTC	685

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA). O volume final da PCR foi de 10 µl, contendo: 2 µg de DNA, 0,5µM de cada par de primer, 0,25 mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de tampão (Tris10 mM, pH 8,5) e 0,25 unidades (U) da enzima Taq DNA polimerase. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

Os produtos de PCR foram purificados usando o Kit Expand™ High Fidelity PCR System (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Os produtos purificados foram então sequenciados pelo método de Sanger. O preparo da reação de sequenciamento foi realizado usando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (AppliedBiosystems, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As seguintes quantidades de reagentes foram utilizadas por reação: 2 µl de BigDye 3.1, 1 µl de tampão BigDye 5x Sequencing, 1 µl (5 pmol/µl) de primers, 40 ng de produto de PCR e 10 µl de água ultrapura. Os primers do sequenciamento foram os mesmos utilizados para a amplificação por PCR.

Ao final da preparação das amostras para a reação de sequenciamento, foram usadas as seguintes condições para amplificação do DNA: 96°C por 1 minuto seguido de 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Ao final dos ciclos da reação de sequenciamento, foi feita a purificação por precipitação com Etanol e EDTA, conforme descrito no protocolo do kit BigDye Terminator v3.1 (AppliedBiosystems, EUA). Para precipitação, adicionou-se 2,5 µl de EDTA (125 mM) e 25 µl de etanol 100%, seguido de homogeneização por inversão (4 vezes) e centrifugação a 4000 rpm por 45 minutos. Descartou-se o sobrenadante, seguido da adição de 150 µl de etanol 70% e centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e para remover o etanol, deixou-se escorrer o excesso sobre papel absorvente. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos e embrulhadas em papel alumínio para armazenamento a 4°C até o momento da utilização. O sequenciamento foi realizado no sequenciador HiSeq 2500 (Illumina, Inc., EUA).

O processamento das amostras, extração e quantificação de DNA e desenho de primers foram realizados no LEM da PUCPR. Os experimentos de PCR e

sequenciamento Sanger foram realizados em colaboração com o Laboratório de Células Tronco do pesquisador Dr. Alysson Muotri – Universidade da Califórnia San Diego (UCSD, Estados Unidos). Com os dados de sequenciamento, foram realizadas as análises de bioinformática utilizando a estrutura computacional do LEM – PUCPR.

#### **4.5. Análise por bioinformática das variantes no gene *FMR1* e seu possível papel na proteína FMRP**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o protocolo SpeedSeq (CHIANG *et al.*, 2015) para análise de variantes. Neste protocolo foi aplicado inicialmente o processo de alinhamento. Foi utilizado o alinhador *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) (LI; DURBIN, 2009) com parâmetros padrão e os dados sequenciados foram mapeados contra o genoma de referência humano Hg38. Após os dados provenientes do alinhamento foram ordenados, indexados e armazenados em arquivos binários em formato BAM (*Binary Alignment Map*). Com estes arquivos foi realizada a identificação de variantes genéticas de cada indivíduo em relação ao genoma de referência. As variantes identificadas foram armazenadas em arquivos no formato VCF (*Variant Call Format*).

Posteriormente, as variantes identificadas foram submetidas a um processo de anotação, as quais foram geradas as seguintes informações: frequência populacional em bancos de dados de exomas de pessoas saudáveis, como do NHLBI *Grand Opportunity* (NHLBI GO Exome Sequencing Project, 2018), 1000 Genomas (GIBBS *et al.*, 2015), do *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) (LEK *et al.*, 2016) e ClinVar (LANDRUM *et al.*, 2014). Além disso, foi também incluído o código das variantes genéticas usando o sistema *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP) (SHERRY *et al.*, 2001).

Outros softwares foram utilizados para prever a patogenicidade das variantes encontradas a nível proteico. PolyPhen2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) (ADZHUBEI *et al.*, 2010) prediz o possível impacto de substituição de aminoácidos na estabilidade e função de proteínas utilizando considerações destas mudanças a nível estrutural e evolucionário. Estas propriedades são utilizadas para se estimar a probabilidade de mutações não sinônimas possuir efeito deletério na proteína. O software SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (VASER *et al.*, 2016), através de uma busca da sequência de uma proteína em uma base de dados de proteínas permite a obtenção de sequências de



proteínas homólogas. As sequências apropriadas são escolhidas, alinhadas e, para uma posição específica, SIFT examina a composição de aminoácidos e calcula a pontuação. Um *score* SIFT é uma probabilidade normalizada de observar o efeito de um novo aminoácido em determinada posição e varia de 0 (efeito deletério) a 1 (efeito tolerado). A ferramenta PredictSNP2 (BENDL *et al.*, 2016) utiliza um modelo que combina o resultado de seis ferramentas de predição do efeito de mutações na função da proteína. O *score* PredictSNP2 varia de -1 a +1 (-1 a 0 efeito neutro e 0 a +1 efeito deletério). *MutationTaster* (SCHWARZ *et al.*, 2014) é um software que prediz a consequência funcional da substituição de aminoácidos, alterações intrônicas e mutações que abrangem junções entre íntrons/éxons. O *score* da ferramenta *Mutation Taster* é compreendido no intervalo de 0 a 1 e indica probabilidade de predição: quanto mais próximo de 1 observa-se maior confiabilidade quanto ao resultado da predição. Já os softwares BDGP *Splice Site Prediction by Neural Network* (Nnsnplice) (REESE *et al.*, 1997) e *Human Splicing Finder* (DESMET *et al.*, 2009) são ferramentas utilizadas para predizer possíveis efeitos de modificações em regiões de *splicing*.

As bases de dados PolymiRTS (*Polymorphism in microRNAs and their TargetSites*) (BHATTACHARYA; ZIEBARTH; CUI, 2014) e MirSNP (LIU *et al.*, 2012) foram utilizadas para analisar variantes genéticas em sítios de ligação de microRNA (miRNA) e mRNA.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

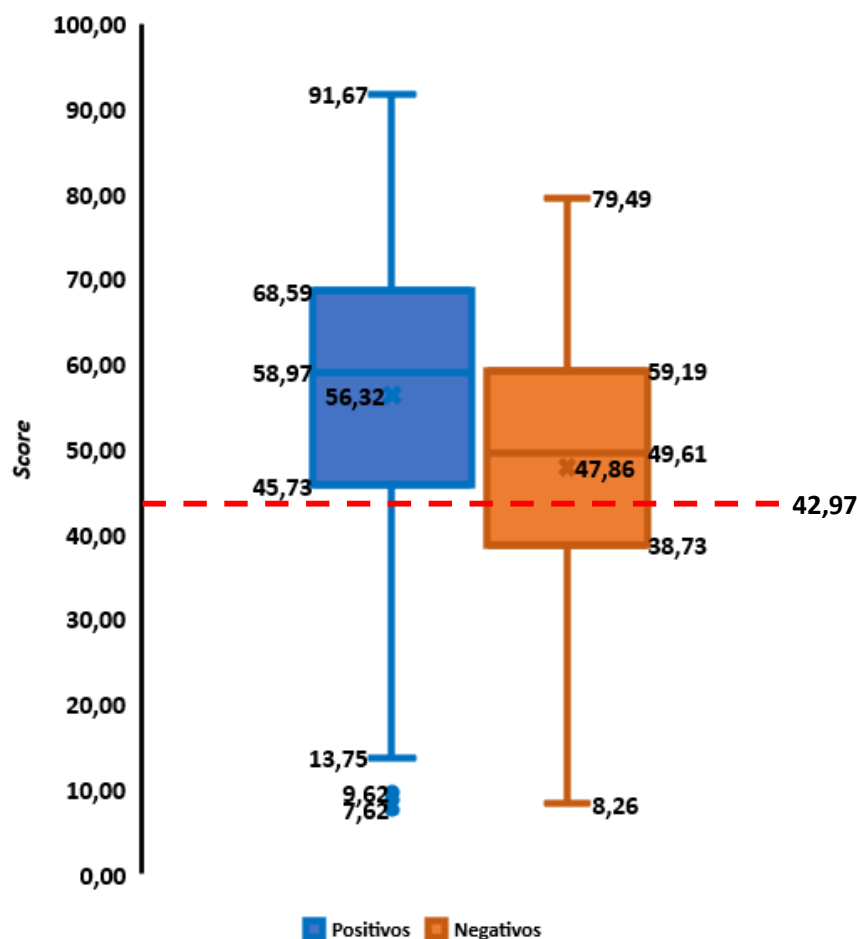
Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos nesta pesquisa. Na seção 5.1 demonstrou-se a forma com que participantes da pesquisa foram selecionados por meio do *checklist* proposto. A partir dos participantes selecionados, foi descrito na seção 5.2 os resultados obtidos a partir do processamento das amostras biológicas para extração do DNA das mesmas. Finalmente, na seção 5.3, são apresentados e discutidos os resultados do sequenciamento genético, incluindo detecção das variantes genéticas por métodos de bioinformática, descrição das variantes e análise funcional *in silico* do impacto das mesmas na função da proteína FMRP.

### 5.1. Aplicação de um checklist para seleção de indivíduos para a pesquisa

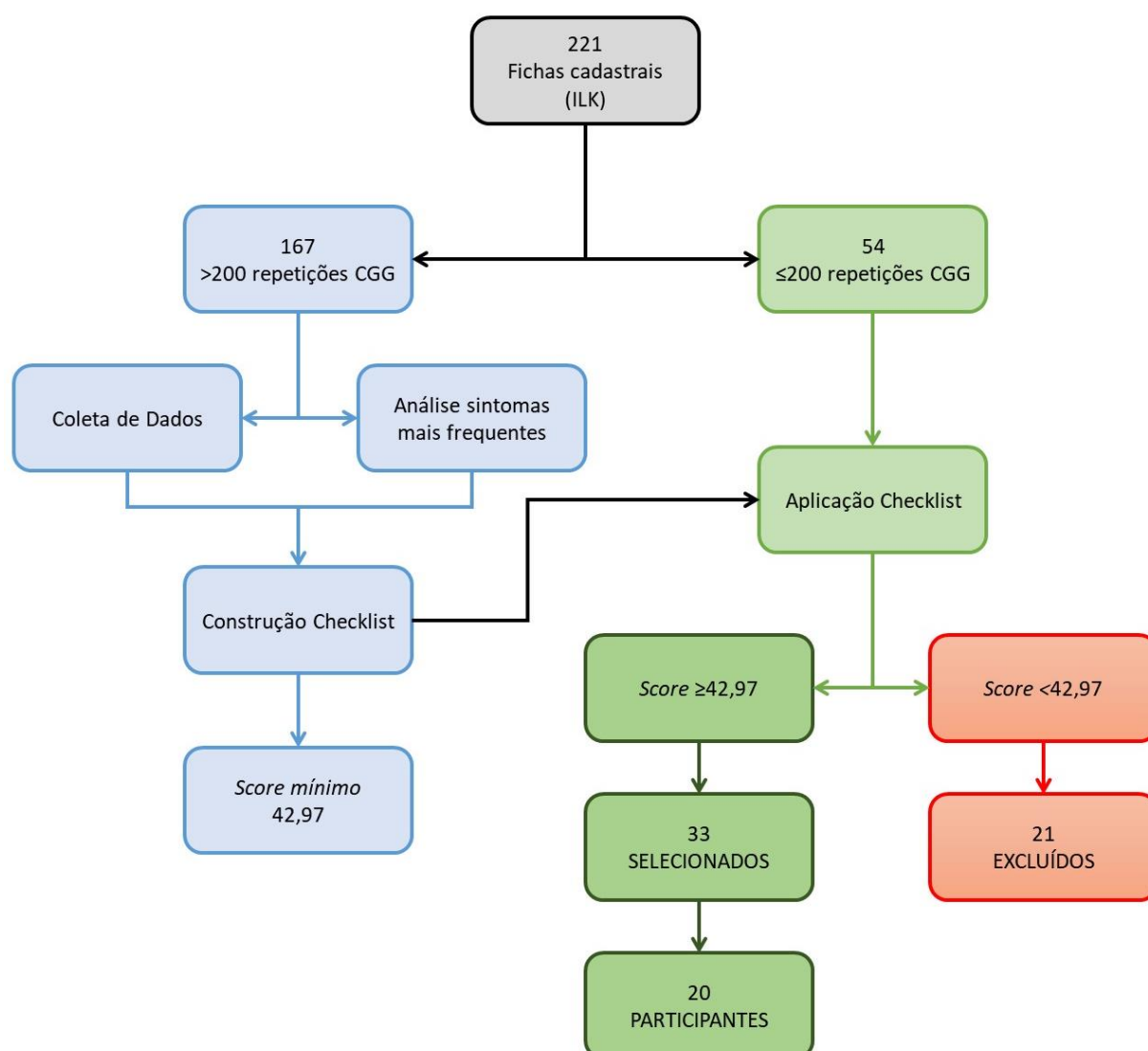
A partir do *checklist* construído foi dado início a etapa de seleção dos probandos participantes desta pesquisa. Para tal, o *checklist* foi aplicado em 54 indivíduos cadastrados no ILK que apresentam diferentes características de SXF, e com resultado de teste genético (PCR e/ou *Southern blot*) negativo para a expansão CGG, isto é, não apresentam mutação completa. Para cada probando, foi obtida pontuação para o *checklist* a partir da somatória dos pesos atribuídos a cada característica apresentada pelo indivíduo. Posteriormente os valores obtidos foram comparados com os dados utilizados para a construção do *checklist* (probandos com teste genético positivo) (Figura 10).

Todos os indivíduos que apresentaram teste genético negativo para SXF e que apresentaram  $score \geq 42,97$  foram selecionados (Figura 11), resultando em 33 indivíduos selecionados de ambos os sexos e diferentes idades. Com o objetivo de genotipar os casos mais relevantes, aplicamos de forma complementar o *Checklist* do X Frágil (do inglês *Fragile X Checklist*) proposto por Hagerman e colaboradores (1991) (Tabela 8). Segundo este *Checklist* as chances de um indivíduo ser positivo para a síndrome aumentam conforme o *score* calculado é maior: indivíduos com *score* entre 2 a 5, as chances são praticamente nulas; de 6 a 10 as chances são de 3%; *score* 11 a 15, chance de 4%; *score* 16 a 18, chance de 45% e de 19 a 21 chance de 50%. Os *scores* de Hagerman foram calculados para os indivíduos, e os resultados mostram que nenhum deles apresentou *score* (segundo Hagerman *et al.*, 1991) entre 2 e 5, sugerindo que, de

forma equivalente ao *checklist* proposto neste trabalho, todos podem ser positivos para a síndrome. Desta forma, dentre os 33 indivíduos previamente selecionados, foi possível a coleta de material biológico de 20 participantes do estudo (indicados por \* na Tabela 8). Os demais participantes não foram considerados devido a problemas de acessos aos mesmos.



**Figura 10 – Distribuição dos valores de *score* na população positiva (167 indivíduos) e negativa (54 indivíduos) para SXF.** A linha pontilhada representa o *score* mínimo observado na população positiva de 42,97 (ponto de corte). Positivos correspondem a indivíduos com mutação completa (>200 repetições CGG); Negativos correspondem a indivíduos com  $\leq 200$  repetições CGG.



**Figura 11 – Descrição das etapas realizadas para seleção dos indivíduos participantes desta pesquisa.** Inicialmente 221 fichas de indivíduos cadastrados no ILK foram divididas em dois grupos: a) grupo composto por 167 fichas de indivíduos com diagnóstico genético comprovando MC (>200 repetições CGG) e b) grupo composto por 54 fichas de indivíduos com diagnóstico genético negativo para SXF (≤200 repetições CGG). No primeiro grupo, foi realizada coleta de dados referentes a características físicas e comportamentais de cada indivíduo, permitindo identificar as características mais frequentes em 167 indivíduos com SXF. Estes dados foram utilizados para construir um *checklist*, no qual, as características mais frequentes possuem um maior peso, resultando em um *score* para cada um indivíduo. Os resultados de *score* de cada um dos 167 indivíduos permitiram determinar que o *score* mínimo para este grupo é de 42,97. No segundo grupo, aplicamos o *checklist* proposto (as informações para responder o *checklist* foram obtidas das fichas cadastrais) e aqueles indivíduos com *score* ≥42,97 foram previamente selecionados para participar da pesquisa e os indivíduos com *score* <42,97 foram excluídos. Entre os 33 indivíduos previamente selecionados, 20 participaram da pesquisa.

**Tabela 8 – Indivíduos selecionados com base no score gerado pelo *checklist* criado ( $\geq 42,97$ ). Os códigos dos indivíduos (ID) destacados com \* representam os 20 indivíduos que participaram da pesquisa.**

ID	Score		Sexo	Idade
	Segundo <i>checklist</i> proposto	Segundo Hagerman <i>et al.</i> , 1991		
PN02*	45,44	9	M	26
PN04*	49,15	10	M	21
PN06	54,34	.	M	9
PN08*	62,96	16	M	24
PN09*	70,09	11	M	6
PN11*	70,16	15	M	8
PN13*	58,12	16	M	10
PN15	45,23	.	M	8
PN20*	61,97	16	M	15
PN21*	49,57	15	M	23
PN23	65,03	.	F	12
PN25	58,12	.	M	9
PN26	54,63	.	M	9
PN27	58,26	.	M	16
PN28*	53,21	11	M	26
PN30	65,17	.	M	13
PN31*	66,31	17	M	12
PN34*	57,05	8	F	28
PN36	79,49	.	M	10
PN38*	54,63	7	M	17
PN39*	53,28	11	M	13
PN40*	67,74	19	M	8
PN41*	65,88	17	M	8
PN42*	55,27	10	M	9
PN44*	49,64	13	F	5
PN45*	81,26	22	M	17
PN46	48,93	.	M	11
PN47	75,50	.	M	15
PN49	51,78	.	M	19
PN50	46,15	.	M	17
PN51*	56,98	13	M	10
PN52	45,23	.	M	19
PN53*	63,11	14	M	18

### 5.1.1. Características fenotípicas de indivíduos com Síndrome do X Frágil

Após a seleção dos participantes da pesquisa por meio do *checklist*, foi observado que as características mais frequentes na população com teste positivo e negativo para SXF são similares com relação a ordem de frequência com que ocorrem, porém em todos os casos, a frequência é maior na população geneticamente positiva (Tabela 9).

**Tabela 9 – Relação das características mais frequentes na população geneticamente positiva e negativa para SXF.**

<b>Características</b>	<b>% X frágeis Positivos (nº observado/nº total)</b>	<b>% X frágeis Negativos (nº observado/nº total)</b>
Déficit de atenção	82,6% (138/167)	59,3% (32/54)
Ansiedade	78,4% (131/167)	57,4% (31/54)
Pobre contato visual	71,8% (12/167)	50,0% (27/54)
Fala perseverante	69,4% (116/167)	48,1% (26/54)
Deficiência Intelectual ou dificuldades no aprendizado	65,9% (11/167)	42,6% (23/54)
Hiperatividade	64,1% (17/167)	42,6% (23/54)
Estereotipias	63,5% (16/167)	38,9% (21/54)
Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	51,5% (86/167)	35,2% (19/54)
Defensivo tatilmente	47,3% (79/167)	24,1% (13/54)
Diagnóstico de autismo	40,1% (67/167)	18,5% (1/54)
Macroorquidia	38,3% (64/167)	18,5% (1/54)
Hiperextensibilidade das articulações	29,9% (5/167)	18,5% (1/54)
Histórico familiar de Deficiência Intelectual	29,3% (49/167)	18,5% (1/54)
Calosidade nas mãos	27,5% (46/167)	14,8% (8/54)
Atraso para começar a falar	23,9% (4/167)	13,0% (7/54)
Comportamento agressivo em situações de estimulação	17,4% (29/167)	7,4% (4/54)
Atraso para começar a caminhar/engatinhar	16,2% (27/167)	5,6% (3/54)
Histórico familiar de Ataxia	14,4% (24/167)	3,7% (2/54)
Histórico familiar de Menopausa precoce	9,0% (15/167)	3,7% (2/54)

As características mais frequentemente observadas nos 167 probandos positivos envolvem aspectos cognitivos e comportamentais ao invés de características físicas: déficit de atenção (82,6%), ansiedade (78,4%), pobre contato visual (71,8%), fala perseverante (69,4%), deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado (65,9%), hiperatividade (64,1%) e estereotipias (63,5%).

Déficit de atenção e ansiedade, apesar de serem características que podem apresentar comorbidade com outras síndromes do espectro do autismo, foram os mais frequentes (82,6% e 78,4% respectivamente). Pobre contato visual, considerado um bom

indicativo para SXF (HAGERMAN; AMIRI; CRONISTER, 1991; BOY *et al.*, 2001) foi a terceira característica mais frequente, observada em 71,8% dos indivíduos.

## 5.2. Análise do material genético dos participantes da pesquisa

Após a seleção dos probandos da pesquisa com base no critério de corte do *checklist*, foram selecionados 20 indivíduos com maior score e com disponibilidade para realizar a etapa de coleta de material biológico para estudo genético. Na primeira etapa, realizamos coleta de material de todos os probandos selecionados.

O grupo amostral desta pesquisa é composto por 18 indivíduos do sexo masculino e 2 do sexo feminino (Tabela 10) com faixa etária variando entre 5 a 28 anos (média = 15,2 anos).

**Tabela 10 – Distribuição percentual da frequência de amostras quanto ao sexo.**

Sexo	População negativa	
	Frequência	
	Absoluta	Relativa
Masculino	18	90%
Feminino	2	10%
Total	20	100%

Após recebimento das amostras biológicas, foi realizada a extração de DNA dos 20 indivíduos participantes. Em seguida foi determinada a concentração e pureza do material extraído das amostras de DNA pelo método de absorvância em espectrofotômetro (Tabela 11). O DNA extraído foi amplificado por meio da técnica de PCR e sequenciado pelo método de Sanger.

**Tabela 11 – Resultados de concentração e pureza de DNA extraído dos 20 indivíduos participantes.**

ID	Concentração DNA	Volume Total	Concentração total	$A_{260}/A_{280}$
PN02	276,6 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	13830 ng	1,86
PN04	71,4 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	3570 ng	1,72
PN08	51,1 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	5110 ng	1,76
PN09	72,7 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	727 ng	1,83
PN11	21,5 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	215 ng	1,70
PN13	101,9 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	5095 ng	1,85
PN20	95,9 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	4795 ng	1,85
PN21	99,9 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	4995 ng	1,80
PN28	99,3 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	4965 ng	1,75

(continua)

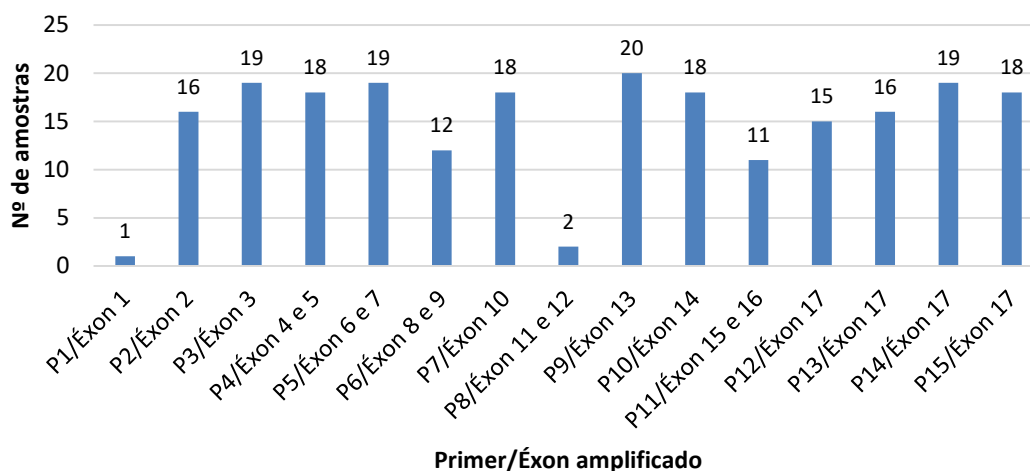
(conclusão)				
ID	Concentração DNA	Volume Total	Concentração total	$A_{260}/A_{280}$
PN31	107,7 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	5385 ng	1,94
PN34	78,6 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	786 ng	1,58
PN38	53,5 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	5,35 ng	1,40
PN39	92,2 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	4,610 ng	1,95
PN40	30,6 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	3,06 ng	1,68
PN41	108,2 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	5,410 ng	1,91
PN42	231,6 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	11,58 ng	1,90
PN44	108,8 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	5,44 ng	1,78
PN45	199,1 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	9955 ng	1,80
PN51	61,9 ng/ $\mu$ l	100 $\mu$ l	6,19 ng	1,70
PN53	476,2 ng/ $\mu$ l	50 $\mu$ l	23,81 ng	1,94

ID é a identificação do indivíduo participante, onde PN refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos considerados negativos (PN=paciente negativo);

### 5.3. Identificação de variantes genéticas no gene *FMR1*

Os resultados obtidos a partir das análises das amostras de saliva dos 20 indivíduos participantes foram classificados em dois grupos: conclusivos e indeterminados. Os resultados foram definidos como conclusivos quando os éxons foram amplificados corretamente pelos primers, gerando produtos para sequenciamento genético. Por outro lado, quando os éxons do gene *FMR1* apresentaram falhas na amplificação, impossibilitando o sequenciamento, foram classificados como indeterminados. A análise dos 17 éxons das 22 amostras resultou em 300 amplificações, das quais 222 (74%) foram conclusivas e 93 (26%) indeterminadas (Figura 12). No apêndice F, é possível verificar os detalhes dos primers amplificados para cada amostra. Por meio da análise de dados, os *primers* P1 e P8 apresentaram eficiência abaixo de 10% para amplificação das amostras. Os *primers* P6 e P8 amplificaram aproximadamente 50% das amostras e os *primers* restantes apresentaram eficiência de amplificação superior a 65%.





**Figura 12 – Relação do número de amostras que amplificaram para cada primer utilizado na amplificação dos éxons do gene *FMR1*.**

### 5.3.1. Características das variantes genéticas encontradas

A análise por sequenciamento do gene *FMR1* permitiu identificar que das 20 amostras analisadas, 9 (45%) (Tabela 12) apresentaram variantes genéticas no gene *FMR1*. Todos os indivíduos são do sexo masculino e as características mais observadas incluem: déficit de atenção, deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade e estereotipias e pobre contato visual.

**Tabela 12 – Características dos 9 indivíduos que apresentaram algum tipo de variante genética no locus do gene *FMR1*.** ID: identificação do indivíduo participante, onde PN refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos considerados negativos (PN=paciente negativo); Fenótipo: características apresentadas pelo indivíduo (tais informações foram obtidas a partir das fichas dos indivíduos cadastrados no Instituto Lico Kaesemodel); Sexo: M – masculino; Idade: idade do participante no momento da coleta das amostras.

(continua)

ID	Fenótipo	Sexo	Idade	Repetições CGG
PN08	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotipias, fala perseverante, hiperextensibilidade das articulações, ansiedade, calosidade nas mãos.	M	24	ND
PN09	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotipias (movimentos repetitivos), pobre contato visual, hiperextensibilidade, testículos grandes, ansiedade, diagnosticado com autismo	M	6	28
PN13	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, pobre contato visual, fala perseverante, hiperxtensibilidade, face alongada, mandíbula proeminente, orelhas grandes, ansiedade.	M	10	23

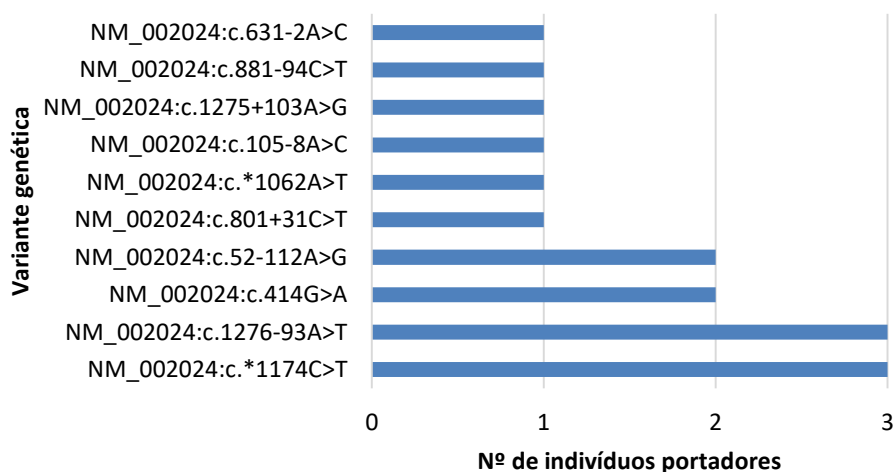
(conclusão)				
ID	Fenótipo	Sexo	Idade	Repetições CGG
PN21	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, estereotípias, pobre contato visual, fala perseverante, diagnóstico de autismo.	M	23	28
PN40	DI ou dificuldades de aprendizado, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotípias, pobre contato visual, fala perseverante, face alongada, mandíbula proeminente, histórico familiar de DI, ansiedade.	M	8	99
PN41	Hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotípias, pobre contato visual, face alongada, testículos grandes, histórico familiar de DI, ansiedade, diagnóstico de autismo.	M	8	47
PN42	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, estereotípias, pobre contato visual, face alongada e/ou orelhas grandes, ansiedade	M	9	ND
PN45	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, atraso para começar a falar e caminhar/engatinhar, estereotípias, fala perseverante, hiperextensibilidade, orelhas grandes, testículos grandes, histórico familiar de DI, histórico familiar de menopausa precoce e ansiedade.	M	17	ND*
PN53	DI ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, atraso para começar a falar e caminhar/engatinhar, estereotípias, pobre contato visual, fala perseverante, ansiedade.	M	18	26

DI, deficiência intelectual; ND, não disponível, os responsáveis não relataram os resultados. ND\*, apesar de não haver dados referentes a repetições CGG no indivíduo PN45, resultados determinados pela técnica PCR indicam que a mãe do indivíduo possui alelos normais (alelo 1: 28 repetições CGG; alelo 2: 26 repetições CGG).

No total foram encontradas 10 variantes do tipo SNVs detectadas nos indivíduos participantes (Tabela 13), das quais NM\_002024:c.1276-93A>T e NM\_002024:c.\*1174C>T estavam presentes em 3 indivíduos cada e NM\_002024:c.414G>A e NM\_002024:c.52-112A>G em 2 indivíduos cada. As demais variantes ocorreram de forma individual nos indivíduos PN09, PN40, PN41, PN42 e PN53 (Figura 13).

**Tabela 13 – Análise do locus do gene *FMR1* de 20 probandos.** ID: identificação do indivíduo participante, onde PN refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos considerados negativos (PN=paciente negativo); Posição genômica: locus da variante (GRCh38); Ref.: nucleotídeo de referência; Alt.: nucleotídeo alterado; Região do gene: corresponde à região do gene *FMR1* que a variante atinge; Zigosidade: descreve a similaridade ou dissimilaridade do DNA entre cromossomos homólogos em uma posição alélica específica; Cód. RefSeq Transcrito: código RefSeq do transcrito de *FMR1*; Impacto da variante: tipo de variante e seu efeito na constituição química do gene; Variante: corresponde à variante genética encontrada; Zigosidade: descrição do genótipo do indivíduo no locus gênico em questão; ID SNP: identificador SNP na versão dbSNP 147; NHLBI-ESP: Frequência alélica alternativa em todos os sujeitos do projeto NHLBI-ESP com 6500 exomas; 1000G: Conjunto de dados de variantes do Projeto 1000 Genomas lançado em agosto de 2015; EXAC: Todos os indivíduos no conjunto de dados EXAC.

ID	Posição genômica	Ref.	Alt.	Região do gene	Zigosidade	Cód. RefSeq Transcrito	Impacto da variante	Variante	ID SNP	Frequência alélica		
										NHLBI-ESP	1000G	EXAC
PN02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN08	147,928,802	G	A	éxon 5	Homozigoto	NM_002024	Sinônimo	c.414G>A	rs25707	0.1116	0.0996026	0.0868
	147,950,018	C	T	3'UTR	Homozigoto	NM_002024	.	c.*1174C>T	rs25704	.	0.495629	0.2834
PN09	147,932,423	A	C	Intron 7	Heterozigoto	NM_002024	.	c.631-2A>C	.	.	.	.
PN11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN13	147,943,038	A	T	Intron 13	Homozigoto	NM_002024	.	c.1276-93A>T	rs25719	.	0.077351	.
PN20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN21	147,943,038	A	T	Intron 13	Heterozigoto	NM_002024	.	c.1276-93A>T	rs25719	.	0.077351	.
PN28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PN40	147,950,018	C	T	3'UTR	Homozigoto	NM_002024	.	c.*1174C>T	rs25704	.	0.495629	0.2834
	147,928,802	G	A	éxon 5	Heterozigoto	NM_002024	Sinônimo	c.414G>A	rs25707	0.1116	0.0996026	0.0868
PN41	147,936,410	C	T	Intron 9	Homozigoto	NM_002024	.	c.881-94C>T	rs29284	.	0.0495364	.
	147,950,018	C	T	3'UTR	Heterozigoto	NM_002024	.	c.*1174C>T	rs25704	.	0.495629	0.2834
PN42	147,921,821	A	G	Intron 1	Heterozigoto	NM_002024	.	c.52-112A>G	rs25726	.	0.10596	.
	147,932,626	C	T	Intron 8	Homozigoto	NM_002024	.	c.801+31C>T	rs150724379	0.0239	0.0249007	0.0301
PN44	147,943,038	A	T	Intron 13	Homozigoto	NM_002024	.	c.1276-93A>T	rs25719	.	0.077351	.
	147,949,906	A	T	3'UTR	Heterozigoto	NM_002024	.	c.*1062A>T	rs11798323	.	0.0217219	0.0568
PN45	147,921,821	A	G	Intron 1	Homozigoto	NM_002024	.	c.52-112A>G	rs25726	.	0.10596	.
PN51	147,925,532	A	C	Intron 2	Homozigoto	NM_002024	.	c.105-8A>C	rs183745963	0.0042	0.00397351	0.0013
PN53	147,940,765	A	G	Intron 13	Homozigoto	NM_002024	.	c.1275+103A>G	rs25701	.	0.0603974	.



**Figura 13 – Frequência das variantes genéticas encontradas no gene *FMR1* de 9 indivíduos não portadores de mutação completa e com características relacionadas a SXF.**

No indivíduo PN08 de 24 anos, com deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotipias, fala perseverante, hiperextensibilidade das articulações, ansiedade e calosidade nas mãos, encontramos duas variantes genéticas. A primeira é uma variante sinônima c.414G>A (rs25707) ocorrendo no éxon 5 do gene *FMR1* (chrX: 147,928,802). Tal variante, não altera a sequência de aminoácidos da proteína FMRP (p.Arg138=) e portanto, não deve ter relação com as características observadas. A segunda variante genética ocorre na região regulatória 3'UTR (chrX: 147,950,018) e foi responsável pela substituição de uma citosina pela base timina (c.\*1174C>T, rs25704).

Estas mesmas variantes (c.414G>A e c.\*1174C>T), também foram observadas no indivíduo PN41, o qual apresentou uma terceira variante genética (c.881-94C>T, rs29284). Esta última, responsável pela substituição de uma citosina pelo nucleotídeo timina, ocorre no íntron 9 do gene *FMR1*. Com 8 anos de idade, PN41 possui diagnóstico de autismo e apresenta 47 repetições CGG (alelo intermediário ou zona cinza) determinado por PCR (exame repetido e confirmado). Além do autismo, as seguintes características são observadas: hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotipias, pobre contato visual, face alongada, testículos grandes, histórico familiar de deficiência intelectual e ansiedade.

Um terceiro indivíduo (PN40) também possui a variante c.\*1174C>T na região 3'UTR. PN40 possui as seguintes características: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotípias, pobre contato visual, fala perseverante, face alongada, mandíbula proeminente, histórico familiar de deficiência intelectual e ansiedade. Análises mostram que este indivíduo possui 99 repetições CGG (pré-mutação, determinado por PCR) e cariótipo masculino normal (46,XY).

Um ponto interessante a respeito dos indivíduos PN41 e PN40, é que dados da literatura indicam que indivíduos que carregam os alelos intermediários apresentam desenvolvimento típico, sem características da síndrome o mesmo ocorre nos indivíduos pré-mutados, com a diferenças de que estes podem desenvolver na vida adulta FXTAS/FOP. Entretanto, reportamos aqui, dois indivíduos jovens (8 anos de idade) não relacionados e que carregam repetições CGG fora do limite considerado normal (5 a 44) apresentando características da síndrome.

No indivíduo PN09, encontramos a substituição do nucleotídeo adenina por citosina (c.631-2A>C) no íntron 7 do gene *FMR1* (chrX:147,932,423). Esse indivíduo do sexo masculino e com 6 anos, possui 28 repetições CGG (determinado por PCR) e foi diagnosticado anteriormente com autismo. Outras características observadas incluem: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotípias, pobre contato visual, hiperextensibilidade, testículos grandes e ansiedade.

Outra variante intrônica foi encontrada em um indivíduo (PN13) com deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, pobre contato visual, fala perseverante, hiperextensibilidade, face alongada, mandíbula proeminente, orelhas grandes e ansiedade. A análise molecular por PCR do gene *FMR1* identificou 23 repetições CGG, além disso, o cariótipo com bandeamento mostra que o cariótipo masculino é normal (46,XY). A variante encontrada neste indivíduo ocorre no íntron 13 do gene *FMR1* (chrX: 147,943,038) e substituiu uma adenina por uma timina (c.1276-93A>T, rs25719). Esta mesma variante foi encontrada em outros dois indivíduos não relacionados: PN21 e PN42. O indivíduo PN21 possui 28 repetições CGG (determinado por PCR) e além do diagnóstico de autismo, apresenta as seguintes

características: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, estereotípias, pobre contato visual e fala perseverante.

No indivíduo PN42 com deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, estereotípias, pobre contato visual, face alongada e/ou orelhas grandes e ansiedade, encontramos quatro variantes. Além da variante c.1276-93A>T no íntron 13, encontramos outras duas variantes intrônicas: c.52-112A>G (rs25726) e c.801+31C>T (rs150724379) nos íntrons 1 e 8 respectivamente. A quarta variante (c.\*1062A>T, rs11798323) foi encontrada na região 3'UTR do gene *FMR1*.

No indivíduo PN45, duas variantes foram encontradas. A primeira ocorreu no íntron 1 (chrX: 147,921,821) e alterou o nucleotídeo adenina por guanina (c.52-112A>G, rs25726) e a segunda variante ocorreu no íntron 2 (chrX: 147,925,532) alterando uma adenina por citosina (c.105-8A>C, rs183745963). As características observadas no PN45 são: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, atraso para começar a falar e caminhar/engatinhar, estereotípias, fala perseverante, hiperextensibilidade, orelhas grandes, testículos grandes, histórico familiar de deficiência, histórico familiar de menopausa precoce e ansiedade. Apesar de não haver dados referentes a repetições CGG no PN45, resultados determinados pela técnica PCR indicam que a mãe do indivíduo possui alelos normais (alelo 1: 28 repetições CGG; alelo 2: 26 repetições CGG), o que permite concluir que PN45 também carrega o alelo normal.

Por último, no indivíduo PN53 encontramos a variante c.1275+103A>G (rs25701). PN53 possui 26 repetições CGG (determinado por PCR) e apresenta as seguintes características: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, atraso para começar a falar e caminhar/engatinhar, estereotípias, pobre contato visual, fala perseverante e ansiedade.

Em relação a região do gene onde a variante ocorre, um caso (10%) ocorreu em região codificante do gene e nove (90%) em regiões não codificantes.

Dentre os casos avaliados, nove variantes (90,9%) já foram reportadas na base de dados dbSNP (SHERRY *et al.*, 2001). Dados obtidos das bases NHLBI-ESP (NHLBI GO Exome Sequencing Project, 2018), 1000 Genomas (GIBBS *et al.*, 2015) e ExAC (LEK *et al.*, 2016) mostram que cinco (50%) destas variantes são consideradas comuns (alta

frequência populacional) em bancos de dados populacionais de indivíduos neurotípicos: c.414G>A, c.\*1174C>T, c.1276-93A>T, c.52-112A>G e c.1275+103A>G. Nota-se que 4 variantes (40%), c.881-94C>T, c.801+31C>T, c.\*1062A>T e c.105-8A>C possuem baixa frequência populacional (presentes em pelo menos 5% da população) (Tabela 13). Já a variante c.631-2A>C não é reportada nos dados populacionais analisados, sendo, portanto, descrita pela primeira vez por este trabalho.

### 5.3.2. Predição *in silico* do efeito das variantes na proteína FMRP

Para verificar se as variantes genéticas identificadas apresentam efeito deletério na função da proteína FMRP, foram conduzidas análises *in silico* das 10 variantes encontradas no gene *FMR1* dos participantes da pesquisa. Para isso, foram utilizadas ferramentas de predição que permitiram identificar se as variantes genéticas possuem efeitos deletérios ou neutros na função da proteína FMRP (Tabela 14).

Entre as bases consultadas, *PolyPhen2* foi a única que não relatou nenhuma das 10 variantes e por isso não está listado na Tabela 14. Já a base ClinVar anota as variantes c.801+31C>T (rs150724379) e c.414G>A (rs25707) como benignas (sem doença associada), sendo a segunda (c.414G>A) sem efeito na proteína FMRP conforme predição *in silico* da ferramenta SIFT. Além disso, ambas as variantes possuem possível efeito neutro na proteína FMRP segundo a ferramenta PredictSNP2. Dada estas evidências, estas variantes não serão objeto de maior aprofundamento.

Quando analisamos as variantes por meio da ferramenta PredictSNP2, identificamos que outras 4 variantes também apresentaram-se como neutras, sem alterar a função da proteína: c.\*1174C>T, c.881-94C>T, c.52-112A>G, e c.1275+103A>G. As 4 variantes restantes foram anotadas como deletérias: c.631-2A>C, c.1276-93A>T c.\*1062A>T e c.105-8A>C.

Já a ferramenta *Mutation Taster* indica que apenas a substituição c.631-2A>C, encontrada no indivíduo PN09, possui efeito deletério na proteína FMRP.

Entre as variantes reportadas, algumas não possuem informações reportadas em algumas das bases de dados utilizadas, como o ClinVar. Também não há dados na literatura a respeito das mesmas, o que acaba limitando um aprofundamento sobre estas apenas por ferramentas *in silico*. Além disso, elas foram reportadas com possível efeito neutro na proteína FMRP. Por este motivo, não realizamos uma exploração mais

profunda nas variantes: c.\*1174C>T (rs25704), c. 881-94C>T (rs29284), c.52-112A>G (rs25726) e c. 1275+103A>G (rs25701).

Com base nas informações expostas e por meio da aplicação de diferentes técnicas de bioinformática, porém todas validadas por experimentos de laboratório, identificamos quatro variantes genéticas com possível efeito deletério na proteína FMRP: c.631-2A>C, c.1276-93A>T, c.\*1062A>T e c.105-8A>C. A partir disso, foi realizada uma investigação mais aprofundada destas variantes.



**Tabela 14 – Anotação das variantes genéticas em ferramentas de previsão do possível impacto de substituição de aminoácidos na proteína.** ID: identificação do indivíduo participante; Variante: corresponde à variante genética encontrada; ID SNP: Identificador SNP na versão dbSNP 147; Região do gene: corresponde à região do gene *FMR1* que a variante atinge; ClinVar: significado clínico da variante de acordo com o banco de dados ClinVar; SIFT score: prevê se uma substituição de aminoácidos afeta ou não a função da proteína, o score SIFT varia de 0 (deletério) a 1 (tolerado); SIFT predição: associado ao SIFT score, prevê se os efeitos da variante são deletérios ou tolerados pela proteína; PredictSNP2 score: o valor de score reportado pertence ao intervalo -1 a +1, variantes dentro do intervalo -1 a 0 são consideradas neutras e variantes no intervalo 0 a +1 são consideradas deletérias; PredictSNP2 predição: associado ao score, prevê se os efeitos da variante são deletérios ou tolerados pela proteína; *Mutation Taster score*: probabilidade da predição, onde 1 = alta probabilidade; *Mutation Taster* predição: associado ao score, prevê se os efeitos da variante são deletérios ou tolerados pela proteína.

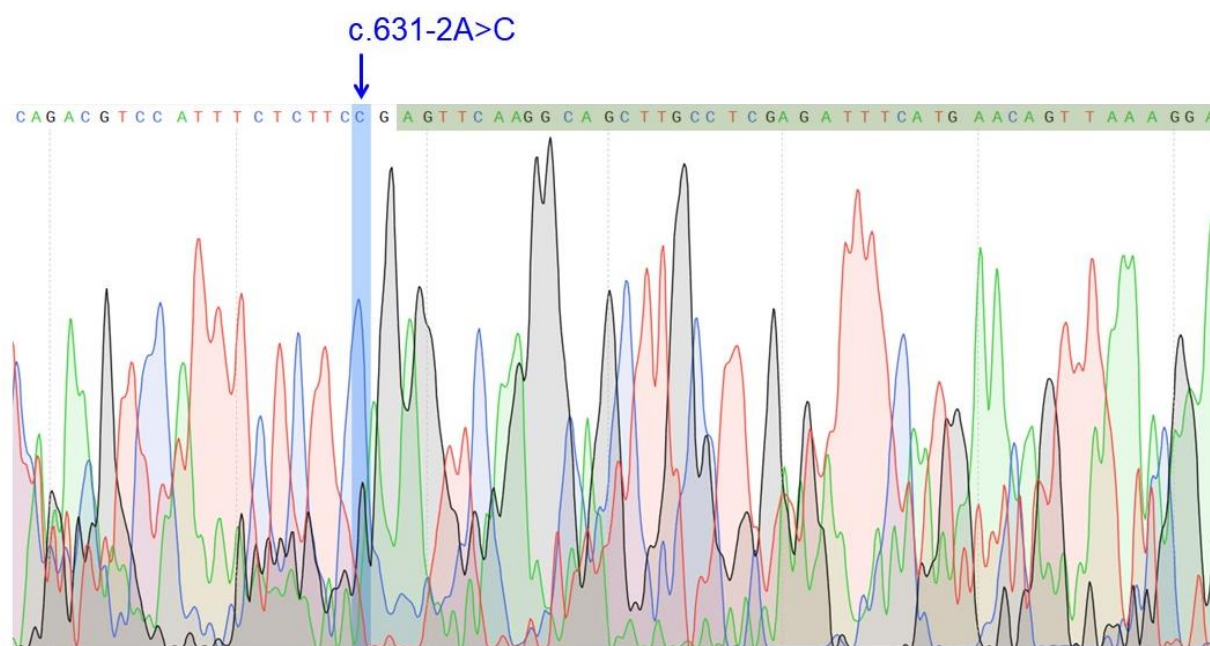
ID	Variante	ID SNP	Região do gene	ClinVar	SIFT		PredictSNP2		MutationTaster	
					score	predição	score	predição	score	predição
PN08	c.414G>A	rs25707	Éxon 5	Benigna	1	Tolerado	-1	Neutra	..	..
	c.*1174C>T	rs25704	3'UTR	.	..	.	-1	Neutra	..	..
PN09	c.631-2A>C	.	Intron 7	.	..	.	1	Deletéria	1	Deletéria
PN13	c.1276-93A>T	rs25719	Intron 13	.	..	.	1	Deletéria	..	..
PN21	c.1276-93A>T	rs25719	Intron 13	.	..	.	1	Deletéria	..	..
PN40	c.*1174C>T	rs25704	3'UTR	.	..	.	-1	Neutra	..	..
PN41	c.414G>A	rs25707	Éxon 5	Benigna	1	Tolerado	-1	Neutra	..	..
	c.881-94C>T	rs29284	Intron 9	.	..	.	-1	Neutra	..	..
PN42	c.*1174C>T	rs25704	3'UTR	.	..	.	-1	Neutra	..	..
	c.52-112A>G	rs25726	Intron 1	.	..	.	-1	Neutra	..	..
	c.801+31C>T	rs150724379	Intron 8	Benigna	..	..	-1	Neutra	..	..
PN45	c.1276-93A>T	rs25719	Intron 13	.	..	.	1	Deletéria	..	..
	c.*1062A>T	rs11798323	3'UTR	.	..	.	1	Deletéria	..	..
PN45	c.52-112A>G	rs25726	Intron 1	.	..	.	-1	Neutra	..	..
	c.105-8A>C	rs183745963	Intron 2	.	..	.	0.33	Deletéria	..	..
PN53	c.1275+103A>G	rs25701	Intron 13	.	..	.	-1	Neutra	..	..

### Variante genética c.631-2A>C:

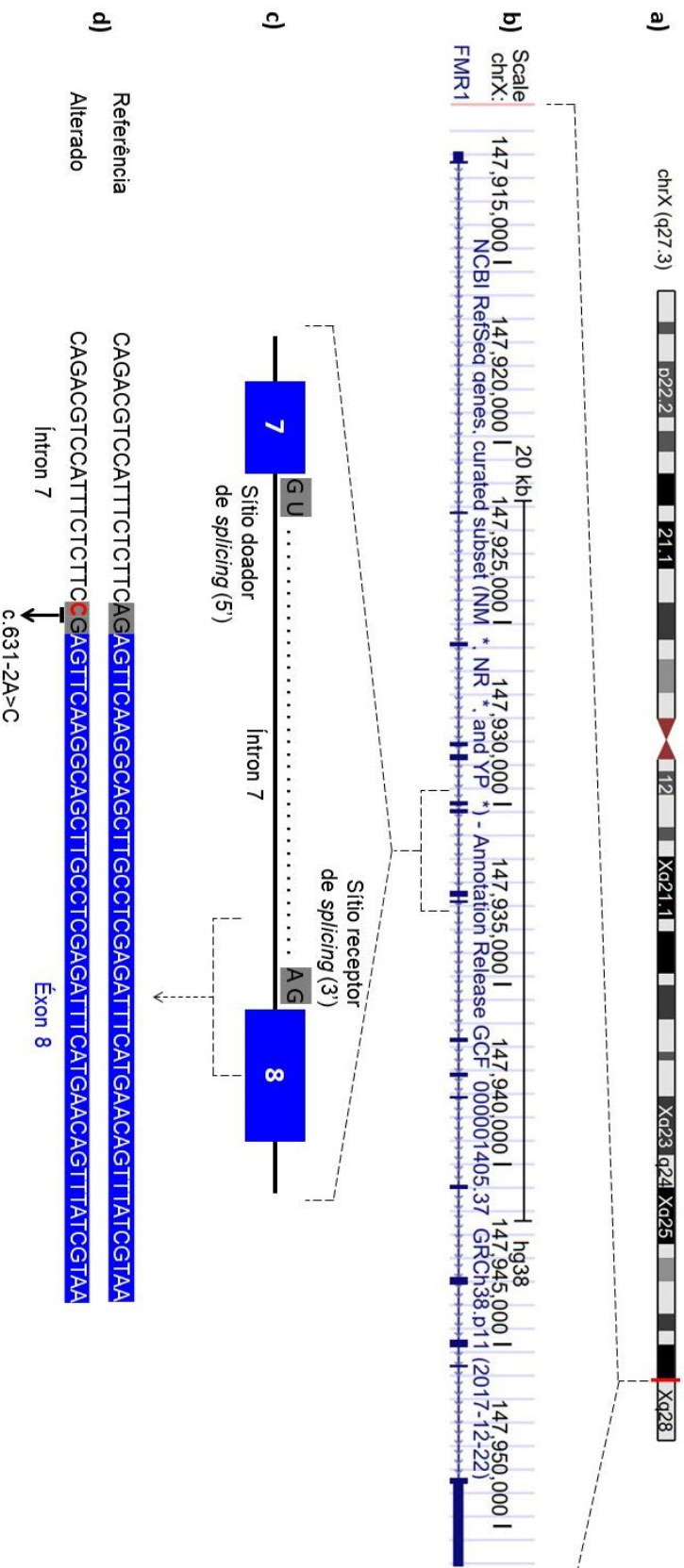
Identificamos a variante intrônica NM\_224:c.631-2A>C (chrX:147,932,423) (Figura 14) em um indivíduo (PN09) do sexo masculino que apresentou as seguintes características fenotípicas: dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, defensivo tatilmente, estereotipias (movimentos repetitivos), pobre contato visual, hiperextensibilidade das articulações, testículos grandes, ansiedade e diagnosticado com autismo.

Esta variante não está anotada em bancos de dados de frequência populacional (não ocorre na população neurotípica) e é prevista com efeito deletério na proteína FMRP pelas ferramentas PredictSNP2 e *Mutation Taster*.

A substituição intrônica ocorre no sítio receptor de *splicing*, alterando sua integridade. O nucleotídeo alterado está localizado na posição -2 do íntron 7 do gene *FMR1* (Figura 15).



**Figura 14 – Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do éxon 8 do gene *FMR1*.** A sequência de DNA da junção do íntron 7 com o éxon 8 do indivíduo PN09, com uma substituição de adenina por citosina (c.631-2A>C). Os nucleotídeos destacados com retângulo verde representam a região do éxon 8 e os sem destaque, o íntron 7. O score de qualidade (Phred score) para o nucleotídeo alterado (C) possui o valor 10, indicando uma probabilidade de 90% deste nucleotídeo ter sido corretamente atribuído.



**Figura 15 – Localização da variante c.631-2A>C responsável por uma substituição intrônica que afeta o sítio receptor de *splicing*.** (a) Cromossomo X humano com o locus do gene *FMR1* (Xq27.3) (linha vermelha) (b) Gene *FMR1* com todos os éxons; (c) Região em evidência ilustrando o éxon 7 (retângulo azul), Intron 7 (com os sítios doador (GU) e receptor de *splicing* (AG)) e éxon 8 (retângulo azul); (d) Sequência de referência e sequência alterada. No Intron 7 (chrX:147,932,423) ocorreu a substituição de uma adenina por uma citosina (c.632-2A>C) no sítio receptor de *splicing* (destacado em cinza).

Esta alteração interfere diretamente no processamento do gene *FMR1*, uma vez que já é bem estabelecido que os mRNAs passam por um processo de maturação no qual, uma maquinaria conhecida como *spliceossomo*, faz a remoção dos íntrons (BERGET, MOORE e SHARP, 1977; MATERA e WANG, 2014) em um evento conhecido como *splicing* (ROCA; SACHIDANANDAM; KRAINER, 2005). Para que o processo de *splicing* ocorra, é necessária a identificação de regiões fundamentais presentes nos limites das junções *íntron/éxon* (BLACK, 2003; CALAIS, 2014). Estas regiões são: o sítio doador de *splicing* (5'), o *branch site* seguido de uma região rica em pirimidinas e o sítio receptor de *splicing* (3'). Tais sítios são denominados sítios de *splicing* canônicos.

Outros trabalhos já identificaram variantes de *splicing* ocorrendo no gene *FMR1*. Quartier e colaboradores (2017) reportaram duas outras variantes que alteraram o sítio de *splicing* e que levaram a produção de proteínas FMRP truncadas em dois meninos com deficiência intelectual e algumas características típicas da SXF (Apêndice D). A primeira é a variante c.420-8A>G, de herança materna, a qual foi predita para diminuir o funcionamento normal do sítio receptor de *splicing* (3'). Após análise do mRNA no sangue do paciente, foi demonstrado que esta variante causou um evento de *splicing* aberrante, causando retenção de 7 nucleotídeos do íntron 5 do gene *FMR1*. Tal retenção ocasionou um *frameshift* que levou ao surgimento de um *stop* códon prematuro 3 nucleotídeos após o aminoácido 140 da proteína (p.Met140Ilefs\*3). A segunda variante identificada, c.990+1G>A (*de novo*), afetou o sítio doador de *splicing* (5') do éxon 10 e ocasionou a remoção completa deste éxon no transcrito do gene *FMR1*. A perda deste éxon, assim como na primeira mutação, também causou um *frameshift* na tradução do gene com a formação de um *stop* códon prematuro (p.Lys295Asnfs\*11) na posição 295 da proteína. Em ambas as variantes, a proteína descrita não apresentou domínios essenciais da proteína FMRP, como o sinal de exportação nuclear e o domínio RGG responsável pela interação de FMRP com seus mRNA alvos.

Dentro deste contexto, relatamos aqui uma nova variante (c.631-2A>C) ocorrendo no sítio receptor de *splicing* (3') do íntron 7 do gene *FRM1*, que pode estar afetando o mecanismo de *splicing*. Estudos mostram que esta mesma região onde a variante ocorreu faz parte do sítio receptor de *splicing* (3') de gene *FMR1*, o qual inclui uma região rica em pirimidinas e o dinucleotídeo AG. Esta região é necessária para que ocorra uma

eficiente clivagem no local de junção da região 5' para posterior formação da estrutura em forma de alça (conhecido também como lariat, contendo a sequência intrônica que será removida no final da etapa do processamento do RNA primário pelo complexo spliceosomo) (RUSKIN; GREEN, 1985; SORIA *et al.*, 1993).

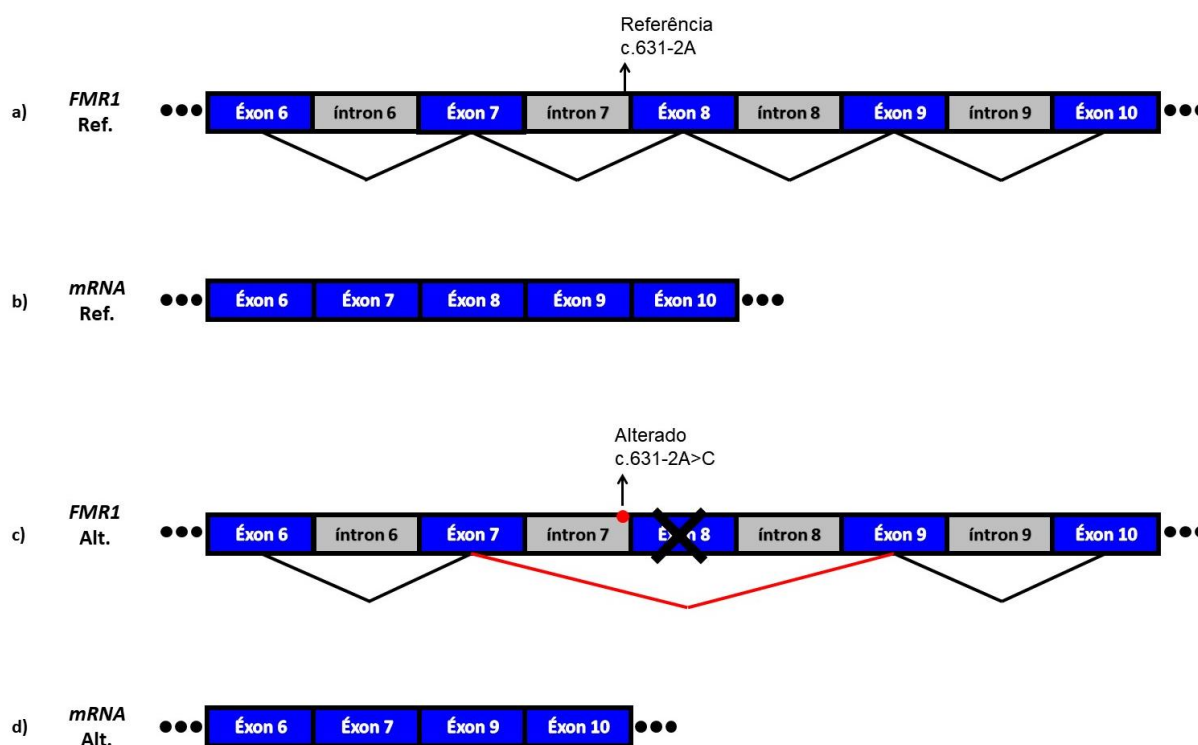
Devido às características desta nova variante identificada no paciente PN09, pode-se hipotetizar que a substituição no nucleotídeo adenina por uma citosina esteja afetando negativamente a atividade de *splicing* do sítio receptor de *splicing* (3'). Para testar esta possibilidade, foram realizados testes *in silico* com ferramentas que avaliam a probabilidade desta substituição alterar o *splicing*.

A análise *in silico* da variante na ferramenta NnsplICE (REESE *et al.*, 1997) demonstra que na sequência de referência, a probabilidade de o sítio em questão ser reconhecido é de 96%. Para o alelo alterado (c.631-2A>C), não há possibilidade do *splicing* ocorrer, sugerindo que o sítio receptor de *splicing* não está sendo reconhecido, ou seja, o conjunto de nucleotídeos 1-41 mostrados (Figura 16c) correspondente a sequência de referência, passa a ser considerado um íntron, sendo portanto removido por completo após o evento de *splicing*.

Complementarmente, para avaliar a ocorrência de falhas no *splicing* causado pela mutação c.631-2A>C, também utilizamos a ferramenta de predição *in silico* *Human Splicing Finder* (DESMET *et al.*, 2009). Segundo esta ferramenta, o valor de consenso 91,84 para a sequência de referência, indica que trata-se de um sítio receptor de *splicing* (todo valor consenso a cima de 65 é considerado um sítio de *splicing* - doador ou receptor). Já na sequência alterada, o valor consenso é de 62,9 (menor que o limite 65) indicando que o sítio de *splicing* não é mais reconhecido (Figura 16d). Além disso, os resultados do limiar de variação foram menores que -10%, sugerindo que a variante resulta em um sítio receptor de *splicing* truncado.



de leitura do transcrito fazendo com que o *spliceossomo* passe a não reconhecer o sítio receptor de *splicing* (AG) do íntron 7 em sua posição correta. Com isso, o efeito do evento *splicing* aberrante pode ser a remoção completa do éxon 8 no transcrito (Figura 17).



**Figura 17 – Esquema demonstrando o gene *FMR1* com o evento de *splicing* ocorrendo normalmente e alterado. (a)** Parte dos éxons e íntrons do gene *FMR1* de referência mostrando como ocorre o *splicing* normal nesta região do gene; **(b)** Transcrito resultante do evento de *splicing* correto; **(c)** Parte dos éxons e íntrons do gene *FMR1* carregando a variante c.631-2A>C, mostrando possível defeito no *splicing*; **(d)** O resultado pode ser a expressão de um mRNA não natural, no qual uma das hipóteses é a remoção do éxon 8, devido ao não reconhecimento do sítio receptor de *splicing* (3').

O éxon 8 codifica para o domínio de homologia à heteronucleoproteína K do tipo 1 (KH1) (FERNÁNDEZ; RAJAN; BAGNI, 2013; GOLDEN et al., 2019), que confere interações específicas a RNA.

Em nossa RSL, foi identificado três variantes não sinônimas no éxon 8 do gene *FMR1*: NM\_002024:c.797G>A (MYRICK et al., 2014), NM\_001185082:c.677G>A e NM\_001182082:c.767A>G (GROZEVA et al., 2015). Apesar de tais variantes não levarem à remoção completa do éxon 8, elas foram encontradas em indivíduos com características semelhantes às observados no indivíduo PN09 que carrega a variante genética c.631-2A>C. A primeira variante genética (c.797G>A) foi identificada em um indivíduo com atraso no desenvolvimento juntamente com outras características

associadas a SXF e as outras duas (c.677G>A e c.767A>G) foram identificadas em indivíduos com deficiência intelectual moderada a grave.

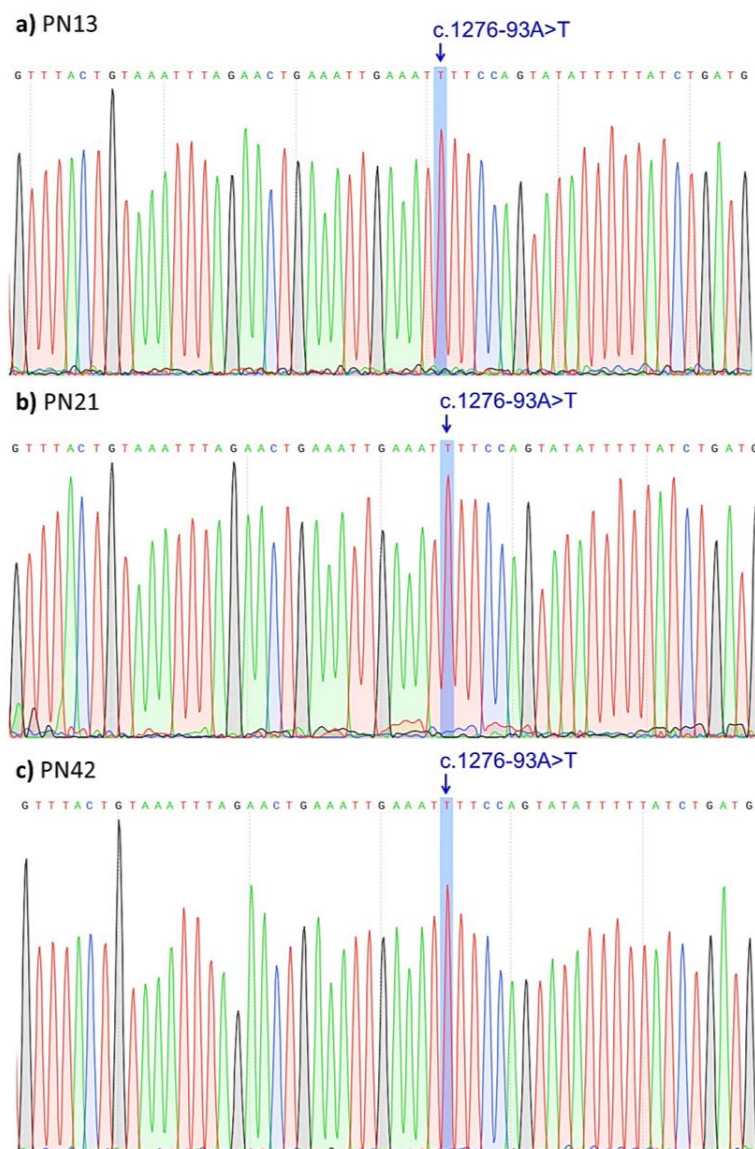
Estudos recente mostram que deleção do éxon 8 em ratos leva a déficits de atenção e a alterações nos perfis transcricionais no córtex pré-frontal , indicando que uma deleção específica do éxon 8 em *Fmr1* é suficiente para causar fenótipos da SXF em ratos (GOLDEN et al., 2019). Desta forma a deleção do éxon 8 no gene *FMR1* do indivíduo PN09 pode ter realação com os fenótipos apresentados por este.

#### **Variante genética c.1276-93A>T:**

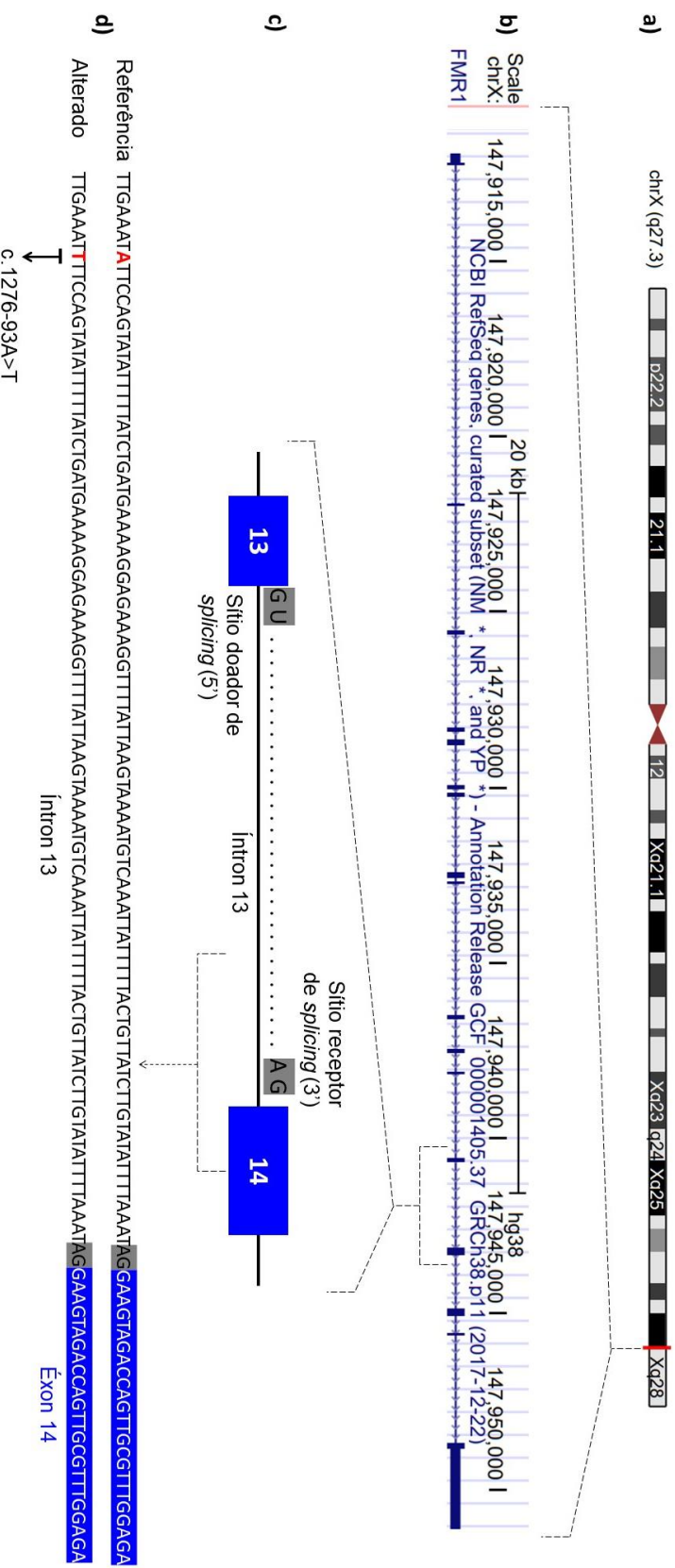
A variante intrônica NM\_002024:c.1276-93A>T (chrX:147,943,038) (Figura 18) foi identificada em três indivíduos do sexo masculino não relacionados: PN13, PN21 e PN42. Todos apresentaram em comum as seguintes características: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção e pobre contato.

A substituição está localizada na posição -93 do íntron 13 do gene *FMR1* (Figura 19). Esta variante está anotada na base dbSNP (rs25719) e na base de dados de frequência populacional 1000 Genomas como uma variante comum (presente em 7% da população neurotípica). Além disso ela é prevista para efeito deletério na proteína FMRP pela ferramenta PredictSNP2. Entretanto, não há dados na literatura sobre esta variante e ela também não é reportada em bases como ClinVar e ExAC, o que acaba limitando uma exploração mais profunda sobre a mesma. Além disso, análises *in silico* nas ferramentas NnsplICE e *Human splicing finder* não apontam alterações no mecanismo de *splicing*, sugerindo que a variante intrônicas c.1276-93A>T provavelmente não tem impacto no *splicing*.





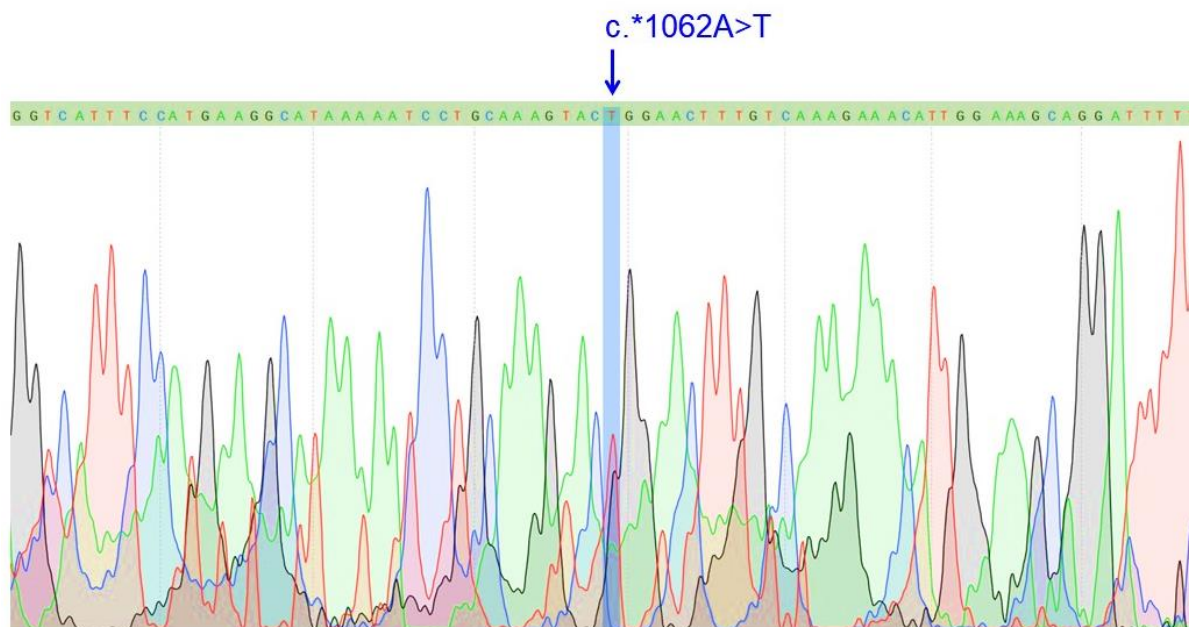
**Figura 18 – Eletroferograma de três participantes correspondente ao sequenciamento do íntron 13 do gene *FMR1*.** A sequência de DNA do íntron 13 dos indivíduos (a) PN13, (b) PN21 e (c) PN42, com uma substituição de adenina por timina (c.1276-93A>T). O score de qualidade (Phred score) para o nucleotídeo alterado (T) possui o valor 62 para PN13 e 61 para PN21 e PN42, indicando uma probabilidade de >99,9999% deste nucleotídeo ter sido corretamente atribuído nas três sequencias.



**Figura 19 – Localização da variante c.1276-93A>T responsável por uma substituição no intron 13 do gene *FMR1*.** (a) Cromossomo X humano com o locus do gene *FMR1* (Xq27.3) (linha vermelha) (b) Gene *FMR1* com todos os éxons: (c) Região em evidência ilustrando o éxon 13 (retângulo azul), intron 13 (com os sítios doador (GU) e receptor de splicing (AG)) e éxon 14 (retângulo azul); (d) Sequência de referência e sequência alterada. No intron 13 (chrX:147,943,38) ocorreu a substituição de uma adenina por uma timina (c.1276-93A>T).

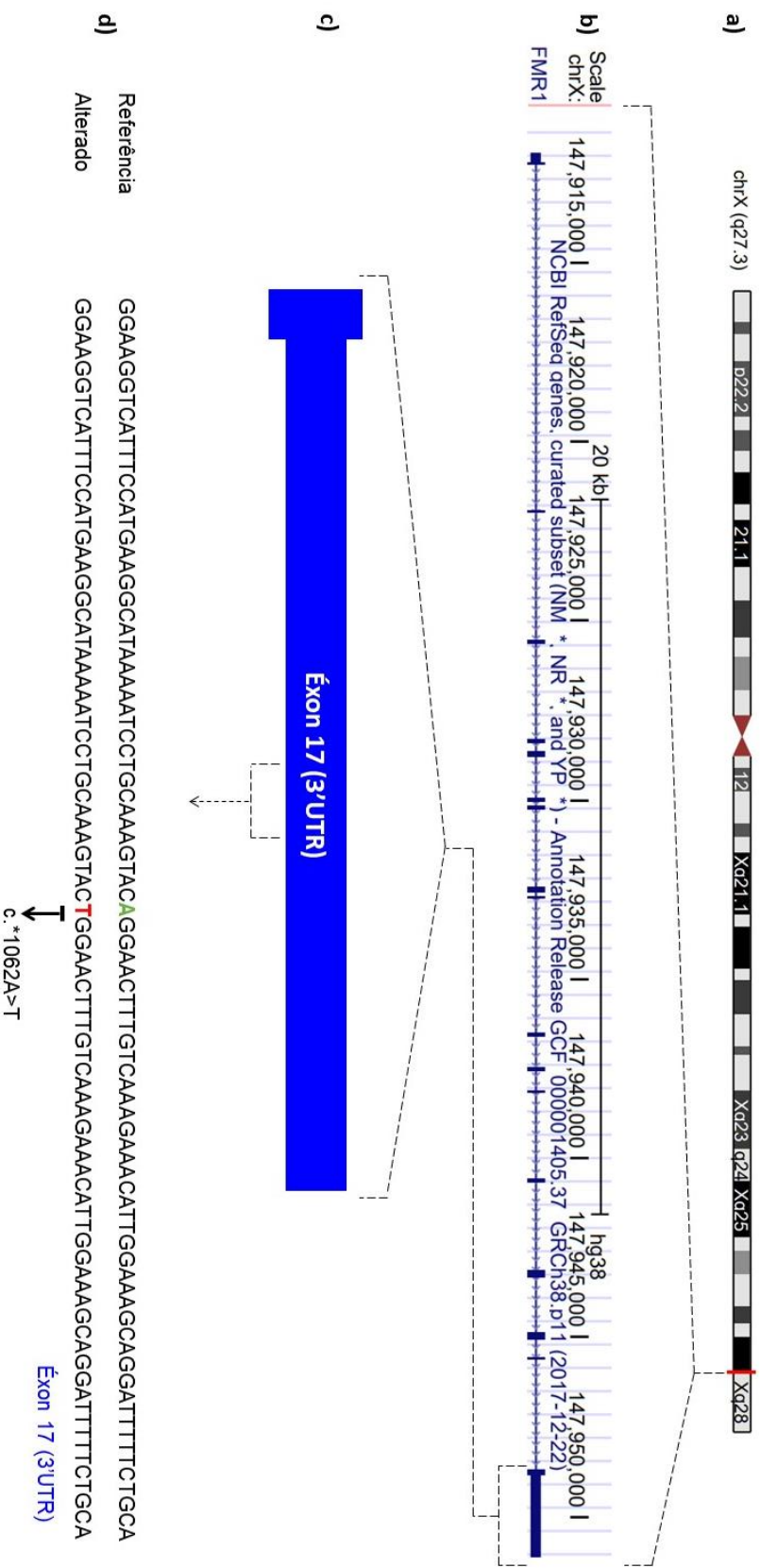
### Variante genética c.\*1062A>T

A variante NM\_002024:c.\*1062A>T (chrX:147,949,906) (Figura 20) foi identificada no indivíduo PN42, no qual também foram identificadas as variantes c.52-112A>G, c.801+31C>T e c.1276-93A>T, discutidas anteriormente.



**Figura 20 - Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do éxon 17 (3'UTR) do gene *FMR1*.** A sequência de DNA da região 3'UTR do indivíduo PN42, com uma substituição de adenina por timina (c.\*1062A>T). O score de qualidade (Phred score) para o nucleotídeo alterado (T) possui o valor 11, indicando uma probabilidade de 90% deste nucleotídeo ter sido corretamente atribuído.

A substituição está localizada na região regulatória 3'UTR do gene *FMR1* (Figura 21), está anotada na base dbSNP (rs11798323) e no banco de dados de frequência populacional 1000 Genomas e ExAc como uma variante rara (presente em 2% e 5% da população neurotípica respectivamente). Além disso ela é prevista para efeito deletério na proteína FMRP pela ferramenta PredictSNP2. Ainda não há dados na literatura suficientes para uma exploração mais profunda sobre a mesma a partir de análises *in silico*.



**Figura 21 - Localização da variante c.\*1062A>T responsável por uma substituição na região regulatória 3'UTR do gene *FMR1*.** (a) Cromossomo X humano com o locus do gene *FMR1* (Xq27.3) (linha vermelha) (b) Gene *FMR1* com todos os éxons; (c) Região em evidência ilustrando o éxon 17; (d) Sequência de referência e sequência alterada. No éxon 17 (chrX:147,949,906) ocorreu a substituição de uma adenina por uma timina (C.\*1062A>T).

Na RSL realizada, encontramos seis variantes que ocorrem na região 3'UTR do gene: c.\*23T>C, c.\*60G>C, c.\*746T>C, c.\*68T>C, c.\*1867G>A e c.\*2035C>T (COLLINS *et al.*, 2010; SUHL *et al.*, 2015; HANDT *et al.*, 2014). Todas as variantes foram encontradas em indivíduos com atraso no desenvolvimento e/ou deficiência intelectual, entre as quais, a variante c.\*746T>C (SUHL *et al.*, 2015) mostrou resultados interessantes. A partir de análises em uma linhagem celular derivada do paciente que carrega a alteração, Suhl e colaboradores (2015) observaram níveis reduzidos de proteína FMRP. O indivíduo do sexo masculino apresentava as seguintes características: deficiência intelectual leve (QI=67), atraso no desenvolvimento e previamente diagnosticado com TEA e transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).

Variantes na região regulatória 3'UTR podem alterar a estabilização, localização e tradução de mRNAs (PAL; CHATTERJEE; RAO, 2016). Para determinar o papel da variante c.\*1062A>T, foram realizadas análises em banco de dados de variantes genéticas que ocorrem em sítios alvos de miRNA.

A base de dados PolymiRTS (BHATTACHARYA; ZIEBARTH; CUI, 2014) indica que a presença do alelo timina na posição 1062 da região 3'UTR do gene *FMR1*, pode levar à criação de novos sítios de ligação para os miRNA hsa-miR-4712-5p, hsa-miR-624-5p e hsa-miR-770-5p (Tabela 15).

**Tabela 15 – Impacto da variante genética c.\*1062A>T (rs11798323) na interação miRNA-mRNA segundo a base de dados PolymiRTS.** ID SNP: identificador SNP na versão dbSNP 147; Alelo referência: nucleotídeo de referência; Alelo alterado: nucleotídeo alterado; ID miRNA: nome do miRNA; Sítio miRNA: sequência do sítio do miRNA, as bases complementares à região do sítio estão em letras maiúsculas e a posição da variante genética em vermelho; Efeito: impacto do alelo alterado (T) no sítio de miRNA; Suporte experimental: determina se a interação miRNA-mRNA é suportada por experimentos.

ID SNP	Alelo Referência	Alelo Alterado	ID miRNA	Sítio miRNA	Efeito	Suporte Experimental
rs11798323	A	T	hsa-miR-4712-5p	aaGTACTGGtact	Cria novo sítio	N
			hsa-miR-624-5p	aagtaCTGGTACT	Cria novo sítio	N
			hsa-miR-770-5p	aaGTACTGGtact	Cria novo sítio	N

Resultado semelhante foi apresentado pela base de dados MirSNP (LIU *et al.*, 2012), que também mostra a criação de novos sítios para os miRNAs hsa-miR-4712-5p, hsa-miR-624-5p e hsa-miR-770-5p (Tabela 16). Outros resultados (Tabela 16) incluem a

quebra do sítio do miRNA hsa-miR-486-5p (fazendo com que a ligação miRNA-mRNA não ocorra como esperado), a diminuição da ligação dos miRNAs hsa-miR-548av-5p e hsa-miR-548k com o mRNA e uma melhora ligação entre o miRNA hsa-miR-3973 com o mRNA.

**Tabela 16 - Impacto da variante genética c.\*1062A>T (rs11798323) na interação miRNA-mRNA segundo a base de dados MirSNP.** ID SNP: identificador SNP na versão dbSNP 147; ID miRNA: nome do miRNA; Efeito: impacto do alelo de referência (A) e alterado (T) no sítio de miRNA; Alelo: nucleotídeo de referência (A) e nucleotídeo alterado (T); *Score*: Quanto maior a pontuação, mais estável é a ligação de miRNA-mRNA; Sítio miRNA: sequência do sítio do miRNA, a posição da variante genética está em vermelho.

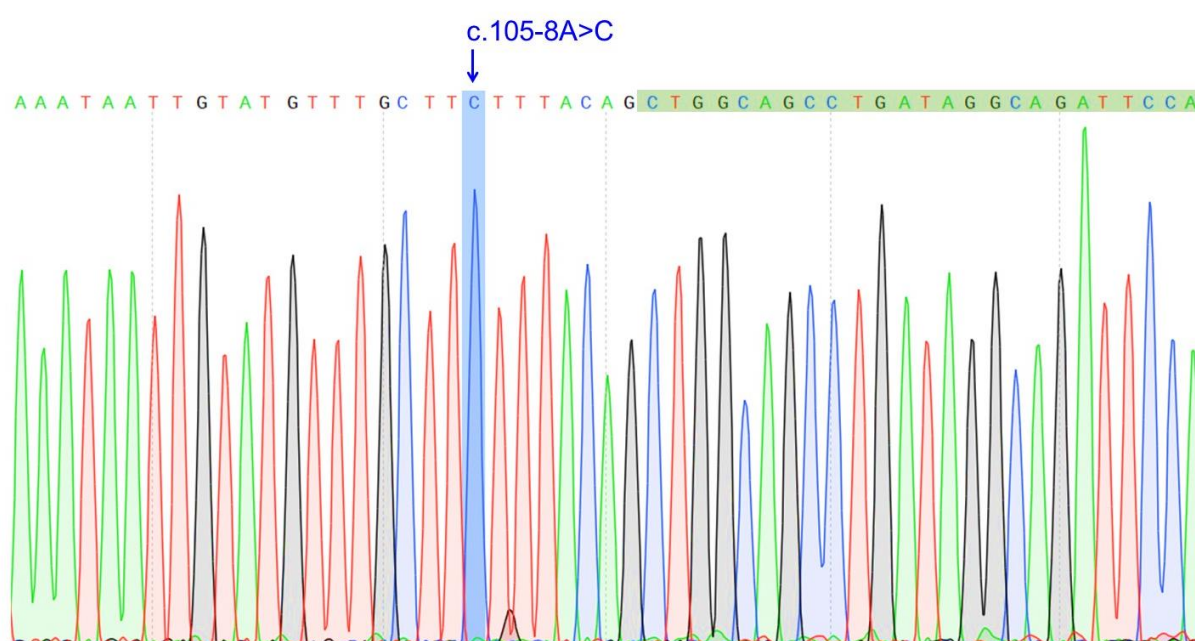
ID SNP	ID miRNA	Efeito	Alelo	Score	Sítio miRNA
rs11798323	hsa-miR-3973	Melhora a ligação	A	148.00	atcctGCAAAGTACAGGTACTTTGt
			T	156.00	atcctGCAAAGTACTGGTACTTTGt
rs11798323	hsa-miR-4712-5p	Cria novo sítio	A	.	.
			T	140.00	aataatcctgcaaaGTACTGGt
rs11798323	hsa-miR-486-5p	Quebra sítio	A	151.00	aataatcCTGCAAAGTACAGGt
			T	.	.
rs11798323	hsa-miR-548av-5p	Diminui a ligação	A	151.00	caaagtaCAGGTACTTTg
			T	143.00	caaagtaCTGGTACTTTg
rs11798323	hsa-miR-548k	Diminui a ligação	A	161.00	tgCAAAGT--ACAGGTACTTTg
			T	153.00	tgCAAAGT--ACTGGTACTTTg
rs11798323	hsa-miR-624-5p	Cria novo sítio	A	.	.
			T	174.00	atccTGCAAAGTACTGGTACTt
rs11798323	hsa-miR-770-5p	Cria novo sítio	A	.	.
			T	143.00	taaTCCTG-CA--AAGTACTGGt

Os dados mostrados indicam que a variante c.\*1062A>T pode estar afetando a interação miRNA-mRNA e, portando, alterando o controle do processo de tradução mediada por tais miRNAs. Desta forma, é importante que a variante c.\*1062A>T seja analisada em trabalhos futuros por meio de estudos *in vitro* para investigar uma possível desregulação de FMRP na sua presença.

#### **Variante genética c.105-8A>C:**

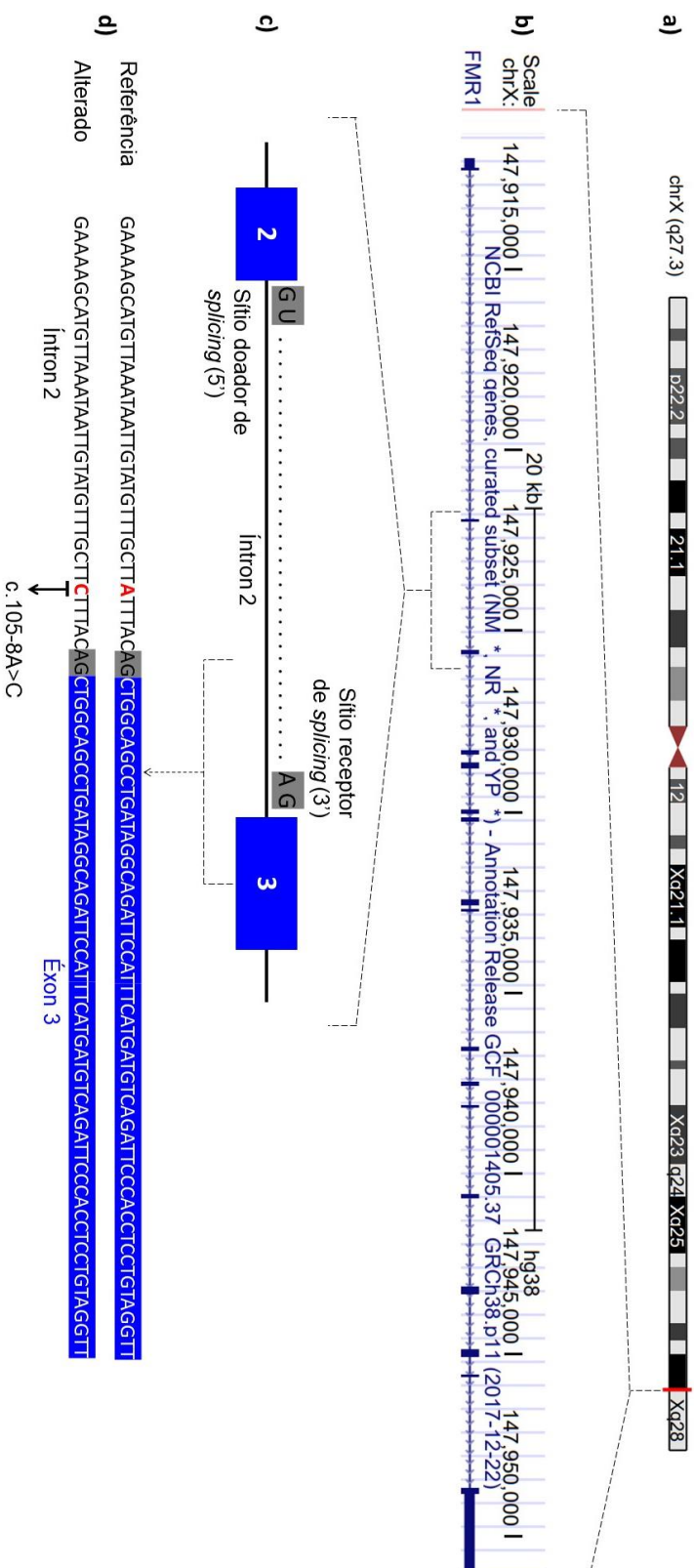
A variante NM\_002024:c.105-8A>C (chrX:147,925,532) (Figura 22) foi observada no indivíduo PN45, que apresenta as seguintes características: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, atraso para começar a falar e caminhar/engatinhar, estereotípias, fala perseverante, hiperextensibilidade, orelhas grandes, testículos grandes, histórico familiar de deficiência intelectual, histórico familiar de menopausa precoce e ansiedade.

Esta variante está anotada na base dbSNP (rs183745963) e nos bancos de dados de frequência populacional NHLBI-ESP (0,4%) 1000 Genomas (0,03%) e ExAC (0,01%) como uma variante rara na população neurotípica. Ela apresenta possível efeito deletério na proteína FMRP segundo ferramenta PredictSNP2. Apesar de não ser reportada pela base ClinVar, esta variante já foi reportada por Collins e colaboradores (2010) em um indivíduo com atraso no desenvolvimento. Anotações da base ExAC, indicam que esta variante ocorre em uma região de *splicing*, já que esta ocorre dentro da região do local da emenda entre intron/éxon (dentro de 1 a 3 bases do exon ou 3 a 8 bases do intron).



**Figura 22 – Eletroferograma correspondente ao sequenciamento do éxon 3 do gene *FMR1*.** A sequência de DNA da junção do íntron 2 com o éxon 3 do indivíduo PN45, com uma substituição de adenina por citosina (c.105-8A>C). Os nucleotídeos destacados com retângulo verde, representam a região do éxon 3 e os sem destaque, o íntron 2. O score de qualidade (Phred score) para o nucleotídeo alterado (C) possui o valor 61, indicando uma probabilidade de >99,9999% deste nucleotídeo ter sido corretamente atribuído.

A substituição está localizada na posição -8 do íntron 2 do gene *FMR1* e é responsável pela substituição de uma adenina por uma citosina (Figura 23). Como esta variante está localizada dentro da região de emenda entre íntron 2 e éxon 3, realizamos análises *in silico* nas ferramentas *Splice Site Prediction by Neural Network* (Nnsplince) e *Human Splicing Finder*, para determinar seu papel no mecanismo de *splicing* (Figura 24).



**Figura 23 - Localização da variante c.15-8A>C responsável por uma substituição no íntron 2 do gene *FMR1*.** (a) Cromossomo X humano com o locus do gene *FMR1* (Xq27.3) (linha vermelha) (b) Gene *FMR1* com todos os éxons; (c) Região em evidência ilustrando o éxon 1 (retângulo azul), íntron 2 (com os sítios doador (GU) e receptor de splicing (AG)) e éxon 3 (retângulo azul); (d) Sequência de referência e sequência alterada. No íntron 2 (chrX:147,925,532) ocorreu a substituição de uma adenina por uma citosina (c.15-8A>C).

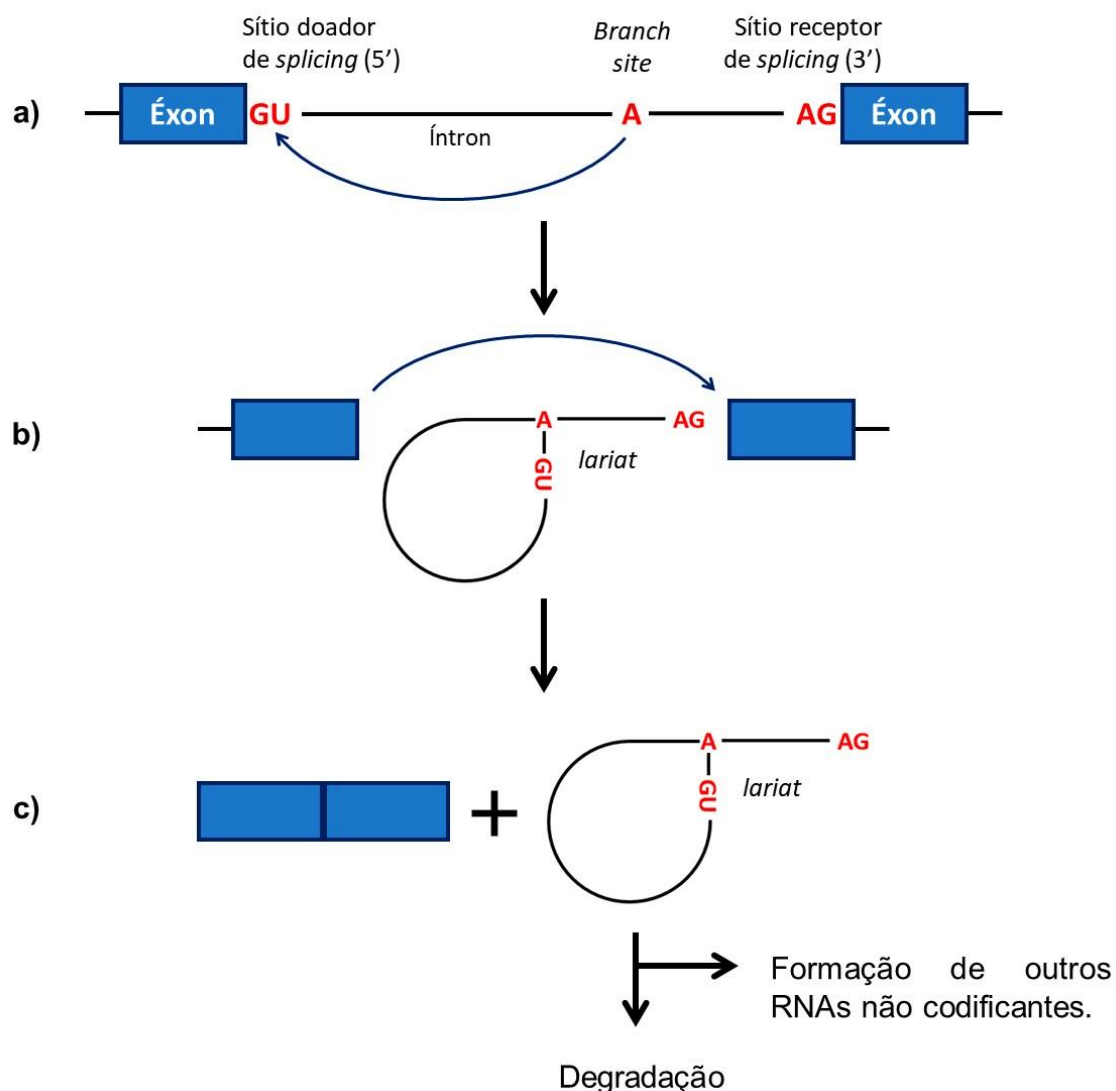


Os resultados mostram que, para ambas as ferramentas consultadas, não há alterações no sítio receptor de *splicing* (3'). Os resultados da ferramenta NnsplICE, mostram que em ambas as sequências (referência e alterada) o sítio receptor de *splicing* estão sendo reconhecidos (Figura 24c). Resultado semelhante, para o sítio receptor de *splicing*, foi observado pela ferramenta *Human Splicing Finder*. Os dados mostram que a sequência de referência e a sequência alterada apresentaram valores consenso superiores a 65 (56,6 e 89,21 respectivamente) indicando a presença do sítio receptor de *splicing* em ambas as sequências. Entretanto, a ferramenta *Human Splicing Finder*, mostra que a variante c.105-8A>C (chrX:147,925,532) pode ser responsável por uma quebra do *Branch Site*. O valor consenso da sequência de referência foi de 78,18 mostrando que o *branch site* está sendo reconhecido (valores de consenso acima de 67 é considerado um potencial *branch site*). Na presença da variante c.105-8A>C, o valor consenso cai para 48,55 (abaixo de 67), indicando potencial perda deste sítio. Além disso o limiar de variação ficou a baixo de -10%, indicando que a variante leva a um *branch site* truncado.

A região do *branch site* é importante na formação de uma estrutura em laço chamada de *ariat* (HESELBERTH, 2013). Após a transcrição do pré-mRNA, espera-se que os íntrons sejam removidos através da formação do *ariat*, o qual, após a ligação dos éxons para tradução é liberado, desmembrado e catalisado pela enzima Dbr1 (do inglês *Lariat debranching enzyme*), para produzir moléculas de íntron lineares, que geralmente são degradadas no núcleo (MOORE, 2002; CHEN; CHENG, 2012) (Figura 25).

São raros os casos de variantes genéticas que afetam o *branch site* (aproximadamente 20 casos conhecidos) (ANNA; MONIKA, 2018; LEWANDOWSKA, 2013), entretanto, estudos com outros genes mostram que a eliminação de uma sequência do *branch site* pode levar a remoção do éxon a jusante (HAMLINGTON et al., 2000; JANSSEN et al., 2000), ou ainda, alterações de um único nucleotídeo, principalmente em torno do resíduo de adenina do *branch site*, diminuem significativamente a eficiência do *splicing* (BURROWS et al., 1998; LI; PRITCHARD, 2000).





**Figura 25 - Splicing do pré-mRNA com a formação de *lariat*.** a) Os íntrons de pré-mRNA são removidos do RNA precursor na forma de estrutura de um *lariat*. Nesta estrutura, a extremidade 5' do íntron é unida (via uma ligação fosfodiéster) a uma adenosina (A) presente no *branch site*; b) Os íntrons são removidos através de clivagem na extremidade 3' do íntron; c) o *lariat* é liberado podendo seguir para duas vias: degradação ou intermediar a formação de outros RNAs não codificantes.

Fonte: Adaptado de CHEN e CHENG (2012).

Com base nestes dados, supomos que a variante c.105-8A>C seja responsável por não formar a estrutura de *lariat* no íntron 2, levando a uma redução na eficiência do *splicing* ou a remoção do éxon 3 do gene *FMR1*.

FMRP tem dois domínios do tipo Agenet (Agenet1 e Agenet2) na extremidade N-terminal codificados pelos éxons 1 a 4 (FERNÁNDEZ; RAJAN; BAGNI, 2013). Os domínios Agenet são responsáveis pela ligação de FMRP à cromatina, atuando na

resposta ao dano do DNA (ALPATOV *et al.*, 2014). Desta forma, a ausência do éxon 3 no transcrito de *FMR1* pode prejudicar a ligação da proteína FMRP à cromatina.

### 5.3.3. Impacto das variantes genéticas raras não-CGG no gene *FMR1*

Os resultados do sequenciamento genético mostram que os primers responsáveis pelas amplificações dos éxons 1, 11 e 12 (*primers* 1 e 8 respectivamente) não foram eficientes como o esperado. O par de primers 1 amplificou apenas em uma amostra e o par 8, amplificou apenas em 2 amostras entre as 20 analisadas. Isso sugere que nas reações pode ter ocorrido anelamento inespecífico/incorrecto, embora tenha sido realizada a padronização do PCR com amostras controles e independentes deste estudo. Tais primers deverão ser substituídos para que futuramente tenhamos a cobertura completa do gene *FMR1* e assim não haja comprometimento na interpretação dos dados.

Entretanto, obtivemos resultados positivos em 74% de todas as possíveis amplificações, o que permitiu a identificação de variantes genéticas não associadas as expansões CGG no gene *FMR1*.

Comparando os dados obtidos com dados disponíveis na literatura científica, apenas a variante c.105-8A>C, observada no indivíduo PN45, foi reportada anteriormente em um indivíduo com atraso no desenvolvimento (COLLINS *et al.*, 2010). Apesar de não se aprofundar em detalhes sobre esta variante não codificante, Collins e colaboradores (2010), destacam que ela possivelmente ocorre em uma região altamente conservada, destacando um possível papel relevante para esta variante, como o sugerido neste trabalho. Em nosso trabalho a variante foi encontrada em um indivíduo que além do atraso no desenvolvimento também apresenta: deficiência intelectual ou dificuldades de aprendizado, hiperatividade, déficit de atenção, estereotipias, fala perseverante, hiperextensibilidade, orelhas grandes, testículos grandes, histórico familiar de DI, histórico familiar de menopausa precoce e ansiedade.

Entre as variantes encontradas, duas são reportadas como benignas na base de dados ClinVar (c.414G>A e c.801+31G>T), sendo assim, é possível que não possuam relação com os fenótipos dos indivíduos que as carregam. Outras quatro variantes não

sugerem efeito deletério na proteína FMRP: c.\*1174C>T, c.881-94C>T, c.52-112>G e c.1275+103A>G.

Entre as variantes com possível efeito deletério na proteína FMRP (c.631-2A>C, c.1276-93A>T, c.\*1062A>T e c.105-8A>C), apenas uma (c.105-8A>C) possui baixa frequência populacional, sendo observada em menos de 5% da população saudável. Predições *in silico* indicam que esta variante parece alterar a região do *branch site* o que pode levar à não formação da estrutura de *lariat*, levando a uma redução na eficiência do *splicing* ou a remoção do éxon 3 do gene *FMR1*.

A variante c.631-2A>C nunca foi reportada anteriormente em bases de dados populacionais, sendo, portanto, rara na população. Além disso, predições *in silico* utilizando diferentes técnicas de bioinformática, que foram validadas por experimentos laboratoriais, sugerem que esta variante tem efeito deletério na proteína FMRP por alterar o mecanismo de *splicing*. Apesar de sabermos que variantes de *splicing* podem causar doenças genéticas humanas (KRAWCZAK; REISS; COOPER, 1992), ainda não podemos confirmar o papel desta variante nas características observadas no indivíduo PN09. Para confirmar tal hipótese, é necessário verificar a presença da mutação nos genitores do indivíduo. Complementarmente, será também necessário realizar uma análise funcional desta alteração intrônica, determinando se de fato a variante ocasionou um *splicing* aberrante com uma proteína alterada.

As análises *in silico* da variante c.1276-93A>T indicam que ela provavelmente não tem impacto no mecanismo *splicing*. Por último, os dados referentes a variante c.\*1062A>T, indicam que ela pode ser responsável por alterações na interação de diferentes miRNA com mRNA.

O relato destas variantes em regiões não codificantes do gene *FMR1* destacam a importância de estudos que visem identificar o papel desta a nível proteico. Além disso, uma nova alteração intrônica identificada neste trabalho (c.631-2A>C) destaca a relevância de estudos envolvendo alterações em sítios de *splicing* presentes em *íntrons*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme detalhado neste trabalho, a Síndrome do X Frágil é uma condição genética que pode apresentar diferentes causas, embora a principal delas seja uma expansão do trinucleotídeos CGG na região regulatória 5'UTR do gene *FMR1*. Para verificar a variabilidade de variantes genéticas do tipo não-CGG no gene *FMR1* e associados com a síndrome, realizamos uma revisão sistemática da literatura científica. Identificamos diversas variantes pontuais e deleções envolvendo o gene *FMR1* que estão sendo ignoradas pelos testes clínicos de rotina, os quais se limitam a identificar as expansões CGG região 5'UTR. Com isso, indivíduos com indícios clínicos que sugerem a ocorrência da SXF podem estar recebendo resultado falso negativo para a condição, desta forma, tais indivíduos não são submetidos à aconselhamento genético e ao tratamento adequado da síndrome.

Esta revisão permitiu a construção de um catálogo de mutações associando a SXF com variantes genéticas reportadas na literatura. Além de apresentar dados atualizados, estas informações podem ser utilizadas como ferramenta complementar no diagnóstico e aconselhamento genético da SXF. Além disso, as variantes podem também ser utilizadas para estudos de ganho e perda de função, para correlação entre genótipo e fenótipo de forma a determinar o mecanismo celular associado com a variante genética.

Também foi realizado um estudo investigativo em uma população composta por indivíduos apresentando características típicas desta síndrome. Na primeira parte, foram identificadas e anotadas as características mais frequentes em uma população de 167 probandos com diagnóstico molecular positivo para SXF. Tais características, que envolveram aspectos cognitivos e comportamentais, foram classificadas e analisadas para construção de um *checklist* para a SXF, o qual futuramente poderá ser utilizado como ferramenta de suporte no diagnóstico de SXF.

Na segunda parte, o *checklist* proposto foi utilizado para analisar os indivíduos que não apresentaram mutação completa para a SXF. Apesar das limitações apresentadas, destaca-se a importância da existência de um *checklist* completo e de uso fácil para auxiliar no diagnóstico da SXF. Estudos mostram que ao expressar sua primeira

preocupação com um indivíduo com a SXF (aproximadamente aos 12 meses de idade), 22% dos pais eram informados por um profissional de saúde de que seu filho estava se desenvolvendo normalmente e 47% foram orientados a “esperar e ver” de que forma ocorrerá o desenvolvimento da criança (BAILEY *et al.*, 2009). Apenas 14% dos pais foram encaminhados para um especialista (BAILEY *et al.*, 2009). Desta forma o uso de *checklists* eficientes podem auxiliar no diagnóstico precoce da síndrome.

A partir do *score* mínimo do *checklist*, foram selecionados 20 participantes considerados sintomaticamente positivos para a SXF para posterior sequenciamento e análise do gene *FMR1*. Ao todo, foram detectadas 10 variantes genéticas em 9 dos probandos selecionados.

Dentre as variantes identificadas, 4 possuem possível efeito deletério na proteína FMRP: c.631-2A>C, c.1276-93A>T, c.\*1062A>T e c.105-8A>C, e nenhuma delas ocorre na região codificante do gene. Destas a substituição c.631-2A>C é reportada pela primeira vez neste trabalho. A variante está localizada no íntron 7 do gene *FMR1* em uma posição que, a partir de diferentes métodos de análise *in silico*, causa falha no reconhecimento do sítio receptor de *splicing* (AG) pela maquinaria de *splicing*, gerando um evento de *splicing* aberrante. Além disso, as predições *in silico* também apontam para efeito deletério na proteína FMRP.

Os resultados obtidos contribuem significativamente com o estudo da SXF, pois sugerem que novos tipos de variantes genéticas no gene *FMR1* podem ser encontradas caso as análises de sequências se estendam para o *locus* completo do gene. Além disso, as novas variantes encontradas, uma vez reportadas na literatura e depositadas em bancos de dados especializados, poderão ser utilizadas por estudos complementares na busca por novas ocorrências das variantes e determinação do nível de penetrância da mesma em indivíduos distintos. Complementarmente, o estudo também apresenta a importância da investigação de regiões intrônicas, uma vez que tais regiões, embora muitas vezes ignoradas por estudos de genotipagem, apresentam conteúdo determinante para a formação de uma proteína funcional.

Neste trabalho apresentamos um conjunto de estudos complementares que contribuem significativamente para uma melhor compreensão da genética e do desenvolvimento de ferramentas de suporte ao diagnóstico da SXF. Tais resultados

poderão ser utilizados como importante ferramenta de estudos para avançar cada vez mais o conhecimento acerca da síndrome, e principalmente para que sejam imediatamente utilizados por laboratórios e clínicos da área de transtornos neurológicos.



## 7. CONCLUSÃO

Existem diversas variantes pontuais e deleções envolvendo o gene *FMR1* que estão sendo ignoradas pelos testes clínicos de rotina. Com isso, indivíduos com indícios clínicos que sugerem a ocorrência da SXF podem estar recebendo resultado falso negativo para a condição.

As características mais frequentes em uma população de 167 indivíduos com diagnóstico molecular positivo para SXF envolveram aspectos cognitivos e comportamentais. Estes dados permitiram desenvolver um *checklist* para SXF que neste trabalho foi utilizado para selecionar 20 participantes para sequenciamento e análise do gene *FMR1*.

Ao todo, foram detectadas 10 variantes genéticas em 9 dos probandos selecionados. Dentre as variantes identificadas, foi reportada a substituição c.631-2A>C, nunca relatada em trabalhos científicos e em bancos de dados especializados em variantes genéticas. A variante está localizada no íntron 7 do gene *FMR1* em uma posição que, a partir de diferentes métodos de análise *in silico*, causa falha no reconhecimento do sítio receptor de *splicing* (AG) pela maquinaria de *splicing*, gerando um evento de *splicing* aberrante. Além disso, as análises *in silico* também apontam para efeito deletério na proteína FMRP.

## 8. ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Como parte complementar desta pesquisa, foram propostas atividades que envolveram a participação em eventos, publicação de artigos e a realização de colaborações de pesquisa científica com pesquisadores de outras instituições nacionais e internacionais.

### 8.1. Prêmio

O *Checklist* construído para a seleção dos participantes desta pesquisa foi apresentado na forma de pôster sob o título: Construção de um *Checklist* como ferramenta de suporte para o diagnóstico da Síndrome do X Frágil, na II Mostra de Pesquisa do PPGCS e Escola de Medicina, realizada no dia 5 de novembro de 2018 na Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Este pôster foi premiado em 1º lugar dos resumos neste evento.

### 8.2. Artigos publicados

1. FERNANDES, I. R.; **CRUZ, A. C. P.**; FERRASA A.; PHAN, D.; HERAI, R. H.; MUOTRI, A. R. Genetic variations on *SETD5* underlying autistic conditions. **Developmental Neurobiology**, v. 78, n. 5, p. 500–518, maio 2018, DOI: [10.1002/dneu.22584](https://doi.org/10.1002/dneu.22584).
2. **CRUZ, A. C. P.**; FERRASA A.; MUOTRI, A. R. HERAI, R. H. Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders. **Mitochondrion**, 13 set. 2018, DOI: [10.1016/j.mito.2018.09.005](https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.09.005).

## 9. REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.
- ALPATOV, R. *et al.* A Chromatin-Dependent Role of the Fragile X Mental Retardation Protein FMRP in the DNA Damage Response. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 869–881, 2014.
- AMARAL, L. R.; MELO, H. C. S. Síndrome do X frágil: breve revisão e relato de caso. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, v. 17, n. 2, p. 135, 2017.
- ANNA, A.; MONIKA, G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. **Journal of applied genetics**, v. 59, n. 3, p. 253–268, 2018.
- AROCENA, D. G. *et al.* A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. **Human Genetics**, v. 106, n. 3, p. 366–369, 2000.
- ARSENAULT, J. *et al.* FMRP Expression Levels in Mouse Central Nervous System Neurons Determine Behavioral Phenotype. **Human gene therapy**, v. 27, n. 12, p. 982–996, 2016.
- ARVIO, M.; PEIPPO, M.; SIMOLA, K. O. Applicability of a checklist for clinical screening of the fragile X syndrome. **Clinical genetics**, v. 52, n. 4, p. 211–5, 1997.
- BAGNI, C.; GREENOUGH, W. T. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 376–387, 2005.
- BAILEY, D. B. *et al.* Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: Findings from a national parent survey. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146A, n. 16, p. 2060–2069, 2008.
- BAILEY, D. B. *et al.* No Change in the Age of Diagnosis for Fragile X Syndrome: Findings From a National Parent Survey. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 527–533, 2009.
- BECHARA, E. G. *et al.* A Novel Function for Fragile X Mental Retardation Protein in Translational Activation. **PLoS Biology**, v. 7, n. 1, p. 133–145, 2009.
- BEKE, A. *et al.* Molecular cytogenetic analysis of Xq critical regions in premature ovarian failure. **Molecular cytogenetics**, v. 6, n. 1, p. 62, 20 dez. 2013.
- BENDL, J. *et al.* PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 5, p. e1004962, 2016.
- BERGET, S. M.; MOORE, C.; SHARP, P. A. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3171–3175, 1977.
- BHAKAR, A. L.; DÖLEN, G.; BEAR, M. F. The pathophysiology of fragile X (and what it

teaches us about synapses). **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 417–443, 2012.

BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J. D.; CUI, Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D86–D91, 2014.

BIANCALANA, V. *et al.* EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 23, n. 4, p. 417–425, 2015.

BIRNBOIM, H. C. **DNA yield with an Oragene® self-collection kit**. DNA Genotek. PD-WP-001. 2011.

BLACK, D. L. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 291–336, 2003.

BONGMBA, O. Y. N. *et al.* Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. **Brain research**, v. 1399, p. 79–95, 2011.

BOY, R. *et al.* Estudo caso-controle envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 59, n. 1, p. 83–88, 2001.

BURROWS, N. P. *et al.* A point mutation in an intronic branch site results in aberrant splicing of COL5A1 and in Ehlers-Danlos syndrome type II in two British families. **American journal of human genetics**, v. 63, n. 2, p. 390–398, 1998.

BUTLER, M. G. *et al.* A 15-item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. **Clinical genetics**, v. 39, n. 5, p. 347–354, 1991.

CALAIS, F. L. **Efeitos de variações instrônicas em genes de enzimas esteroideogênicas sobre o processo de splicing**. 2014, 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

CARTEGNI, L.; CHEW, S. L.; KRAINER, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 4, p. 285–298, 2002.

CARVALHO, M. **Síndrome do X frágil: guia para famílias e profissionais**. Ribeirão Preto: SBG, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Fragile X Syndrome (FXS): Data & Statistics. Mai. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/fxs/data.html>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

CHASTE, P. *et al.* High-functioning autism spectrum disorder and fragile X syndrome: report of two affected sisters. **Molecular autism**, v. 3, n. 1, p. 5, 2012.

CHAUDHARY, A. G. *et al.* Molecular Diagnosis of Fragile X Syndrome Using Methylation Sensitive Techniques in a Cohort of Patients With Intellectual Disability. **Pediatric**

**Neurology**, v. 50, n. 4, p. 368–376, 2014.

CHEN, H.; CHENG, S. Functional roles of protein splicing factors. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 4, p. 345–359, 2012.

CHIANG, C. *et al.* SpeedSeq: ultra-fast personal genome analysis and interpretation. **Nature methods**, v. 12, n. 10, p. 966–968, 2015.

CHRISTOFOLINI, D. M. *et al.* Clinical checklists in the selection of mentally retarded males for molecular screening of fragile X syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1047–1050, 2007.

CHRISTOFOLINI, D. M. *et al.* Evaluation of clinical checklists for fragile X syndrome screening in Brazilian intellectually disabled males. **Journal of Intellectual Disabilities**, v. 13, n. 3, p. 239–248, 2009.

COFFEE, B. *et al.* Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: a case report and review of the literature. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 146A, n. 10, p. 1358–1367, 2008.

COFFEE, B. *et al.* Incidence of Fragile X Syndrome by Newborn Screening for Methylated FMR1 DNA. **The American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 4, p. 503–514, 2009.

COLLINS, S. C. *et al.* Identification of novel FMR1 variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 152A, n. 10, p. 2512–2520, 2010.

CONTRACTOR, A. Broadening roles for FMRP: big news for big potassium (BK) channels. **Neuron**, v. 77, n. 4, p. 601–603, fev. 2013.

CORNISH, K.; TURK, J.; HAGERMAN, R. The fragile X continuum: new advances and perspectives. **Journal of Intellectual Disability Research**, v. 52, n. 6, p. 469–482, 2008.

CRAWFORD, D. C.; ACUÑA, J. M.; SHERMAN, S. L. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 3, n. 5, p. 359–371, 2001.

DAHL, N. *et al.* Myotubular myopathy in a girl with a deletion at Xq27-q28 and unbalanced X inactivation assigns the MTM1 gene to a 600-kb region. **American journal of human genetics**, v. 56, n. 5, p. 1108–15, 1995.

DARNELL, J. C.; RICHTER, J. D. Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 8, p. a012344, 2012.

DE BOULLE, K. *et al.* A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. **Nature Genetics**, v. 3, n. 1, p. 31–35, 1993.

DE GRAAFF, E. *et al.* The fragile X phenotype in a mosaic male with a deletion showing expression of the FMR1 protein in 28% of the cells. **American Journal of Medical**

**Genetics**, v. 64, n. 2, p. 302–308, 1996.

DE VRIES, B. B. *et al.* Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. **American journal of human genetics**, v. 61, n. 3, p. 660–667, 1997.

DEAN, D. D.; MUTHUSWAMY, S.; AGARWAL, S. Fragile X syndrome: Current insight. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 17, n. 4, p. 303–309, 2016.

DESMET, F. O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 9, p. e67–e67, 2009.

DEVITT, N. M.; GALLAGHER, L.; REILLY, R. B. Autism Spectrum Disorder (ASD) and Fragile X Syndrome (FXS): Two Overlapping Disorders Reviewed through Electroencephalography-What Can be Interpreted from the Available Information? **Brain sciences**, v. 5, n. 2, p. 92–117, 2015.

EGGERMANN, T. *et al.* Premature ovarian failure associated with a small terminal Xq deletion: narrowing the POF1 region down to Xq27.2/Xq27.3-qter. **Clinical Genetics**, v. 67, n. 5, p. 434–437, 2005.

EICHLER, E. E. *et al.* Fine structure of the human FMR1 gene. **Human molecular genetics**, v. 2, n. 8, p. 1147–1153, 1993.

ESLAMI, H. *et al.* Epigenetic Aberration of FMR1 Gene in Infertile Women with Diminished Ovarian Reserve. **Cell J**. v. 20, p. 78–83, 2018.

FERNÁNDEZ, E.; RAJAN, N.; BAGNI, C. The FMRP regulon: from targets to disease convergence. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, p. 191, 2013.

FERREIRA, S. I. *et al.* X-chromosome terminal deletion in a female with premature ovarian failure: Haploinsufficiency of X-linked genes as a possible explanation. **Molecular cytogenetics**, v. 3, p. 14, 2010.

FRITSCH, P. **Triagem Molecular para Síndrome do X Frágil em Pacientes com Deficiência Mental atendidos no HUB/UnB**. 2011, 93 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

FU, Y. H. *et al.* Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1047–1058, 1991.

FUSCO, F. *et al.* Genetic and molecular analysis of a new unbalanced X;18 rearrangement: localization of the diminished ovarian reserve disease locus in the distal Xq POF1 region. **Human Reproduction**, v. 26, n. 11, p. 3186–3196, 2011.

GARBIERI, T. F. *et al.* Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. **J Appl Oral Sci. J Appl Oral Sci**, v. 25, n. 2, p. 147–158, 2017

GIANGRECO, C. A. *et al.* A simplified six-item checklist for screening for fragile X

syndrome in the pediatric population. **The Journal of pediatrics**, v. 129, n. 4, p. 611–4, 1996.

GIBBS, R. A. *et al.* A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.

GOLDEN, C. E. M. *et al.* Deletion of the KH1 Domain of Fmr1 Leads to Transcriptional Alterations and Attentional Deficits in Rats. **Cerebral Cortex**, v. 29, n. 5, p. 2228–2244, 2019.

GOVAERTS, L. *et al.* Exceptional good cognitive and phenotypic profile in a male carrying a mosaic mutation in the FMR1 gene. **Clinical Genetics**, v. 72, n. 2, p. 138–144, 2007.

GRONSKOV, K. *et al.* A nonsense mutation in FMR1 causing fragile X syndrome. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 19, n. 4, p. 489–491, 2011.

GROZEVA, D. *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability. **Human mutation**, v. 36, n. 12, p. 1197–1204, 2015.

HADDAD, L. A. *et al.* Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. **American journal of medical genetics**, v. 84, n. 3, p. 198–201, 1999.

HAGERMAN, R. J.; AMIRI, K.; CRONISTER, A. Fragile X checklist. **American Journal of Medical Genetics**. v. 38, p. 283-287, 1991.

HAGERMAN, R. J. *et al.* Advances in the treatment of fragile X syndrome. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 378–390, 2009.

HAGERMAN, R. J. *et al.* Fragile X syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17065, 2017.

HAMLINGTON, J. D. *et al.* Deletion of a branch-point consensus sequence in the LMX1B gene causes exon skipping in a family with nail patella syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 8, n. 4, p. 311–314, 2000.

HAN, X. D. *et al.* Mosaicism for a full mutation, premutation, and deletion of the CGG repeats results in 22% FMRP and elevated FMR1 mRNA levels in a high-functioning fragile X male. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140A, n. 13, p. 1463–1471, 2006.

HANDT, M. *et al.* Point mutation frequency in the FMR1 gene as revealed by fragile X syndrome screening. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 5–6, p. 279–283, 2014.

HARTLEY, S. L. *et al.* Exploring the adult life of men and women with fragile X syndrome: results from a national survey. **American journal on intellectual and developmental disabilities**, v. 116, n. 1, p. 16–35, 2011.

HESSELBERTH, J. R. Lives that introns lead after splicing. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 4, n. 6, p. 677–691, 2013.

HESSL, D. *et al.* The NIH Toolbox Cognitive Battery for intellectual disabilities: three

preliminary studies and future directions. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, v. 8, n. 1, p. 35, 6 dez. 2016.

HOEKSTRA, R. A. *et al.* Association between extreme autistic traits and intellectual disability: insights from a general population twin study. ***British Journal of Psychiatry***, v. 195, n. 06, p. 531–536, 2009.

HU, H. *et al.* X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. ***Molecular psychiatry***, v. 21, n. 1, p. 133–48, 2016.

HUNTER, J. *et al.* Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. ***American Journal of Medical Genetics Part A***, v. 164, n. 7, p. 1648–1658, 2014.

HWANG, Y. T. *et al.* Partially methylated alleles, microdeletion, and tissue mosaicism in a fragile X male with tremor and ataxia at 30 years of age: A case report. ***American Journal of Medical Genetics Part A***, v. 170, n. 12, p. 3327–3332, 2016.

IWASLOW, R.M.; DESBOIS, A.; BIRNBOIM, H.C. **Long-Term Stability of DNA from Saliva Samples Stored in the Oragene Self-Collection Kit**. DNA Genotek, D-WP-005, 2011.

JANSSEN, R. J. *et al.* A branch site mutation leading to aberrant splicing of the human tyrosine hydroxylase gene in a child with a severe extrapyramidal movement disorder. ***Annals of human genetics***, v. 64, n. 5, p. 375–382, 2000.

JIRAANONT, P. *et al.* Germinal mosaicism for a deletion of the *FMR1* gene leading to fragile X syndrome. ***European Journal of Medical Genetics***, v. 59, n. 9, p. 459–462, 2016.

JIRAANONT, P. *et al.* Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. ***Expert review of molecular diagnostics***, v. 17, n. 11, p. 1023–1032, 2017.

KAUFMANN, W. E. *et al.* Genotype, molecular phenotype, and cognitive phenotype: correlations in fragile X syndrome. ***American journal of medical genetics***, v. 83, n. 4, p. 286–295, 1999.

KIM, M.; BELLINI, M.; CEMAN, S. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. ***Molecular and cellular biology***, v. 29, n. 1, p. 214–228, 2009.

KITCHENHAM, B.; CHARTERS, S. **Guidelines for performing Systematic Literature Reviews in Software Engineering**. Version 2.3, Keele University and University of Durham, EBSE Technical Report, 2007.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. ***Bioinformatics***, v. 23, n. 10, p. 1289–1291, 2007.

KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. ***Human genetics***, v. 90, n. 1–2, p. 41–54, 1992.



KUMARI, D.; USDIN, K. Sustained expression of *FMR1* mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3K27. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 17, p. 3689–3698, 2016.

LAING, S. *et al.* Clinical screening score for the fragile X (Martin-Bell) syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 38, n. 2–3, p. 256–259, 1991.

LANDRUM, M. J. *et al.* ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D980-5, 2014.

LAPORTE, J. *et al.* A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. **Nature Genetics**, v. 13, n. 2, p. 175–182, 1996.

LEAL DE ASSUMPÇÃO, C. R. Falência ovariana precoce. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 2, 2014.

LEK, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285–291, 2016.

LEWANDOWSKA, M. A. The missing puzzle piece: splicing mutations. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 6, n. 12, p. 2675–2682, 2013.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.

LI, M.; PRITCHARD, P. H. Characterization of the effects of mutations in the putative branchpoint sequence of intron 4 on the splicing within the human lecithin:cholesterol acyltransferase gene. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18079–18084, 2000.

LIGSAY, A.; HAGERMAN, R. J. RLIGSAY, A.; HAGERMAN, R. J. Review of targeted treatments in fragile X syndrome. **Intractable & rare diseases research**, v. 5, n. 3, p. 158–67, ago. 2016. eview of targeted treatments in fragile X syndrome. **Intractable & rare diseases research**, v. 5, n. 3, p. 158–67, 2016.

LIMPRASERT, P. *et al.* A clinical checklist for fragile X syndrome: screening of Thai boys with developmental delay of unknown cause. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet**, v. 83, n. 10, p. 1260–1266, 2000.

LIU, C. *et al.* MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 661, 2012.

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

LUGENBEEL, K. A. *et al.* Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of *FMR1* in fragile X syndrome. **Nature Genetics**, v. 10, n. 4, p. 483–485, 1995.

MACPHERSON, J. N.; MURRAY, A. Development of Genetic Testing for Fragile X Syndrome and Associated Disorders, and Estimates of the Prevalence of FMR1 Expansion Mutations. **Genes**, v. 7, n. 12, p.110. 2016.

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

MATERA, A. G.; WANG, Z. A day in the life of the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 108–121, 2014.

MCLENNAN, Y. *et al.* Fragile x syndrome. **Current genomics**, v. 12, n. 3, p. 216–224, 2011.

MEGUID, N. A. *et al.* Prevalence of fragile X syndrome among school-age Egyptian males. **World J Pediatr**, v. 3, n. 4, p. 271-275, 2007.

MILÀ, M. *et al.* Rare variants in the promoter of the fragile X syndrome gene (*FMR1*). **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, n. 2, p. 115–119, 2000.

MILA, M. *et al.* Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. **Clinical Genetics**, v. 93, n. 2, p. 197–205, 2018.

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

MOORE, M. J. Nuclear RNA turnover. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 431–434, 2002.

MORGANTE, A. V. A Síndrome do Cromossomo X-Frágil. Em: Estudos Avançados - Coleção Documentos Série Especial- Ciclo de Conferências Temáticas - 1.3. Publ. USP On line. Janeiro/1997.

MURRAY, A. *et al.* Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. **Human molecular genetics**, v. 5, n. 6, p. 727–735, 1996.

MYRICK, L. K. *et al.* Fragile X syndrome due to a missense mutation. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 22, n. 10, p. 1185–1189, 2014.

MYRICK, L. K. *et al.* Independent role for presynaptic FMRP revealed by an FMR1 missense mutation associated with intellectual disability and seizures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 4, p. 949–956, 2015.

NAKAI, K.; SAKAMOTO, H. Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. **Gene**, v. 141, n. 2, p. 171–7, 1994.

NHLBI GO Exome Sequencing Project (Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), WA [<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>]. Acesso Dez 2018.

NIU, M. *et al.* Fragile X Syndrome: Prevalence, Treatment, and Prevention in China. **Frontiers in neurology**, v. 8, p. 254, 2017.

NOLIN, S. L. *et al.* Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 2, p. 454–64, 2003.

NOLIN, S. L. *et al.* Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 161A, n. 4, p. 771–778, 2013.

NOLIN, S. L. *et al.* Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 358–364, 2015.

OKRAY, Z. *et al.* A novel fragile X syndrome mutation reveals a conserved role for the carboxy-terminus in FMRP localization and function. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 4, p. 423–37, 17 fev. 2015.

OTSUKA, S. *et al.* Fragile X carrier screening and FMR1 allele distribution in the Japanese population. **Brain and Development**, v. 32, n. 2, p. 110–114, 2010.

PAL, J. K.; CHATTERJEE, S.; RAO, S. J. Pathological Variations in 3'-Untranslated Regions of Human Genes. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 1–11, 2016.

PENAGARIKANO, O.; MULLE, J. G.; WARREN, S. T. The pathophysiology of fragile x syndrome. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 8, p. 109–129, 2007.

PEPRAH, E. Fragile X Syndrome: The FMR1 CGG Repeat Distribution Among World Populations. **Annals of Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 178–191, 2012.

PUGIN, A. *et al.* Clinical, molecular, and pharmacological aspects of FMR1-related disorders. **Neurología (English Edition)**, v. 32, n. 4, p. 241–252, 2017.

PUUSEPP, H. *et al.* Prevalence of the Fragile X Syndrome Among Estonian Mentally Retarded and the Entire Children's Population. **Journal of Child Neurology**, v. 23, n. 12, p. 1400–1405, 2008.

QUARTIER, A. *et al.* Intragenic FMR1 disease-causing variants: a significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 25, n. 4, p. 423–431, 2017.

RASPA, M.; WHEELER, A. C.; RILEY, C. Public Health Literature Review of Fragile X Syndrome. **Pediatrics**, v. 139, n. Suppl 3, p. S153–S171, 2017.

REESE, M. G. *et al.* Improved Splice Site Detection in Genie. **Journal of Computational Biology**, v. 4, n. 3, p. 311–323, 1997.

REUS, R. **El síndrome X-frágil o de Martin-Bell: características y síntomas.** Disponível em: <<https://ovodonante.com/sindrome-x-fragil-martin-bell-caracteristicas-sintomas/>>. Acesso em: 12 out. 2017.

ROCA, X.; SACHIDANANDAM, R.; KRAINER, A. R. Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. **RNA**, v. 11, n. 5, p. 683–698, 2005.

ROY CHOWDHURY, M. *et al.* Validation of Polymerase Chain Reaction– Based Assay to Detect Actual Number of CGG Repeats in FMR1 Gene in Indian Fragile X Syndrome Patients. **Journal of child neurology**, v. 32, n. 4, p. 371–378, 2017.

RUSKIN, B.; GREEN, M. R. Role of the 3' splice site consensus sequence in mammalian pre-mRNA splicing. **Nature**, v. 317, n. 6039, p. 732–734, 24 out. 1985.

SANTA MARÍA, L. *et al.* FXTAS in an unmethylated mosaic male with fragile X syndrome from Chile. **Clinical genetics**, v. 86, n. 4, p. 378–382, 2014.

SAUNA-AHO, O. *et al.* Signs indicating dementia in Down, Williams and Fragile X syndromes. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 6, n. 5, p. 855–860, 2018.

SCHWARZ, J. M. *et al.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nature Methods**, v. 11, n. 4, p. 361–362, 1 abr. 2014.

SERPA, G. **Genômica do X-frágil: elementos de regulação do Gene FMR1**. 2008. 76 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SETHNA, F.; MOON, C.; WANG, H. From FMRP function to potential therapies for fragile X syndrome. **Neurochemical research**, v. 39, n. 6, p. 1016–1031, 2014.

SHERMAN, S.; PLETCHER, B. A.; DRISCOLL, D. A. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 7, n. 8, p. 584–7, 2005.

SHERRY, S. T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 1, p. 308–11, 2001.

SITZMANN, A. F. *et al.* Rare *FMR1* gene mutations causing fragile X syndrome: A review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 1, p. 11–18, 2018.

SORIA, J. M. *et al.* Acceptor splice site mutation in the invariant AG of intron 5 of the protein C gene, causing type I protein C deficiency. **Human Genetics**, v. 92, n. 5, p. 506–508, 1993.

STONE, W. L.; LOS, E. **Fragile X Syndrome**. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459243/>. Acesso em: 25 nov. 2018.

SUHL, J. A. *et al.* A 3' untranslated region variant in *FMR1* eliminates neuronal activity-dependent translation of FMRP by disrupting binding of the RNA-binding protein HuR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. E6553–6561, 2015.

TABET, R.; VITALE, N.; MOINE, H. Fragile X syndrome: Are signaling lipids the missing

culprits? **Biochimie**, v. 130, p. 188–194, 2016.

TASSONE, F. *et al.* Transcription of the *FMR1* gene in individuals with fragile X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 97, n. 3, p. 195–203, 2000.

TAYLOR, A. K. **Fragile X DNA Testing: a guide for physicians and families**. Disponível em: <<http://www.chp.edu/-/media/chp/departments-and-services/brain/documents/neurology-documents/fragile-x-center-documents/fragile-x-dna-testing.pdf?la=en&hash=CA1E3824A10A31E58D10741E7D4803B1DADCB21C>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

THURMAN, A. J. *et al.* Psychiatric symptoms in boys with fragile X syndrome: A comparison with nonsyndromic autism spectrum disorder. **Research in Developmental Disabilities**, v. 35, n. 5, p. 1072–1086, 2014.

TURNER, G. *et al.* Prevalence of fragile X syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 64, n. 1, p. 196–197, 1996.

TZENG, C.-C. *et al.* Prevalence of the *FMR1* mutation in Taiwan assessed by large-scale screening of newborn boys and analysis of DXS548-FRAXAC1 haplotype. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 133A, n. 1, p. 37–43, 2005.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115. 2012.

USDIN, K.; KUMARI, D. Repeat-mediated epigenetic dysregulation of the *FMR1* gene in the fragile X-related disorders. **Front. Genet**, v. 6, p. 192, 2015.

VASER, R. *et al.* SIFT missense predictions for genomes. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.

VISSERS, L. E. L. M.; GILISSEN, C.; VELTMAN, J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 9–18, 2016.

VIVEIROS, M. T. M. **Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental idiopática no Maranhão: diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil**. 2013, 89 f. Tese (Doutorado Interinstitucional em fisiopatologia clínica) - Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2013.

VIVEIROS, M. T. M. *et al.* Short Communication Screening for fragile X syndrome in males from specialized institutions in the northeast region of Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 6897–6905, 2015.

VOŘECHOVSKÝ, I. Aberrant 3' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 16, p. 4630–4641, 2006.

ZOGHBI, H. Y.; BEAR, M. F. Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. **Cold Spring Harbor perspectives in**

**biology**, v. 4, n. 3, 2012.

WANG, Y. C. *et al.* Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome. **Human Mutation**, v. 10, n. 5, p. 393–399, 1997.

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

WOLFF, D. J. *et al.* Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. **Human genetics**, v. 100, n. 2, p. 256–261, 1997.

WRIGHT, C. F. *et al.* Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9975, p. 1305–1314, 2015.

YOUINGS, S. A. *et al.* FRAXA and FRAXE: the results of a five year survey. **Journal of medical genetics**, v. 37, n. 6, p. 415–21, 2000.

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

## **APÊNDICE A - Revisão Sistemática de Literatura para identificação de variantes genéticas raras no gene *FMR1* associadas com SXF**

O método empregado para a realização desta RSL baseou-se no protocolo desenvolvido por Kitchenham e Charters (2007). O objetivo principal da revisão foi identificar o conhecimento atual a respeito das variantes que já foram reportadas no gene *FMR1*.

Para identificar os artigos que detectaram e/ou estudaram variantes genéticas no gene *FMR1*, esta RSL foi realizada nas bases de dados PubMed, Scopus e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) até 23 de outubro de 2018.

A fim de incluir todos os estudos existentes a respeito do tema considerado, foram relacionados os seguintes termos e seus respectivos sinônimos: gene/proteína, variantes genéticas e molécula, resultando em uma combinação de 40 palavras-chaves para a construção da busca (Tabela 17). Os resultados obtidos na busca eletrônica foram extraídos diretamente para uma planilha do Excel e tabuladas com as seguintes informações: Autor, título, ano, revista, volume, edição, DOI, Link e base de dados. Em seguida foi realizada uma triagem para remover artigos duplicados para então realizar a seleção dos artigos relevantes para a RSL.

Após a remoção dos trabalhos duplicados, cada título e resumo foram revisados por três autores. Estes trabalhos pré-selecionados foram então analisados pelo seu conteúdo completo a fim de identificar somente os estudos que preencheram os critérios de inclusão.

Foram definidos os seguintes critérios de inclusão: i) estudos publicados até 23 de outubro de 2018; ii) trabalhos nos idiomas inglês e português; iii) que apresentam variantes genéticas diferentes das repetições CGG que abrangem o *locus* do gene *FMR1* humano; iv) qualquer doença reportada foi considerada. Além disso, foram definidos os seguintes critérios de exclusão: i) estudos sobre aspectos funcionais da proteína FMRP; ii) alvos terapêuticos; iii) técnicas de diagnóstico;

Os artigos selecionados foram analisados para coletar as seguintes informações: variante, tipo de variante, alelo alterado, alelo de referência, posição do aminoácido substituído, herança, posição no genoma, isoforma, região do gene, efeito da variante, fenótipo/condição.

**Tabela 17 - Estratégia de busca utilizada para realizar RSL para identificação de variantes genéticas raras no gene *FMR1* associadas com SXF.**

Base de dados	Parâmetros de busca
PubMed	<p>(Xq27 [Title/Abstract] OR Fragile X Mental Retardation 1[Title/Abstract] OR Fragile X Mental Retardation Protein 1[Title/Abstract] OR FMRP[Title/Abstract] OR Synaptic Functional Regulator FMR1[Title/Abstract] OR Premature Ovarian Failure 1[Title/Abstract] OR Protein FMR-1[Title/Abstract] OR FRAXA[Title/Abstract] OR POF-1[Title/Abstract] OR POF[Title/Abstract] OR FXTAS[Title/Abstract] AND (variant[Title/Abstract] OR Polymorphism[Title/Abstract] OR alteration[Title/Abstract] OR mutation[Title/Abstract] OR change[Title/Abstract] OR SNP[Title/Abstract] OR deletion[Title/Abstract] OR insertion[Title/Abstract] OR nonsense[Title/Abstract] OR missense[Title/Abstract] OR SNV[Title/Abstract] OR duplication[Title/Abstract] OR Frameshift[Title/Abstract] OR silent[Title/Abstract] OR expression[Title/Abstract] OR modulation[Title/Abstract] AND (gene[Title/Abstract] OR Transcript[Title/Abstract] OR Transcriptionic[Title/Abstract] OR mRNA[Title/Abstract] OR RNA[Title/Abstract] OR Messenger RNA[Title/Abstract] OR DNA[Title/Abstract] OR Genome[Title/Abstract] OR Genetic[Title/Abstract] OR Genomic[Title/Abstract] OR Protein[Title/Abstract] OR proteomic[Title/Abstract] OR aminoacid[Title/Abstract])</p>
Scopus	<p>(TITLE-ABS-KEY (Xq27) OR TITLE-ABS-KEY (fragile AND x AND mental AND retardation 1) OR TITLE-ABS-KEY (fragile AND x AND mental AND retardation AND protein 1) OR TITLE-ABS-KEY (FMRP) OR TITLE-ABS-KEY (synaptic AND functional AND regulator AND fmr-1) OR TITLE-ABS-KEY (premature AND ovarian AND failure 1) OR TITLE-ABS-KEY (fxas) OR TITLE-ABS-KEY (protein AND fmr-1) OR TITLE-ABS-KEY (POF1) OR TITLE-ABS-KEY (POF) AND TITLE-ABS-KEY (variant) OR TITLE-ABS-KEY (polymorphism) OR TITLE-ABS-KEY (alteration) OR TITLE-ABS-KEY (mutation) OR TITLE-ABS-KEY (change) OR TITLE-ABS-KEY (SNP) OR TITLE-ABS-KEY (SNV) OR TITLE-ABS-KEY (deletion) OR TITLE-ABS-KEY (insertion) OR TITLE-ABS-KEY (nonsense) OR TITLE-ABS-KEY (missense) OR TITLE-ABS-KEY (duplication) OR TITLE-ABS-KEY (frameshift) OR TITLE-ABS-KEY (silent) OR TITLE-ABS-KEY (expression) OR TITLE-ABS-KEY (modulation) AND TITLE-ABS-KEY (gene) OR TITLE-ABS-KEY (transcript) OR TITLE-ABS-KEY (transcriptionic) OR TITLE-ABS-KEY (mRNA) OR TITLE-ABS-KEY (RNA) OR TITLE-ABS-KEY (Messenger RNA) OR TITLE-ABS-KEY (DNA) OR TITLE-ABS-KEY (genome) OR TITLE-ABS-KEY (genetic) OR TITLE-ABS-KEY (genomic) OR TITLE-ABS-KEY (protein) OR TITLE-ABS-KEY (proteomic) OR TITLE-ABS-KEY (aminoacid))</p>
BVS	<p>("Xq27" OR "Fragile X Mental Retardation 1" OR "Fragile X Mental Retardation Protein 1" OR "FMRP" OR "Synaptic Functional Regulator FMR1" OR "Premature Ovarian Failure 1" OR "Protein FMR-1" OR "FRAXA" OR "POF1" OR "POF" OR "FXTAS") AND ("variant" OR "Polymorphism" OR "alteration" OR "mutation" OR "change" OR "SNP" OR "deletion" OR "insertion" OR "nonsense" OR "missense" OR "SNV" OR "duplication" OR "Frameshift" OR "silent" OR "expression" OR "modulation") AND ("gene" OR "Transcript" OR "Transcriptionic" OR "mRNA" OR "RNA" OR "Messenger RNA" OR "DNA" OR "Genome" OR "Genetic" OR "Genomic" OR "Protein" OR "proteomic" OR "aminoacid")</p>



## APÊNDICE B - Variantes genéticas descritas no banco de dados ClinVar para o gene *FMR1*.

(continua)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
FMR1, SER27TER	SXF	Patogênica		.
FMR1, (CGG)n EXPANSION	SXF/FXTAS/FOP	Patogênica		.
FMR1, 1-BP DEL, 373A	SXF	Patogênica		.
NC_000023.9:g:146703942_146820448del	SXF	Patogênica		.
NM_002024.5(FMR1):c.-128_-126(200)	SXF	Patogênica	146993570 - 146993572	147912052 - 147912054
NM_002024.5(FMR1):c.18G>T (p.Val6=)	Não especificado/Historico de distúrbio do neurodesenvolvimento	Benigna	146993715	147912197
NM_002024.5(FMR1):c.52-1_52delinsTA	SXF	Patogênica	147003450 - 147003451	147921932 - 147921933
NM_002024.5(FMR1):c.104+42A>G	Não especificado	Benigna	147003545	147922027
NM_002024.5(FMR1):c.199-2A>G	Comportamento autista/Deficiência Intelectual	Provável patogênica	147009838	147928320
NM_002024.5(FMR1):c.225G>A (p.Glu75=)	Não especificado	Provável benigna	147009866	147928348
NM_002024.5(FMR1):c.271-19A>G	Não especificado	Benigna	147010158	147928640
NM_002024.5(FMR1):c.348T>C (p.Asn116=)	Não especificado	Benigna	147010254	147928736
NM_002024.5(FMR1):c.374C>T (p.Thr125Ile)	Não especificado	Significado incerto	147010280	147928762
NM_002024.5(FMR1):c.375T>C (p.Thr125=)	Não especificado	Provável benigna	147010281	147928763
NM_002024.5(FMR1):c.414G>A (p.Arg138=)	Não especificado/Historico de distúrbio do neurodesenvolvimento	Benigna	147010320	147928802
NM_002024.5(FMR1):c.419+43T>C	Não especificado	Benigna	147010368	147928850
NM_002024.5(FMR1):c.420-11dupT	Não especificado	Benigna	147011456	147929937
NM_002024.5(FMR1):c.420-10A>T	Não especificado	Significado incerto	147011457	147929938
NM_002024.5(FMR1):c.420-8A>G	Deficiência intelectual	Patogênica	147011459	147929940

(continuação)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
NM_002024.5(FMR1):c.433G>T (p.Ala145Ser)	Não especificado/Historico dedistúrbio do neurodesenvolvimento	Benigna	147011480	147929961
NM_002024.5(FMR1):c.440A>G (p.His147Arg)	Não comprovado	Significado incerto	147011487	147929968
NM_002024.5(FMR1):c.522T>A (p.Asn174Lys)	Não especificado	Provável benigna	147011655	147930136
NM_002024.5(FMR1):c.554T>C (p.Ile185Thr)	Não especificado	Significado incerto	147011687	147930168
NM_002024.5(FMR1):c.602G>C (p.Arg201Thr)	Inborn genetic diseases	Significado incerto	147011735	147930216
NM_002024.5(FMR1):c.651G>A (p.Ser217=)	Historico dedistúrbio do neurodesenvolvimento	Provável benigna	147013964	147932445
NM_002024.5(FMR1):c.797G>A (p.Gly266Glu)	Historico dedistúrbio do neurodesenvolvimento	Provável patogênica	147014110	147932591
NM_002024.5(FMR1):c.801+31C>T	Não especificado	Benigna	147014145	147932626
NM_002024.5(FMR1):c.818A>G (p.Lys273Arg)	Não comprovado	Significado incerto	147014220	147932701
NM_002024.5(FMR1):c.911T>A (p.Ile304Asn)	Fragile X syndrome	Patogênica	147018053	147936534
NM_002024.5(FMR1):c.990+1G>A	Deficiência intelectual	Patogênica	147018133	147936614
NM_002024.5(FMR1):c.990+14C>T	Não especificado	Benigna	147018146	147936627
NM_002024.5(FMR1):c.1256A>G (p.Tyr419Cys)	Não comprovado	Provável patogênica	147022162	147940643
NM_002024.5(FMR1):c.1332T>A (p.Ile444=)	Não especificado	Significado incerto	147024707	147943187
NM_002024.5(FMR1):c.1572C>T (p.Ser524=)	Não especificado/Historico dedistúrbio do neurodesenvolvimento	Benigna/Provável benigna	147026489	147944969
NM_002024.5(FMR1):c.1580G>A (p.Arg527His)	Inborn genetic diseases	Significado incerto	147026497	147944977
NM_002024.5(FMR1):c.1654+10T>A	Não comprovado	Significado incerto	147026581	147945061
NM_002024.5(FMR1):c.1663G>A (p.Asp555Asn)	Histórico de distúrbio do neurodesenvolvimento	Significado incerto	147027062	147945542

(continuação)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
NM_002024.5(FMR1):c.1726G>A (p.Gly576Arg)	Não especificado	Significado incerto	147027125	147945605
NM_002024.5(FMR1):c.1737+8C>A	Não especificado	Provável benigna	147027144	147945624
NM_002024.5(FMR1):c.1751G>A (p.Cys584Tyr)	Não comprovado	Significado incerto	147030216	147948696
NM_002024.5(FMR1):c.1857C>T (p.Asp619=)	Não especificado/Histórico de distúrbio do neurodesenvolvimento	Benigna/ Provável benigna	147030322	147948802
GRCh37/hg19 Xq27.1-28	Não comprovado	Patogênica	139504958 - 155254881	.
GRCh37/hg19 Xq27.1-28	Não comprovado	Patogênica	138750575 - 155246749	.
GRCh37/hg19 Xq13.2-28	Não comprovado	Patogênica	73472626 - 155254881	.
GRCh37/hg19 Xq11.1-28	Não comprovado	Patogênica	61694576 - 155254881	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	Não comprovado	Patogênica	181779 - 155171702	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	Não comprovado	Patogênica	60814 - 155254881	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	Não comprovado	Patogênica	60814 - 155236712	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	Não comprovado	Patogênica	60262 - 155245765	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	Não comprovado	Patogênica	60262 - 155245765	.
GRCh37/hg19 Xq27.3	Não comprovado	Significado incerto	146726429 - 147028536	.
GRCh37/hg19 Xq27.2-28	Não comprovado	Patogênica	140388077 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq27.1-28	Não comprovado	Patogênica	139504488 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq27.1-28	Não comprovado	Patogênica	138331745 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq25-28	Não comprovado	Patogênica	125733292 - 155233846	.
GRCh37/hg19 Xq22.3-28	Não comprovado	Patogênica	107823442 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq22.1-28	Não comprovado	Patogênica	99324651 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq21.31-28	Não comprovado	Patogênica	91140025 - 155233731	.
NC_000023.11:g.(?_1)_(156040895_?)du p	Transtorno autista de início na infância/Esquizofrenia	Patogênica		1 - 156040895
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168547 - 155233731	.

(continuação)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
GRCh37/hg19 Xq27.3	.	Significado incerto	146683917 - 147028535	.
GRCh37/hg19 Xq27.3-28	.	Patogênica	146232592 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq23-28	.	Patogênica	112474054 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp21.2-q28	.	Patogênica	31088082 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp1.21-q28	.	Patogênica	56457791 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq26.3-28	.	Patogênica	133944147 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq21.1-28	.	Patogênica	78230501 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq21.33-28	.	Significado incerto	96499476 - 151870013	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168547 - 151304063	.
GRCh37/hg19 Xq22.1-28	.	Patogênica	98495811 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp1.21-q28	.	Patogênica	57415659 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp1.21-q28	.	Patogênica	55000501 - 155230750	.
GRCh37/hg19 Xq21.31-28	.	Patogênica	86900388 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp1.21-q28	.	Patogênica	57511767 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq24-28	.	Patogênica	116621104 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq21.1-28	.	Patogênica	79862302 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155196888	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	553069 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155081533	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 154930047	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168566 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq25-28	.	Patogênica	126773628 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq13.3-28	.	Patogênica	74787886 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp1.1-q28	.	Patogênica	58140271 - 155046703	.

(continuação)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	2703632 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq13.1-28	.	Patogênica	68701338 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xq26.3-28	.	Patogênica	134114063 - 155233731	.
GRCh37/hg19 Xp11.21-q28	.	Patogênica	55532799 - 150239235	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155246585	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155255792	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155255792	.
GRCh37/hg19 Xq21.33-28	.	Patogênica	94043221 - 155246585	.
GRCh37/hg19 Xq22.3-28	.	Patogênica	105694656 - 155224707	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155246225	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	318707 - 155224707	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	71267 - 155255792	.
NC_000023.10:g.(?_147030199)_ 357_?del	Deficiência intelectual	Patogênica	147030199 - 147046357	.
GRCh37/hg19 Xq27.3-28	.	Significado incerto	146977059 - 147106579	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	71267 - 155246643	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155246271	.
GRCh37/hg19 Xq11.1-28	.	Patogênica	62063537 - 155246643	.
GRCh37/hg19 Xp22.2-q28	.	Patogênica	13147668 - 155250222	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	176426 - 155236656	.
GRCh37/hg19 Xq27.3-28	.	Patogênica	142174780 - 155250222	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	225816 - 155234036	.
GRCh37/hg19 Xq25-28	.	Patogênica	121022022 - 155211482	.
GRCh37/hg19 Xq11.1-28	.	Patogênica	62063537 - 155250222	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	71267 - 155224766	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	71267 - 155255839	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	2707626 - 155250222	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	150002 - 155234036	.

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	176426 - 155250222	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	150002 - 155234036	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	71267 - 155234036	.
GRCh37/hg19 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155255839	.
GRCh37/hg19 Xq27.1-28	.	Patogênica	138125974 - 147236414	.
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	76102 - 155226096	26102 - 155996431
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	64245 - 155228958	14245 - 155999293
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	76102 - 155226096	26102 - 155996431
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60679 - 155242832	10679 - 156013167
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60679 - 155251871	10679 - 156022206
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60679 - 155251871	10679 - 156022206
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155233731	251879 - 156004066
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168546 - 155233731	251879 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq13.2-28	.	Patogênica	73904450 - 155233731	74684615 - 156004066
GRCh38/hg38 Xp11.22-q28	.	Patogênica	53321095 - 155232907	53144751 - 156003242
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168547 - 155233731	251880 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq13.3-28	.	Patogênica	75777833 - 155233731	76557425 - 156004066
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155232894	10701 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq23-28	.	Patogênica	110293613 - 155251871	111050385 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	77442685 - 155233731	78187188 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq22.3-28	.	Patogênica	105965526 - 155233731	106722296 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq24-28	.	Patogênica	117990537 - 155233731	118855574 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq21.2-28	.	Patogênica	85881434 - 155233731	86626431 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq21.31-28	.	Patogênica	88812621 - 155233731	89557622 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	81352168 - 155233731	82096719 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq24-28	.	Patogênica	118431633 - 155233731	119297670 - 156004066
GRCh38/hg38 Xq27.2-28	.	Patogênica	141689794 - 147944759	142602008 - 149482800

(continuação)

(continuação)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155246585	20297 - 156016920
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	2217264 - 155221853	2299223 - 155992188
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Dados conflitantes	168547 - 155233731	251880 - 156004066
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168547 - 155233731	251880 - 156004066
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	168547 - 155233846	251880 - 156004181
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	138613087 - 155232894	139530928 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq1.1-28	.	Patogênica	61931689 - 155232907	62712219 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	81466759 - 155232894	82211310 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq21.31-28	.	Patogênica	87594927 - 155232907	88339926 - 156003242
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	1118268 - 154929305	1085618 - 155699644
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	79166568 - 155232894	79911061 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq27.3-28	.	Patogênica	142641674 - 155232894	143553831 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq22.3-28	.	Patogênica	105708840 - 155232907	106466510 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq21.33-28	.	Patogênica	95101284 - 155232907	95846285 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq22.3-28	.	Patogênica	105371166 - 155232907	106127173 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq11.1-28	.	Patogênica	61781074 - 155232907	62561604 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq22.1-28	.	Patogênica	101452257 - 155232907	102197284 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq26.3-28	.	Patogênica	136201142 - 155232907	137118983 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq25-28	.	Patogênica	122927376 - 155251871	123793526 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq13.3-28	.	Patogênica	75824420 - 155251871	76604011 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq13.3-28	.	Patogênica	74306252 - 155251871	75086417 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq27.2-28	.	Patogênica	140738414 - 155251871	141650284 - 156022206
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	2700316 - 154785891	2782275 - 155611794
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	2683677 - 154751965	2765636 - 155522304
GRCh38/hg38 Xq21.33-28	.	Patogênica	93717928 - 155231300	94462929 - 156001635
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	90904 - 155227831	40904 - 155998166
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155232894	10701 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq25-28	.	Patogênica	127607213 - 155232894	128473235 - 156003229

(continuação)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	78348649 - 155232894	79093152 - 156003229
GRCh38/hg38 Xq23-28	.	Patogênica	110988950 - 153783638	111745722 - 154555423
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60001 - 155260560	10001 - 156030895
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	139865555 - 154785891	140783390 - 155611114
GRCh38/hg38 Xp21.1-q28	.	Patogênica	36255823 - 155251871	36237706 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	76634813 - 155242832	77369933 - 156013167
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155255792	20297 - 156026127
GRCh38/hg38 Xq21.31-28	.	Patogênica	91477679 - 155246585	92222680 - 156016920
GRCh38/hg38 Xp21.1-q28	.	Patogênica	37094357 - 155246585	37076284 - 156016920
GRCh38/hg38 Xq13.2-28	.	Patogênica	73729951 - 155251871	74510116 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq23-28	.	Patogênica	113767592 - 155251871	114533139 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	77860506 - 155246225	78605009 - 156016560
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70297 - 155228918	20297 - 155999253
GRCh38/hg38 Xq11.1-28	.	Patogênica	61931700 - 155208553	62712230 - 155978888
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155232907	10701 - 156003242
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155232907	10701 - 156003242
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	138415183 - 155208354	139333024 - 155978689
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60701 - 155208354	10701 - 155978689
GRCh38/hg38 Xq21.1-28	.	Patogênica	84378746 - 155251871	85123740 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq27.3-28	.	Patogênica	146715565 - 154664396	144627217 - 155434735
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60679 - 155252491	10679 - 156022826
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	140254480 - 154929279	141160282 - 155699618
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	139527393 - 153832724	140445228 - 154604471
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	139308651 - 154917042	140226495 - 155687381
GRCh38/hg38 Xq25-28	.	Patogênica	122865222 - 154917042	123731372 - 155687381
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	2708886 - 154929279	2790845 - 155699618
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	90704 - 155252027	40704 - 156022362
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	77245 - 155226096	27245 - 155996431



(conclusão)

<b>Variante</b>	<b>Condição</b>	<b>Significado Clínico</b>	<b>Posição Genômica (GRCh37)</b>	<b>Posição Genômica (GRCh38)</b>
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	76101 - 155228958	26101 - 155999293
GRCh38/hg38 Xq27.3-28	.	Patogênica	2676387 - 5744560	147151996 - 150364798
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	139504994 - 147005548	140422829 - 148166315
GRCh38/hg38 Xq27.1-28	.	Patogênica	138312495 - 149782550	139230333 - 150628474
GRCh38/hg38 Xq26.3-28	.	Patogênica	136038659 - 155250658	136956500 - 156020993
GRCh38/hg38 Xq25-28	.	Patogênica	125671844 - 155226096	126537861 - 155996431
GRCh38/hg38 Xq23-28	.	Patogênica	115396069 - 155210240	116264813 - 155980575
GRCh38/hg38 Xq22.1-28	.	Patogênica	99779559 - 154785891	100524562 - 155669954
GRCh38/hg38 Xq11.1-28	.	Patogênica	62499671 - 155169188	63279794 - 155939524
GRCh38/hg38 Xp11.21-q28	.	Patogênica	57399017 - 155226096	57372584 - 155996431
GRCh38/hg38 Xq27.3	.	Patogênica	3458159 - 3475397	147933767 - 147951004
GRCh38/hg38 Xq23-28	.	Patogênica	114652461 - 155251871	115417992 - 156022206
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	3010527 - 154929279	3092486 - 155699618
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70140 - 154929279	20140 - 155699618
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	70140 - 154929279	20140 - 155699618
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60679 - 155251871	10679 - 156022206
GRCh38/hg38 Xp22.33-q28	.	Patogênica	60679 - 155251871	10679 - 156022206
GRCh38/hg38 Xq27.3-28	.	Patogênica	2420679 - 5145543	146896288 - 149621145

## APÊNDICE C - Variantes pontuais previamente identificadas no gene *FMR1* de indivíduos com atraso no desenvolvimento e/ou deficiência intelectual

Variante: corresponde à variante genética encontrada; Impacto da variante: tipo de variante e seu efeito na constituição química do gene; Efeito na proteína: alteração nos aminoácidos da proteína FMRP; Região do gene: corresponde à região do gene *FMR1* que a variante atinge (por exemplo, Promotor, introns, éxons, 3'UTR); Posição genômica: *locus* da variante; Cód. RefSeq Transcrito: código RefSeq do transcrito de *FMR1*; Fenótipo: condição/características observadas no indivíduo que carrega a variante genética reportada; Significado clínico: significado clínico geral de uma variante com base em dados obtidos nos artigos e no ClinVar; Referência: refere-se a lista individual de todos os trabalhos consultados.

(continua)

Variante	Impacto da variante	Efeito na proteína	Região do gene	Posição genômica <sup>1</sup>	Cód. RefSeq Transcrito	Fenótipo	Significado clínico	Referência
c.-413C>G	Não codificante	-	Promotor	chrX:147,911,767	NIM_002024	Deficiência intelectual	VSI	GRASSO <i>et al.</i> , 2010; MILA <i>et al.</i> , 2000
c.-332G>C	Não codificante	-	Promotor	chrX:147,911,848	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.-293T>C	Não codificante	-	Promotor	chrX:147,911,887	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.-254A>G	Não codificante	-	Promotor	chrX:147,911,926	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.18G>T	Sinônima	p.Val6=	éxon 1	chrX:147,912,197	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	Benigna	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.105-8A>C	Não codificante	-	Intron 2	chrX:147,925,532	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.377T>C <sup>2</sup>	Não sinônima	p.Phe126Ser	éxon 5	chrX:147,928,765	NIM_002024	Transornos de desenvolvimento	Provável patogênica	WRIGHT <i>et al.</i> , 2015
c.413G>A	Não sinônima	p.Arg138Gln	éxon 5	chrX:147,928,801	NIM_002024	Deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento e convulsões	Provável patogênica	COLLINS <i>et al.</i> , 2010; MYRICK <i>et al.</i> , 2015
c.630+438A>C	Não codificante	-	Intron 7	chrX:147,930,682	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.631-840G>A	Não codificante	-	Intron 7	chrX:147,931,585	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010

VSI, variante de significado incerto

<sup>1</sup> Baseado no genoma de referência GRCh38

<sup>2</sup> Achados genéticos reportados por QUARTIER *et al.*, 2017.

Variante	Impacto da variante	Efeito na proteína	Região do gene	Posição genômica <sup>1</sup>	Isoforma	Fenótipo	Significado clínico	Referência
c.677G>A	Não sinônima	p.Arg226Lys	éxon 8	chrX:147,932,471	NM_001185082; NM_001185076	Deficiência intelectual moderada a grave	Provável patogênica	GROZEVA <i>et al.</i> , 2015
c.767A>G	Não sinônima	p.Asp256Gln	éxon 8	chrX:147,932,561	NM_001185082; NM_001185076	Deficiência intelectual moderada a grave	Benigna	GROZEVA <i>et al.</i> , 2015
c.880+885A>G	Não codificante	-	Intron 9	chrX:147,933,648	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.990+4T>C	Não codificante	-	Intron 10	chrX:147,936,617	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.1189-39A>G	Não codificante	-	Intron 12	chrX:147,940,537	NM_002024	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento	Não patogênica	HANDT <i>et al.</i> , 2014
c.1168G>A	Não sinônima	p.Ala390Trp	éxon 12	chrX:147,940,618	NM_001185082; NM_001185076	Deficiência intelectual moderada a grave	Benigna	GROZEVA <i>et al.</i> , 2015
c.1325G>A <sup>2</sup>	Não sinônima	p.Arg442Gln	éxon 14	chrX:147,943,180	NM_002024	Transtornos de desenvolvimento	VSI	WRIGHT <i>et al.</i> , 2015
c.1444G>A	Não sinônima	p.Gly482Ser	éxon 14	chrX:147,943,299	NM_002024	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento	VSI	HANDT <i>et al.</i> , 2014
c.1472-521C>G	Não codificante	-	Intron 14	chrX:147,944,348	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.1601G>A	Não sinônima	p.Arg534His	éxon 15	chrX:147,944,998	NM_002024	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento	VSI	HANDT <i>et al.</i> , 2014
c.1618G>A	Não sinônima	p.Gly540Glu	éxon 15	chrX:147,945,015	NM_002024	Deficiência intelectual ligada ao X	VSI	HU <i>et al.</i> , 2016

VSI, variante de significado incerto

<sup>1</sup> Baseado no genoma de referência (GRCh38)

<sup>2</sup> Achados genéticos reportados por QUARTIER *et al.*, 2017.

(continuação)

(conclusão)

Variante	Impacto da variante	Efeito na proteína	Região do gene	Posição genômica <sup>1</sup>	Isoforma	Fenótipo	Significado clínico	Referência
c.1301C>T	Não sinônima	p.Ala434Val	éxon 14	chrX:147,945,032	NM_001185075; NM_001185081	Deficiência intelectual moderada a grave	Benigna	GROZVA <i>et al.</i> , 2015
c.1586C>T	Não sinônima	p.Tre529Ile	éxon 16	chrX:147,948,802	NM_001185075; NM_001185081	Deficiência intelectual moderada a grave	Provável patogênica	GROZVA <i>et al.</i> , 2015
c.1610C>T	Não sinônima	p.Ser537Leu	éxon 16	chrX:147,948,826	NM_001185075; NM_001185081	Deficiência intelectual moderada a grave	Provável patogênica	GROZVA <i>et al.</i> , 2015
c.*23T>C	Não codificante	-	3'UTR	chrX:147,948,867	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.*60G > C	Não codificante	-	3'UTR	chrX:147,948,904	NM_002024	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento	Não patogênica	HANDT <i>et al.</i> , 2014
c.*746T>C	Não codificante	-	3'UTR	chrX:147,948,912	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010; SUHL <i>et al.</i> , 2015
c.*68T > C	Não codificante	-	3'UTR	chrX:147,948,912	NM_002024	Deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento	Não patogênica	HANDT <i>et al.</i> , 2014
c.*1867G>A	Não codificante	-	3'UTR	chrX:147,950,711	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010
c.*2035C>T	Não codificante	-	3'UTR	chrX:147,950,879	NM_002024	Atraso no desenvolvimento	VSI	COLLINS <i>et al.</i> , 2010

VSI, variante de significado incerto

<sup>1</sup> Baseado no genoma de referência (GRCh38).

## APÊNDICE D – Variantes pontuais previamente identificadas no gene *FMR1* de indivíduos com fenótipo típico de SXF

Variante: corresponde à variante genética encontrada; Impacto da variante: tipo de variante e seu efeito na constituição química do gene; Efeito na proteína: alteração nos aminoácidos da proteína FMRP; Região do gene: corresponde à região do gene *FMR1* que a variante atinge (por exemplo, Promotor, Introns, éxons, 3'UTR); Posição genômica: locus da variante; Cód. RefSeq Transcrito: código RefSeq do transcrito de *FMR1*; Fenótipo: condição/ características observadas no indivíduo que carrega a variante genética reportada; Significado clínico: significado clínico geral de uma variantes com base em dados obtidos nos artigos e no ClinVar; Referência: refere-se a lista individual de todos os trabalhos consultados.

(continua)

Variante	Impacto da variante	Efeito na proteína	Região do gene	Posição genômica <sup>1</sup>	Isoforma	Fenótipo	Significado clínico	Referência
c.52-1_52del insTA <sup>2</sup>	Stopgain	p.(?)	éxon 2	chrX:147,921,932-147,921,933	NM_002024	Características dismórficas, face alongada, testa e orelhas proeminentes, macroorquidial, hiperextensibilidade das articulações, características autistas e atraso no desenvolvimento.	Patogênica	LUGENBEEL <i>et al.</i> , 1995
c.80C>A	Stopgain	p.Ser27*	éxon 2	chrX:147,921,961	NM_002024	Deficiência intelectual, dismorfismo facial, macroorquidismo, epilepsia, características autistas e pouco uso de linguagem	Patogênica	GRONSKOV <i>et al.</i> , 2011
c.373delA <sup>2</sup>	Frameshift, stop códon	p.Thr125L eufs*35	éxon 5	chrX:147,928,761	NM_002024	Características dismórficas, face alongada, testa e orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das junções, características autistas, TDAH, atraso no desenvolvimento e comprometimento da linguagem.	Patogênica	LUGENBEEL <i>et al.</i> , 1995
c.413G>A	Não sinônima	p.Arg138 Gln	éxon 5	chrX:147,928,801	NM_002024	Atraso no desenvolvimento, comportamento autista, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, convulsões, hábito de agitar as mãos, rosto alongado, orelhas grandes, mãos macias, dedos hiperextensíveis e pés planos.	Provável patogênica	SITZMANN <i>et al.</i> , 2018
c.420-8A>G	Frameshift, stop códon (variante de splicing)	p.Met140Ileufs*3	éxon 6	chrX:147,929,940	NM_002024	Atraso na linguagem, rosto alongado, estereotípias e características de comportamento repetitivo, com agitação das mãos e ansiedade.	Patogênica	QUARTIER <i>et al.</i> , 2017

<sup>1</sup> Baseado no genoma de referência (GRCh38)

<sup>2</sup> Achados genéticos reportados por QUARTIER *et al.*, 2017.

Variante	Impacto da variante	Efeito na proteína	Região do gene	Posição genômica <sup>1</sup>	Isoforma	Fenótipo	Significado clínico	Referência
c.797G>A	Não sinônima	p.Gly266 Glu	éxon 8	chrX:147,932,591	NIM_002024	Atraso no desenvolvimento, juntamente com múltiplos outros comportamentos e características físicas comumente associadas a SXF.	Provável patogênica	MYRICK <i>et al.</i> , 2014
c.911T>A <sup>2</sup>	Não sinônima	p.Ile304Asn	éxon 10	chrX:147,936,534	NIM_002024	atraso no desenvolvimento, face alongada, orelhas grandes, mandíbula proeminente e macroorquidismo.	Provável patogênica	DE BOULLE <i>et al.</i> , 1993
c.990+1G>A	Frameshift, stop códon (variante de splicing)	p.Lys295A snfs*11	éxon 10	chrX:147,936,614	NIM_002024	Habilidades motoras e de comunicação atrasadas. Características de comportamento repetitivo, assim como agitar as mãos e evitar contato físico. Testa alta, rosto grosseiro, boca larga, orelhas de tamanho normal mas formato anormal. Traços autistas.	Patogênica	QUARTIER <i>et al.</i> , 2017
c.1637G>A	Não sinônima	p.Arg546 His	éxon 15	chrX:147,945,034	NIM_002024	Deficiência intelectual, face alongada, mandíbula proeminente e testa grande.	Patogênica	QUARTIER <i>et al.</i> , 2017; WANG <i>et al.</i> , 1997
c.1457insG	Frameshift, stop códon	p.Gly538fs*23	éxon 15	chrX:147,945,607	NIM_001185_075	Características físicas e comportamentais típicas de SXF e deficiência intelectual moderada a grave.	Patogênica	OKRAY <i>et al.</i> , 2015

(conclusão)

<sup>1</sup> Baseado no genoma de referência (GRCh38).

**APÊNDICE E – Relação de características observadas em 167 indivíduos positivos para SXF (portadores de mutação completa) utilizados para construção de um checklist.**

ID	Características																Sexo			
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia		Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P01	X	X	X	X		X	X	X		X								X		M
P02	X	X	X	X	X	X			X	X			X			ND	ND	X		M
P03		X					X			X			X		ND	ND			X	M
P04	X	X	X	X	X			X			X							X		M
P05	X		X			X			X	X								X		M
P06	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X					X		M
P07	X	X	X			X		X	X	X	X		X			ND		X		M
P08	X	X	X				X	X	X	X	X							X		F
P09			X		X		X						X	X	X					M
P10	X		X										X	X	X					M
P11		X	X			X	X		X	X					ND			X	X	M
P12	X	X	X	X	X				X	X				X						M
P13	X		X	X	X				X	X			X							M
P14	X		X						X	X				X	ND	ND		X		M
P15	X		X						X	X	X		X	ND	ND	ND		X		M
P16	X	X				X				X				ND	ND	ND				F
P17	X	X	X			X		X				X		ND	ND	ND	X			M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continua)

ID	Características															Sexo						
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce		Histórico familiar de ataxia	Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos		
P18	X		X					X	X				X		X		X		X		M	
P19		X				X		X					X		ND		ND	X		X		M
P20	X							X		X				X		X		X		X		M
P21	X	X	X			X			X	X	X	X	X	X	X			X		X		M
P22	X		X			X			X	X				X				X		X		M
P23	X		X					X			X		X	X				X		X		M
P24	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			X	X	X		M
P25			X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X			X	X	X		M
P26			X						X	X			X	X	X			X		X		M
P27	X	X	X					X		X				X				X		X		M
P28	X		X	X	X	X	X		X				X		X			X		X		M
P29	X	X	X	X	X		X		X		X		X					X	X	X		M
P30	X		X	X	X		X	X	X			X	X	X				X		X		M
P31	X	X	X	X	X		X	X	X		X		X		X			X	X	X		M
P32		X	X	X				X	X				X					X		X		M
P33	X		X		X			X	X		X		X		X			X		X		M
P34	X	X	X	X				X	X		X		X		X			X	X	X		M
P35	X	X	X	X				X	X		X		X		X			X	X	X		M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)



ID	Características														Sexo					
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI		Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia	Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P36	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	M
P37	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	M
P38	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	ND	ND	X	ND		M
P39	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		M
P40		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	ND	ND	ND	X	ND	X	M
P41	X	X	X	X	X		X	X	X		X		X				X	X		M
P42	X	X	X	X	X		X		X					X			X	X		M
P43	X	X	X	X				X	X					X	ND	ND				M
P44	X		X	X					X	X	X	X		ND	ND	ND	X			M
P45			X			X	X	X	X	X			X	ND	ND	ND	X			M
P46	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	ND	ND	ND	X		X	M
P47		X	X	X					X	X	X	X	X	ND	ND	ND	X			F
P48		X					X		X		X		X	ND	ND	ND				M
P49		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X				X			M
P50	X													ND	ND					M
P51		X	X				X	X		X	X	X	X				X		X	M
P52	X	X	X				X	X	X		X	X	X	ND	ND	ND	X			M
P53	X	X	X				X		X	X	X	X	X	ND	ND	ND	X			M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características																Sexo			
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia		Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P54	X				X		X		X	X	X	X	X	X	ND	ND				M
P55		X									X									M
P56	X			X	X		X	X		X			X	X	X			X		M
P57		X	X				X								ND	ND				M
P58	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	ND	ND				M
P59	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	ND	ND			X	M
P60			X			X	X	X	X	X				X	ND	ND				F
P61	X	X	X			X	X		X		X	X	X	ND	ND				X	M
P62	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X				M
P63	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						M
P64	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X						M
P65									X		X	X	X	ND	ND					M
P66	X								X		X	X	X	ND	ND					M
P67			X			X	X	X	X		X	X	X	ND	ND					M
P68	X	X	X				X				X	X	X	X						M
P69	X	X	X	X			X	X			X	X	X							M
P70	X			X	X			X		X	X	X	X						X	M
P71									X		X	X	X	ND	ND					M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características																Sexo			
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia		Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P72	X		X					X	X		X		X	ND	ND	X	X			M
P73																X				M
P74	X	X	X	X	X		X				X					X	X	X		M
P78	X		X	X	X		X	X		X		X	X							M
P79	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	ND	ND	ND	X		X	M
P77		X					X							ND	ND	ND	X	X		M
P78	X		X	X	X		X	X	X		X	X		X	X					M
P79	X	X	X				X	X	X	X		X	X	ND	ND	ND			X	M
P80	X	X	X				X	X	X		X	X		ND	ND	ND			X	M
P81	X		X	X			X	X						ND	ND	ND	X			M
P82	X	X	X	X	X		X	X			X	X		ND	ND	ND	X			M
P83	X	X	X				X	X			X	X		ND	ND	ND	X			M
P84	X	X	X				X		X					ND	ND	ND	X		X	M
P85	X	X	X				X	X	X					ND	ND	ND	X		X	M
P86		X	X				X		X	X				ND	ND	ND	X			M
P87	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	ND	ND	ND	X	X	X	M
P88											X			ND	ND	ND				M
P89	X		X		X	X		X									X			M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características														Sexo						
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI		Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia	Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos	
P90			X		X																M
P91	X					X	X		X	X		X	X	ND	ND	ND	X	X		X	M
P92	X							X						ND	ND	ND					M
P93	X	X	X					X	X					ND	ND	ND	X				M
P94	X	X	X								X	X		ND	ND	ND	X			X	M
P95			X						X			X	X	ND	ND	ND	X			X	M
P96	X	X	X			X	X	X	X	X											M
P97	X	X	X					X	X				X						X		M
P98			X						X			X	X								M
P99		X	X	X		X	X						X	X							M
P100			X				X				X								X		M
P101		X	X						X		X										M
P102	X		X																		M
P103			X						X	X											M
P104	X	X	X						X	X		X	X							X	M
P105	X	X	X								X	X									M
P106	X	X	X						X	X		X									M
P107		X	X					X	X		X										M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características																Sexo			
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia		Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P108	X		X	X	X	X	X			X				X	X	X	X		X	M
P109	X		X	X	X		X	X						X	X	X	X		X	M
P110		X	X							X	X						X		X	M
P111	X	X	X					X	X	X	X		X				X	X	X	M
P112	X	X	X	X			X		X		X	X	X	X			X	X	X	M
P113	X	X	X				X		X		X	X					X		X	M
P114	X	X	X	X	X				X					X	X				X	M
P115	X	X	X				X						X				X			M
P116	X		X							X			X				X			M
P117	X	X	X					X	X		X	X	X	X	ND	ND	X		X	M
P118	X	X	X						X		X	X	X	X	ND	ND	X	X	X	M
P119	X		X									X	X	ND	ND	ND	X		X	M
P120	X	X	X				X		X			X	X	ND	ND	ND	X		X	M
P121	X	X	X				X		X		X							X		M
P122	X	X	X					X	X		X			ND	ND	ND	X			M
P123	X			X			X	X					X	ND	ND	ND	X	X		M
P124		X	X				X	X	X		X			ND	ND	ND	X			M
P125	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características																Sexo			
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia		Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P126	X	X	X			X	X	X			X			X	ND	ND	X		X	M
P127	X		X			X	X	X	X		X			X	ND	ND	X			M
P128	X		X	X		X					X			X			X			F
P129		X	X						X		X			X	ND	ND	X			M
P130									X					X	ND	ND				F
P131		X	X							X			X	ND	ND	ND				M
P132			X						X				X	ND	ND	ND			X	M
P133	X	X	X						X				X	ND	ND	ND			X	M
P134		X							X		X							X		M
P135	X	X	X							X			X	ND	ND	ND				M
P136	X								X				X	ND	ND	ND			X	M
P137			X								X			ND	ND	ND				M
P138	X	X	X											ND	ND	ND			X	M
P139									X		X			ND	ND	ND				M
P140	X		X	X			X		X		X		X	ND	ND	ND		X		M
P141	X	X	X						X		X		X	ND	ND	ND				M
P142	X		X	X					X		X			X					X	M
P143	X	X	X						X		X			ND	ND	ND				M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características														Sexo					
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI		Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia	Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos
P144	X	X	X								X			X	ND	ND				M
P145	X										X		X		ND	ND				M
P146	X	X	X									X					X			M
P147				X							X					*				M
P148		X									X				ND	ND			X	M
P149		X	X								X		X		ND	ND		X		M
P150	X	X	X			X			X	X				X	ND	ND			X	F
P151	X	X	X												ND	ND				M
P152															ND	ND			X	M
P153	X	X	X						X	X				X	ND	ND		X		M
P154		X	X			X			X	X				X	ND	ND		X		M
P155		X	X												ND	ND			X	M
P156	X	X	X	X	X						X						X			M
P157	X	X	X						X	X					ND	ND		X		M
P158	X	X		X		X			X	X							X			M
P159	X		X			X			X	X				X	ND	ND			X	M
P160	X	X	X			X					X				ND	ND				M
P161	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	M

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(continuação)

ID	Características																Sexo				
	DI ou dificuldades no aprendizado	Hiperatividade	Déficit de Atenção	Demorou para falar	Demorou para engatinhar/caminhar	Defensivo tatilmente	Estereotipias (movimentos intencionais repetitivos)	Comportamento agressivo em situações de estimulação	Pobre contato visual	Fala perseverante	Hiperextensibilidade	Face alongada, mandíbula proeminente e/ou orelhas grandes	Testículos grandes	Histórico familiar de DI	Histórico familiar de menopausa precoce	Histórico familiar de ataxia		Ansiedade	Diagnóstico de autismo	Calosidade nas mãos	
P162	X			X		X			X	X	X			X	X						M
P163		X	X			X		X	X	X	X			ND	ND		X		X	M	
P164	X	X	X	X			X		X		X									M	
P165	X	X	X						X		X	X		ND	ND		X			M	
P166	X	X	X			X			X	X		X		ND	ND		X		X	M	
P167			X			X	X		X					ND	ND		X			M	

ID, identificação do indivíduo participante, onde P refere-se ao código utilizado para identificar os indivíduos positivos para SXF (P=paciente positivo); ND, Informação não disponível; M, sexo masculino; F, sexo feminino.

(conclusão)



### APÊNDICE F – Relação de primers utilizados para amplificação dos éxons do gene *FMRI*

ID: identificação do indivíduo participante; Primer ID: nomenclatura padrão utilizada para cada par de primer, entre parênteses está descrito os éxons do gene *FMRX* amplificados por cada par de primer. Os quadros marcados com X representam os éxons amplificados (conclusivos) e os quadros em branco representam os éxons não amplificados (inconclusivos).

Primer ID	P1 (1)	P2 (2)	P3 (3)	P4 (4 e 5)	P5 (6 e 7)	P6 (8 e 9)	P7 (10)	P8 (11 e 12)	P9 (13)	P10 (14)	P11 (15 e 16)	P12 (17)	P13 (17)	P14 (17)	P15 (17)
PN02		X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
PN04			X		X		X		X	X	X	X	X	X	X
PN08			X	X	X				X	X				X	X
PN09		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
PN11		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PN13					X			X	X	X				X	X
PN20		X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X
PN21			X	X	X		X		X						X
PN28		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
PN31		X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
PN34		X	X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X
PN38		X	X	X	X	X	X		X	X	X		X	X	
PN39		X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X
PN40		X	X	X	X	X	X		X					X	
PN41		X	X	X	X		X		X	X		X	X	X	X
PN42		X				X	X		X	X		X	X	X	X
PN44		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
PN45		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
PN51		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
PN53		X	X	X	X		X		X	X		X	X	X	X

## **APÊNDICE G - Financiamentos e colaborações desta pesquisa**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Além deste apoio financeiro, a pesquisa também contou com colaboração das seguintes instituições:

Laboratório Experimental Multiusuários (LEM) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), que forneceu infraestrutura para a realização de experimentos de extração de DNA e análise de dados.

Instituto Lico Kaesemodel (Curitiba, Paraná), que auxiliou diretamente na obtenção de informações e no contato com participantes da pesquisa.

Laboratório de Células Tronco da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD, USA), que realizou os experimentos de PCR e sequenciamento genético e contribui em duas publicações científicas.

Laboratório de Neurociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que contribui na elaboração do artigo "*Non-CGG repeat expansion as disease-causing mutations in Fragile X syndrome*".

**ANEXO A – Parecer do CEP: Aprovação conforme parecer nº 2.199.666**



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE  
DE CULTURA - PUCPR



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Identificação de variantes genéticas raras em síndrome do X frágil para melhoria dos diagnósticos tradicionais da síndrome.

**Pesquisador:** Roberto Hirochi Herai

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 2

**CAAE:** 69389617.3.0000.0020

**Instituição Proponente:** Associação Paranaense de Cultura - PUCPR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.199.666

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa em parceria com o ILK, na forma de uma colaboração científica, fornecerá acesso ao prontuário de cadastro de famílias, e posteriormente auxiliará diretamente no contato direto aos participantes da pesquisa selecionados, exclusivamente para coleta de amostras de saliva. A determinação dos participantes da pesquisa se dará somente após análise dos registros das famílias que estão no ILK, que se dará início somente após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/PUCPR). Todos os participantes e/ou seus respectivos responsáveis legais serão informados a respeito da pesquisa, verbalmente e por escrito, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participantes com pelo menos 18 anos de idade completados e incapazes de responder por seus atos. Para os participantes menores de 18 anos, também será elaborado um TCLE de acordo com sua faixa etária. Com relação ao material biológico coletado (saliva) dos participantes da pesquisa, o mesmo será coletado em tubos de fácil manuseio (ver detalhes abaixo), mantido e processado no Laboratório Experimental Multiusuários (LEM) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) (autorização em documento separado). Os os participantes selecionados serão reavaliados com base em um questionário consolidado para avaliação de pacientes com SXF, conhecido como Checklist do X Frágil (do inglês Fragile X

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155

**Bairro:** Prado Velho

**CEP:** 80.215-901

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3271-2103

**Fax:** (41)3271-2103

**E-mail:** nep@pucpr.br



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE  
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 2.199.666

Checklist).

**Objetivo da Pesquisa:**

Detectar e estudar mutações raras no gene FMR1 que possam também causar a Síndrome do X Frágil, possibilitando identificar novas variantes genéticas causais para que sejam utilizados como biomarcadores de diagnóstico para a síndrome.

Realizar uma revisão sistemática da literatura, incluindo bancos de dados genéticos, para identificar todos os tipos de variantes genéticas que já foram reportadas para a síndrome do X frágil;

Investigar o locus do gene FMR1 em amostras de saliva de pacientes sem mutações típicas de expansão de CGG no gene FMR1, e que tenham sido clinicamente diagnosticados (apresentam sintomas peculiares para a síndrome) com SXF;

Analisar por métodos de bioinformática o impacto das variantes encontradas na função da proteína FMRP;

d) Incorporar os dados obtidos no estudo em uma base de dados com acesso público para que laboratórios possam fazer uso das informações para testes genéticos futuros, e também para aqueles casos previamente diagnosticados com SXF mas que não apresentaram expansão típica do tipo CGG no gene FMR1.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos previstos e preservados. Benefícios previstos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante com objetivos claros e metodologia adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos de apresentação obrigatória adequados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto atende os requisitos éticos necessários para a sua realização.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155

**Bairro:** Prado Velho

**CEP:** 80.215-901

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3271-2103

**Fax:** (41)3271-2103

**E-mail:** nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 2.199.666

Eventuais modificações ou ementas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_924958.pdf	20/06/2017 20:08:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Carol.docx	20/06/2017 19:26:26	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_assentimento_menores_16anos.docx	20/06/2017 19:26:09	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Participantes_menores_07_naoalfabetizados.docx	20/06/2017 19:25:55	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores18anos_semCondiçoesLerais.docx	20/06/2017 19:25:41	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores18anos.docx	20/06/2017 19:25:25	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_16_18_incompleto.docx	20/06/2017 19:25:06	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_07_16_incompleto.docx	20/06/2017 19:24:51	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
Outros	CartaResposta_CEP.pdf	20/06/2017 19:23:08	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	01/06/2017 13:30:24	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155

**Bairro:** Prado Velho

**CEP:** 80.215-901

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3271-2103

**Fax:** (41)3271-2103

**E-mail:** nep@pucpr.br



Comitê de Ética  
em Pesquisa da  
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE  
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 2.199.666

Declaração de Pesquisadores	TCUD.pdf	31/05/2017 22:13:57	ANA CAROLINA PINTO DA CRUZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ILK_Autorizacao.pdf	30/05/2017 20:09:44	Roberto Hirochi Herai	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 03 de Agosto de 2017

---

**Assinado por:**  
**NAIM AKEL FILHO**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155

**Bairro:** Prado Velho

**CEP:** 80.215-901

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3271-2103

**Fax:** (41)3271-2103

**E-mail:** nep@pucpr.br

**ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido**



## TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **“Identificação de variantes genéticas raras em síndrome do X Frágil para melhoria dos diagnósticos tradicionais da síndrome”** e que tem como objetivo **estudar características físicas, comportamentais e novas mutações raras que possam causar Síndrome do X Frágil**. Acreditamos que ela seja importante porque há casos em que, embora o diagnóstico clínico aponte para Síndrome do X Frágil, o teste genético indica negativo pelo fato de ser baseado em uma única região do gene *FMR1*. Sendo assim, é importante compreender se há outras mutações que podem causar a condição e como diagnosticá-las.

Caso você aceite participar deste estudo, você será convidado a responder um questionário e também fornecer amostras de saliva, que será obtida por meio de um kit de coleta entregue a você e seu responsável, com um manual de instruções claras do procedimento a ser seguido para a coleta do material. O kit é de uso rotineiro em laboratórios do mundo todo, portanto não oferece riscos a sua saúde. Você foi escolhido em participar porque você apresenta diagnóstico clínico para Síndrome do X Frágil, entretanto o teste genético feito para confirmar este diagnóstico apresentou resultado negativo.

Seus direitos serão respeitados e você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. Para participar deste estudo, o seu responsável deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você ou o seu responsável poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido, o pesquisador garante que irá tratar a sua identidade e seus dados com padrões de sigilo.

O material usado para o procedimento de coleta da saliva não é invasivo, portanto, ele não causará nenhum tipo de ferimento, picada, choque ou qualquer sensação de dor, mas é possível que ocorra um certo desconforto e/ou constrangimento no momento da coleta. Caso eu sinta qualquer tipo de desconforto, poderei solicitar o interrompimento da minha participação na presente pesquisa, sem geração de qualquer tipo de prejuízo, e sendo garantindo sigilo absoluto e resguardo de minha integridade e bem estar.

O benefício deste estudo será de auxiliar no entendimento da condição que você possui, além disso, você receberá esclarecimentos sobre a SXF e será encaminhado para realização de tratamento que permitirá minimizar os sintomas que sente.

Os resultados estarão à sua disposição quando a pesquisa for finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados

com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Curitiba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) pesquisador(a)

**ANEXO C – Checklist do X Frágil (do inglês *Fragile X Checklist*) proposto por Hagerman e colaboradores (1991)**

Responder o questionário da Tabela 1, indicando os seguintes valores para suas respostas:

- 0 = característica ausente;
- 1 = característica em nível intermediário (*borderline*) ou presente no passado;
- 2 = característica definitivamente presente.

Tabela 1: Checklist do X Frágil de acordo com Hagerman *et al.*, 1991.

<b>Possui as características abaixo?</b>	<b>Pontuação</b>
Deficiência Intelectual	
Hiperatividade	
Períodos curtos de atenção	
Defensivo tatilmente	
Hábito de agitar as mãos	
Hábito de morder as mãos	
Pobre contato visual	
Fala perseverante	
Hiperextensibilidade das junções	
Orelhas grandes ou proeminentes	
Testículos grandes	
Palma da mão com linhas tipo vinco símio ou linha Sydney	
Histórico familiar de deficiência intelectual	
<b>Pontuação Total</b>	