

**Adriana Helena de Oliveira Reis**

**Frequência da pré-mutação em FMR1 em pacientes com ataxia, tremor e/ou parkinsonismo**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Biotecnologia, Genômica e Bioinformática

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Raquel S. Carvalho

Universidade Federal de Minas Gerais

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

Março - 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho, pela orientação, entusiasmo e pelo aprendizado proporcionado a mim, indispensáveis ao meu crescimento profissional e científico.

À Profa. Dra. Cleusa Graça da Fonseca, pela disponibilidade, sugestões e discussões importantes para este trabalho.

Ao Dr. Victor Cavalcanti Pardini, pelo interesse e pela oportunidade de realização deste trabalho nas dependências do Departamento de Genética Humana do Instituto H. Pardini.

Ao Prof. Dr. Francisco Cardoso, pelo trabalho clínico junto aos pacientes e por tornar possível a colaboração do Serviço de Neurologia do Ambulatório Bias Forte, Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais neste projeto.

Ao Prof. Dr. Marcos José Burle de Aguiar, por proporcionar o contato com famílias com casos de Síndrome do X frágil.

Aos coordenadores do Departamento de Genética Humana do Instituto H. Pardini, Karina Braga, pelas sugestões científicas e pela agradável convivência, e Alessandro Ferreira, pelas sugestões que resultaram no início desta pesquisa.

À equipe do Ambulatório Bias Fortes, Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais e aos funcionários do Instituto H. Pardini, pela acolhida e pela amizade.

Às amigas do Laboratório de Genética Humana e Médica, Joana, Luciana, Daiane e Marlene pela amizade, alegria, motivação e aprendizado.

Aos professores do mestrado, pelo aprendizado e credibilidade oferecida.

Aos colegas do mestrado pela convivência e aprendizado juntos, fazendo de nós profissionais melhores.

Aos pacientes e seus familiares pela colaboração, participação e compreensão.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração.

À minha família, pelo carinho, interesse, apoio e estímulo.

Ao Márcio, pela compreensão, participação, carinho e sorrisos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

A Deus por estar sempre ao meu lado, me iluminando e dando forças para que eu pudesse transpor todas as barreiras e concluir mais esta etapa.

Muito obrigada!!

## Prefácio

O formato desta dissertação é uma alternativa ao modelo convencional, facultado pelo Curso de Pós-graduação em Genética.

A dissertação compreende uma introdução, com revisão detalhada do tema e materiais e métodos utilizados. A seguir, encontra-se o artigo gerado por este projeto de pesquisa, que mostra, entre outros, os resultados e discussão. Este artigo será submetido à GMR (Genetics and Molecular Research). Posteriormente, fizemos as conclusões referentes aos resultados apresentados, seguidas das referências bibliográficas utilizadas na dissertação e os apêndices.

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	5
Lista de tabelas .....	6
Lista de abreviaturas .....	7
Resumo .....	8
Abstract .....	9
1. Introdução .....	10
1.1 A Síndrome do X frágil (FRAXA) .....	10
1.2 FMR1: gene e proteína .....	11
1.2.1 Aspectos neuroquímicos de FMR1 .....	12
1.3 Mutação completa e pré-mutação em FMR1 .....	14
1.3.1. A transmissão da pré- mutação caracteriza um tipo peculiar de herança.....	15
1.4 A pré-mutação em FMR1 associada a ataxia e tremores (FXTAS) .....	15
1.4.1 FXTAS: modelos animais e estudos <i>postmortem</i> em humanos .....	17
1.5 Tratamento baseado em estudos moleculares: síndrome do X frágil e FXTAS .....	20
1.6 Impacto.....	20
1.7 Objetivos .....	21
1.7.1 Objetivo geral .....	21
1.7.2 Objetivos específicos .....	21
1.8 Relevância .....	21
2. Materiais e Métodos .....	23
2.1 A amostra .....	23
2.2 Coleta de material e extração de DNA .....	23
2.2.1 Coleta do <i>swab</i> bucal .....	24
2.2.2 Extração de DNA a partir do <i>swab</i> bucal.....	24
2.3 Amplificação por PCR.....	25
2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida, visualização do produto e tipagem alélica.....	27
3. Resultados e discussão.....	28
4 Conclusões .....	43
5. Referências Bibliográficas .....	44
Apêndice A .....	51
Apêndice B.....	54
Apêndice C.....	56

## Lista de figuras

FIGURA		PÁGINA
FIG. 1	Modelo da função de FMRp nos neurônios	13
FIG. 2	Mecanismo proposto para a formação das inclusões	19
FIG. 3	Esquema da amplificação do segmento de interesse do Gene FMR1	26

## Lista de tabelas

TABELA	PÁGINA
TAB. 1 Iniciadores utilizados na PCR	25

## Lista de abreviaturas

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromol
5'UTR	Região 5' não traduzida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido dextribonucléico
FMR1	Gene do Retardo Mental Familiar tipo 1
FMRp	Proteína originada da tradução de mRNA FMR1
FMRmRNA	Trasncrito de FMR1
FOP	Falência Ovariana Prematura
FRAXA	Sítio frágil A do cromossomo X humano
FXTAS	Síndrome de ataxia e tremor associado ao X frágil
kb	Quilobases
KH	Motivo ligador de RNA homólogo ao da proteína K
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mM	Milimol
NES	Sinal de exportação nuclear
NLS	Sinal de localização nuclear
NTM	<i>Normal transmitting males</i> (homens normais transmissores)
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pM	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
RNP	Partícula de ribonucleoproteína
rpm	Rotações por minuto
Xq27.3	Região 2, banda 7, sub-banda 3 do braço longo do cromossomo X

## Resumo

A síndrome do X frágil (FRAXA) ou do retardo mental familiar 1 (FMR1) é uma doença genética, com manifestações clínicas importantes, como o retardo mental. O fenótipo é causado pela expansão de uma repetição do trinucleotídeo CGG, localizada na região 5' não traduzida (5' UTR) do gene FMR1. Indivíduos normais têm aproximadamente 5-40 repetições e portadores de pré-mutação têm 55-200 repetições. Acima de 200 cópias ocorre inativação do gene e aparece o quadro clínico. Entre o tamanho normal e o da pré-mutação existe a chamada zona cinzenta. Os limites entre tamanho normal-zona cinzenta e zona cinzenta-pré-mutação têm variado na literatura. Recentemente, foi descrita a associação da pré-mutação neste gene a um quadro clínico composto por tremor e ataxia, denominado Síndrome de ataxia e tremor associado ao X frágil (FXTAS). Além disto, indivíduos com mais de 50 anos, portadores da pré-mutação no gene FMR1 têm uma probabilidade maior de desenvolver problemas neurodegenerativos de início tardio do que o restante da população. Inicialmente, a associação da pré-mutação em FMR1 ao tremor e ataxia foi encontrada em homens, mas em 2004 foram descritas 5 mulheres portadoras de pré-mutação, que apresentavam sintomas de ataxia e tremor. Nós nos propusemos a investigar a contribuição da pré-mutação para o fenótipo de ataxia, tremor e/ou parkinsonismo na população brasileira. A amostra do presente estudo foi reunida através da colaboração do Instituto Hermes Pardini e do Serviço de Neurologia do Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas de Minas Gerais. Tratam-se de 66 indivíduos, do sexo masculino, com aparecimento dos sintomas após os 45 anos. Além deles, foram triados 74 indivíduos normais escolhidos aleatoriamente na população para constituir o grupo controle. A metodologia adotada é constituída de extração de DNA a partir de sangue periférico ou *swab* bucal, amplificação por PCR de um segmento da região 5' UTR do gene FMR1; separação eletroforética dos produtos de PCR em gel desnaturante de poliacrilamida para a identificação dos alelos, sendo a visualização destes feita através do leitor de fluorescência FmbioII (Hitachi Denshi, Japão) ou coloração por prata. O tamanho dos alelos foi determinado através do programa Alpha DigDoc 1200&1201 (*Alpha Innotech*, Reino Unido). Não foram encontrados alelos de pré-mutação no grupo alvo, resultado semelhante a outros descritos na literatura. Entre os controles foi identificado um indivíduo portador de pré-mutação. Esta frequência, embora bem maior do que as descritas na literatura, não é estatisticamente diferente. Alelos da zona cinzenta foram identificados nos grupos alvo e controle, com frequências de 3,03% e 2,70%, respectivamente. Estes dados não diferem entre si ou das frequências relatadas em outros trabalhos, sugerindo que alelos de zona cinzenta não contribuam para o fenótipo FXTAS. Este é o sétimo estudo investigando a contribuição da pré-mutação em FMR1 para os fenótipos ataxia, tremor e/ou parkinsonismo. Numa revisão crítica da literatura e incluindo-se os dados do presente trabalho, foram identificados 15 casos em 748 pacientes triados, resultando em uma frequência média de 2%, com um intervalo de variação de 0-5%.

## Abstract

The fragile X syndrome (FRAXA) or familiar mental retardation 1 (FMR1) is a genetic disorder, with important clinical manifestations such as mental retardation. The phenotype involves expansion of a CGG repeat in the 5' untranslated region of the FMR1 gene. Normal individuals have 5-40 and premutation carriers have 55-200 repeats. Over 200 repeats occurs gene inactivation and the clinical picture appears. Between normal and premutation size exists the gray zone. There is variation concerning the borders of normal size-gray zone and gray zone-premutation size in the current literature for the syndrome. Recently, it was described the association of FMR1 premutation to a clinical picture formed by tremor and ataxia, designated the Fragile X Tremor Ataxia Syndrome (FXTAS). Moreover, FMR1 premutation carriers over fifty years have increased probability to develop late onset neurodegenerative problems than the population remainder. This association was described originally in males, but in 2004 five women had been described with this entity. We had investigated the contribution of premutation to the ataxia, tremor, and/or parkinsonism phenotype in the Brazilian population. The present sample was collected in collaboration of Instituto Hermes Pardini and the Serviço de Neurologia of Hospital das Clínicas of Minas Gerais. The sample is formed by 66 male individuals, that showed symptoms after 45 years old. Beyond them, we had screened 74 normal individuals randomly chosen from the population as a control group. DNA was obtained from peripheral blood or buccal swab, the 5'UTR region of FMR1 gene was PCR amplified and alleles were separated through denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Allelic visualization was performed by Fmbio II (Hitachi Denshi, Japan) or silver stained. The alleles sizes were resolved by Alpha DigDoc 1200&1201 program (*Alpha Innotech*, United Kingdom). Premutation alleles have not been found in the target group. This result is similar to others described in the literature. Among control individuals one premutation carrier was identified. This frequency although higher than others in the literature, is not statistically different. Gray zone alleles were identified in both target and control groups with 3,03% and 2,70% frequencies, respectively. These frequencies do not significantly differ each other or from frequencies reported by others, hence suggesting that gray zone alleles do not contribute to FXTAS phenotype. This is the seventh study investigating the contribution of the premutation in FMR1 gene to ataxia, tremor, and/or parkinsonism phenotype. In a critical literature review, including data from the present study, 15 FXTAS cases had been identified in 748 screened patients, resulting in a 2% average frequency with a variation interval of 0-5%.

# 1. Introdução

## 1.1 A Síndrome do X frágil (FRAXA)

A Síndrome do X frágil (OMIM 309550) é uma doença genética ligada ao sexo e de caráter semi-dominante (30% a 60% de penetrância nas mulheres e 80% a 100% nos homens). A sua frequência varia de 1 em 4000-6000 homens na população caucasiana segundo triagens realizadas na Holanda, Reino Unido e Austrália (Flannery e cols., 1995; Murray e cols., 1996; Turner e cols., 1996; De Vries e cols., 1997; De Vries e cols., 1999; Jin & Warren, 2003; Mandel & Biancalana, 2004; Van Esch, 2006).

Esta síndrome é causada predominantemente pela expansão da repetição do trinucleotídeo CGG dentro da região 5' não-traduzida do gene do Retardo Mental Familiar tipo 1 (FMR1). Indivíduos normais têm aproximadamente 5-40 repetições e os indivíduos considerados portadores de pré-mutação têm 55-200 repetições. Acima de 200 cópias da repetição ocorre inativação do gene e aparece o retardo mental. Apenas raramente a doença não é causada pela expansão da repetição de CGG, mas sim por mutações levando à perda de função do gene FMR1 (Jin & Warren, 2003; Leehey e cols., 2003; Oostra & Willemsen, 2003; Mandel & Biancalana, 2004).

Os alelos que carregam 41-60 cópias de CGG são denominados de alelos de zona cinzenta, pois não caracterizam um indivíduo normal, mas também não constituem uma pré-mutação. O menor número de cópias encontrado em uma pré-mutação, capaz de, na próxima geração, levar a uma mutação completa foi 59 (Haddad e cols., 1999; Hagerman & Hagerman, 2002; Capelli e cols., 2005).

Os sintomas clínicos da doença são retardo mental de grau moderado a severo, presente em 100% dos homens afetados e aproximadamente 60% das mulheres heterozigotas, aspecto facial distinto com orelhas grandes e face alongada, distúrbios de fala, hipermotilidade articular e macrorquidia (Bardoni & Mandel, 2002; Hagerman & Hagerman, 2002; Mandel & Biancalana, 2004).

## 1.2 FMR1: gene e proteína

O gene FMR1, sequenciado em 1991, localiza-se no braço longo do cromossoma X (Xq27.3). Ele é altamente conservado e apresenta 17 éxons, distribuídos em um segmento genômico de aproximadamente 38 kb. O transcrito maduro de FMR1 tem 4,4 kb (Jin & Warren, 2003).

A proteína FMR1 (FMRp) está presente no tecido fetal e adulto. Ela é predominantemente expressa no cérebro e nas gônadas. A Síndrome do X frágil caracteriza-se pela ausência de FMRp, mas indivíduos portadores da pré-mutação têm níveis de expressão de FMRp pouco abaixo do normal (Hagerman & Hagerman, 2001; Bardoni & Mandel, 2002; Jin & Warren, 2003).

A FMRp contém dois tipos de motivos ligadores de RNA, dois domínios KH (homólogos a proteína K) e um box do tipo arg-gli-gli. A sua localização é citoplasmática podendo estar associado a mRNAs, e/ou fazendo parte de grandes complexos de ribonucleoproteína (RNPs) e polirribossomos (Kooy e cols., 2000; Kooy, 2003).

Apesar da localização citoplasmática, FMRp apresenta sinal de localização nuclear (NLS) e sinal de exportação nuclear (NES), o que sugere movimentação entre núcleo e citoplasma. Esta hipótese foi confirmada por estudos de microscopia eletrônica, os quais mostraram que FMRp é capaz de atravessar o poro nuclear. Embora a função exata desta proteína ainda não seja conhecida, suas propriedades e localização sugerem que ela esteja envolvida na regulação do transporte, estabilidade e tradução de alguns mRNAs (Sung e cols., 2000; Schaeffer e cols., 2003).

A capacidade da FMRp ligar-se ao seu próprio e a outros mRNAs, através dos motivos da proteína, é devida à presença de uma estrutura, na fita simples de alguns mRNAs, conhecida como quartetos G ou tétrades G: guaninas que se ligam por pontes de hidrogênio formando um quadrado. Como aproximadamente 4% do total de mRNAs do cérebro de fetos humanos tem esse tipo de estrutura, é possível que a FMRp interaja com um grande número de mRNAs (Darnell e cols., 2001; Oostra, 2002; Chen e cols., 2003b; Denman, 2003; Huang & Richter, 2004).

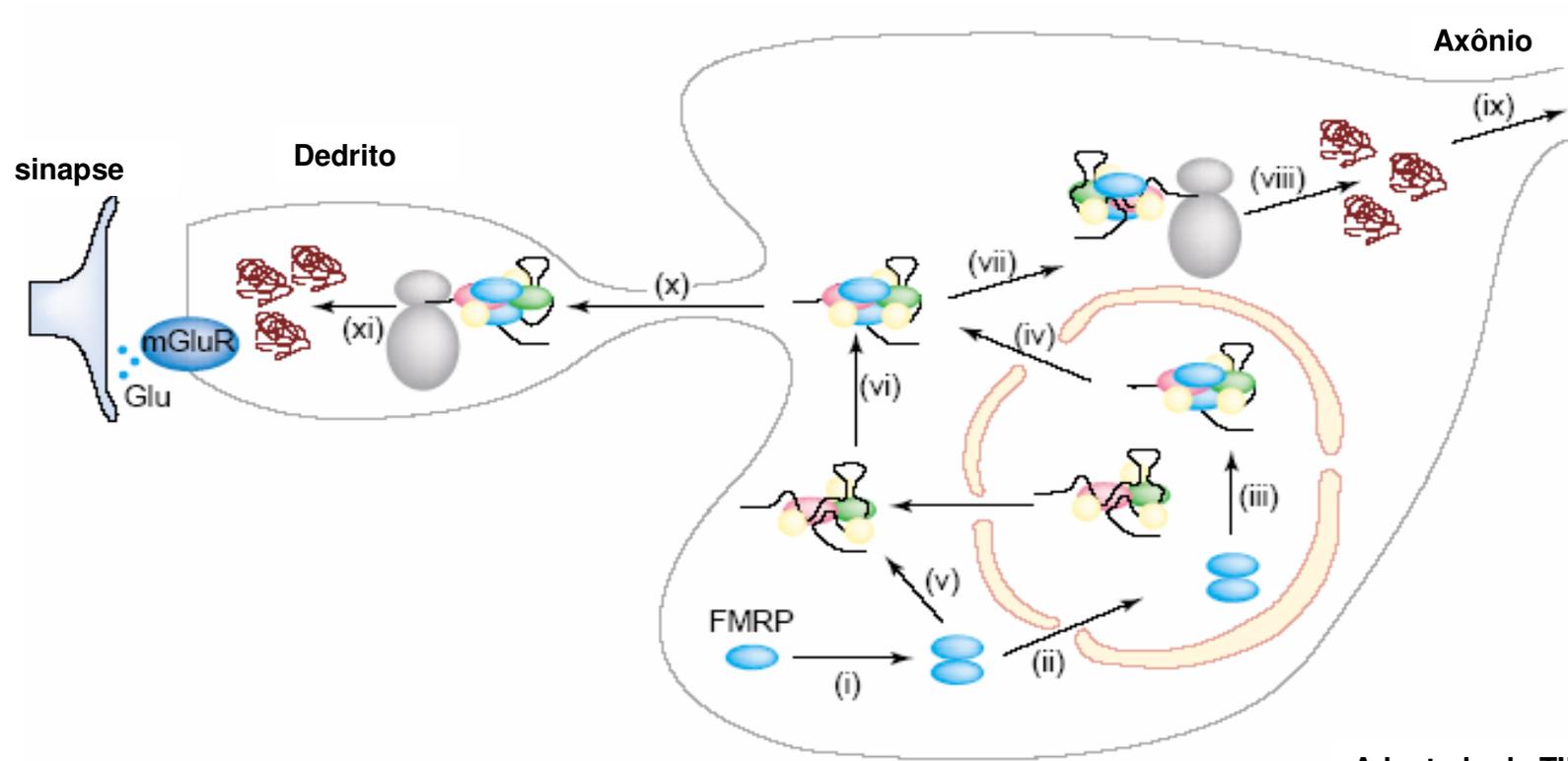
A associação FMRp-FMRmRNA resulta na regulação da tradução da própria FMRp e do *turnover* do FMR-mRNA (Oostra, 2002). A regulação traducional não está completamente esclarecida, mas envolve a repetição CGG na 5' UTR do mRNA de FMR1. Acredita-se que as expansões de CGG formem estruturas suficientemente estáveis, capazes de interferir no início da tradução (Hagerman & Hagerman, 2002; Tassone & Hagerman, 2003).

### 1.2.1 Aspectos neuroquímicos de FMR1

Estudos em camundongos mostraram que a FMRp tem um papel importante nos neurônios. A FMRp transporta mRNAs ao longo dos dendritos para os polirribossomos próximos às sinapses, além disso a proteína é capaz de regular a tradução de alguns mRNAs, importantes para a função sináptica (Kooy e cols., 2000; Darnell e cols., 2001; Greenough e cols., 2001; Huber e cols., 2002; Willemsen e cols., 2005).

A figura 1 apresenta um modelo da função de FMRp nos neurônios (adaptado de Jin & Warren, 2003). FMRp é dimerizada no citoplasma (i) e entra no núcleo através do seu sinal de localização nuclear (ii). A proteína é reunida em complexos de ribonucleoproteína (mRNP) e pode interagir com transcritos de RNA e outras proteínas (iii). Posteriormente, o complexo FMRp-mRNP é transportado para fora do núcleo através do sinal de exportação de FMRp (iv). Alternativamente, FMRp pode se ligar ao mRNA e se associar com mRNP no citoplasma (v, vi). Uma vez no citoplasma, o complexo FMRp-mRNP pode se associar com ribossomos no corpo celular (vii) para produzir proteínas (viii), algumas das quais são importantes para a orientação do axônio (ix). Além disto, o complexo FMRp-mRNP pode se transportar para os dendritos (x) e regular a síntese de proteína local de mRNAs específicos em resposta à estimulação sináptica, tais como a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (xi).

O exame anátomo-patológico detalhado de neurônios corticais revelou a presença de conexões sinápticas imaturas em camundongos nocautes para FMR1, o que está de acordo com os achados em humanos. Tal observação, unida ao fato que a estimulação de receptores de glutamato de preparações de sinaptossomos leva a um rápido aumento de FMRp, são indícios de que esta proteína possa estar diretamente envolvida na maturação sináptica. O déficit cognitivo dos pacientes portadores da Síndrome do X frágil poderia então ser resultado das conexões imaturas (Kooy e cols., 2000; Greenough e cols., 2001; Oostra & Willemsen, 2003).



Adaptado de TIBS

Figura 1: Modelo da função de FMRp nos neurônios.

### 1.3 Mutação completa e pré-mutação em FMR1

A expansão da repetição de trinucleotídeos ocorre durante a replicação do DNA. O modelo mais aceito é a formação de uma alça envolvendo as repetições CGG no filamento recém-sintetizado durante a replicação. Ao término do processo, o novo filamento teria, além das repetições copiadas do filamento molde, as que estavam “escondidas” na alça de duplicação (Flannery e cols., 1995; Kooy e cols., 2000).

A repetição CGG é ocasionalmente interrompida por uma ou duas repetições AGG. Além da formação da alça de duplicação, muitas pré-mutações perdem as unidades AGG, resultando em um número aumentado de repetições CGG. Aproximadamente, 70% das grandes expansões têm somente uma unidade AGG (Sullivan e cols., 2002; Jin & Warren, 2003; Mandel & Biancalana; 2004; Van Esch, 2006).

Mutações completas, acima de 200 cópias de CGG, resultam na metilação do gene FMR1 e conseqüentemente no seu silenciamento, ao passo que a pré-mutação (59-200 cópias) está associada a um ganho de função. Os indivíduos que carregam a pré-mutação mostram níveis mais altos de mRNA comparados aos indivíduos normais (Hagerman & Hagerman, 2001). Foi demonstrado que homens que carregam 55 a 100 repetições de CGG têm níveis de mRNA 4 vezes maior que indivíduos normais e que naqueles com de 100 a 200 repetições estes níveis aumentam de 4 para 10 vezes. As mulheres também têm níveis aumentados de mRNA, porém bem mais discretos do que os observados nos homens (Primerano e cols., 2002; Chen e cols., 2003a; Oostra e cols., 2003).

Acredita-se que o aumento da transcrição, observado nos portadores de pré-mutação, seja devido a uma conformação mais aberta da região promotora, resultante da expansão das repetições de CGG e do aumento do número de fatores de transcrição, que são atraídos pelas repetições de CGG (proteínas ligadoras de CGG, que regulam a expressão de FMR1). Estes fatores atuam como acentuadores da transcrição (Oostra & Willemsen, 2003).

Embora o mRNA-FMR1 esteja presente em maior quantidade, os níveis de FMRp são normais ou mais baixos nestes indivíduos. Este achado tem sido atribuído a uma mudança de conformação do transcrito provocada pelas repetições de CGG, que poderia dificultar a ligação à subunidade 40S do ribossomo e o *scanning* até o primeiro códon AUG. Em resposta aos baixos níveis de FMRp, ocorre um aumento na transcrição, levando à níveis aumentados do transcrito FMR1 (Primerano e cols., 2002; Oostra & Willemsen, 2003; Beilina e cols., 2004; Tassone e cols., 2004).

### **1.3.1. A transmissão da pré- mutação caracteriza um tipo peculiar de herança**

A frequência da pré-mutação em FMR1, estimada em caucasianos, é de 1:259 em mulheres e 1:813 em homens (Rousseau e cols., 1995; Dombrowski e cols., 2002). Dados empíricos mostraram que a transição da pré-mutação para mutação completa ocorre somente na meiose materna e depende tipicamente do tamanho da pré-mutação. Uma mulher com uma pré-mutação de 60 repetições de CGG tem uma chance pequena de ter uma criança afetada, ao passo que se a pré-mutação for de 90 ou mais repetições de CGG a chance é de aproximadamente 100% (Flannery e cols., 1995).

Não ocorre expansão de pré-mutação à mutação completa na meiose masculina. Deste modo, as filhas de homens portadores de pré-mutação não são afetadas. Em função disto, os homens portadores de pré-mutação são denominados homens normais transmissores (NTM). Em contrapartida, a expansão mitótica da repetição de CGG é maior nos homens. Por este motivo, os filhos de mulheres transmissoras, têm expansões muito maiores que as filhas (Flannery e cols., 1995; Capelli e cols., 2005).

### **1.4 A pré-mutação em FMR1 associada a ataxia e tremores (FXTAS)**

Os principais sintomas associados à pré-mutação em FMR1 são ataxias e tremores. A este quadro clínico foi dado o nome de Síndrome de ataxia e tremor associada ao X frágil (FXTAS). Outros sinais tais como distúrbios da marcha, parkinsonismo (que se manifesta como bradicinesia, instabilidade postural, tremor de repouso e rigidez) e declínio cognitivo são frequentemente encontrados. A doença pode se manifestar em indivíduos portadores de pré-mutação, que tenham 50 anos ou mais. Não foi demonstrada relação entre os achados neuropatológicos e o número de repetições de CGG (Jacquemont e cols., 2004b, Baba & Uiti, 2005; Kamm e cols., 2005a; Greco e cols., 2006).

O diagnóstico de FXTAS pode ser subdividido em três classes: FXTAS Definitiva, quando existem critérios clínicos, tais como tremor de intenção e ataxia da marcha (fortes indicativos) e parkinsonismo (médio indicativo), critérios radiológicos tais como lesões simétricas da substância branca envolvendo o pendúnculo cerebelar médio (forte indicativo) e lesões da substância branca e atrofia generalizada moderada a severa (médio indicativo) e critérios adicionais tal como a presença de inclusões intranucleares nos neurônios e astrócitos; Provável FXTAS, quando existem dois critérios clínicos de forte indicativo ou um critério radiológico de forte indicativo mais um critério clínico de médio indicativo; Possível FXTAS,

quando existe um critério clínico de forte indicativo mais um critério radiológico de médio indicativo (Hagerman & Hagerman, 2004b)

O fenótipo da FXTAS foi primeiramente identificado em 2001, quando foram descritos cinco homens, que apresentaram tremor iniciando entre os 50 e os 60 anos de idade. Os indivíduos afetados apresentavam tremor, discinesia branda, dificuldade para andar, escrever e manusear talheres, e rigidez facial. Estes homens eram portadores de pré-mutações, com 78 a 98 repetições de CGG. Adicionalmente, eram impotentes e tinham sinais de neuropatia periférica (Hagerman & Hagerman, 2001). Na seqüência deste relato houve alguns outros, confirmando o quadro clínico (Hagerman e cols., 2001; Brunberg e cols., 2002; Greco e cols., 2002; Jacquemont e cols., 2003; Rogers e cols., 2003; Jacquemont e cols., 2004a; Tan e cols., 2004).

Até recentemente, acreditava-se que a FXTAS ocorria somente em homens. Em 2004, foram descritas cinco mulheres portadoras de pré-mutação, que apresentavam sintomas de ataxia e tremor. A FXTAS se manifesta nas mulheres com sintomas mais brandos devido ao mecanismo de inativação randômica de um dos cromossomos X. Também não foi visto nas mulheres sinais de demência, que acomete cerca de 20 % dos homens. As pesquisas anteriores a 2004 associavam a pré-mutação nas mulheres somente à falência ovariana prematura (FOP), presente em aproximadamente 20% destas portadoras. A FOP, definida como menopausa antes dos 40 anos, tem uma freqüência de 1% na população em geral (Hagerman & Hagerman, 2002; Hagerman e cols., 2004; Jacquemont e cols., 2004a; Berry-Kravis e cols., 2005; Hessel e cols., 2005; Jacquemont e cols., 2005; Van Esch e cols., 2005).

O menor número de repetições, em indivíduos com a pré-mutação no gene FMR1, observado em associação com o fenótipo de ataxia e/ou tremor é 51. Os indivíduos com alelos que contenham repetições acima de 100 trinucleotídeos de CGG possuem grandes chances de apresentar problemas emocionais e comportamentais (Macpherson e cols., 2003; Jacquemont e cols., 2004a; Hagerman & Hagerman, 2004a).

A partir do segundo trimestre de 2004 surgiram alguns trabalhos estimando a freqüência da FXTAS em diferentes grupos de pacientes. Em amostras de sujeitos averiguados pela presença de ataxia, a freqüência de pré-mutação em FMR1 chegou a 5% (Macpherson e cols., 2003; Van Esch e cols., 2004; Zuhlke e cols., 2004; Biancalana e cols., 2005; Brussino e cols., 2005; Seixas e cols., 2005). Em contrapartida, em três outros estudos nenhum portador de pré-mutação foi encontrado dentre os pacientes com sintomas sugestivos de FXTAS (ataxia, tremor e parkinsonismo). Estas amostras foram formadas por indivíduos apresentando manifestações clínicas sugestivas de ataxia cerebelar esporádica, atrofia de

múltiplos sistemas, tremor essencial e parkinsonismo atípico (Garcia Arocena e cols. 2004; Tan e cols., 2004; Toft e cols., 2005; Kamm e cols., 2005b).

Observou-se também que a penetrância das FXTAS aumenta com a idade, passando de 17%, em homens com idade entre 50 e 59 anos, para 75%, em homens com mais de 80 anos. Sendo assim, a penetrância média ficou estabelecida como 39% para homens portadores da pré-mutação com idade superior a 50 anos. Além disso, com base na frequência da pré-mutação em homens (1/813), a prevalência da FXTAS pôde ser estimada como sendo de no mínimo 1 em 3000 para homens com mais de 50 anos na população. (Hagerman & Hagerman, 2004a; Jacquemont e cols., 2004a).

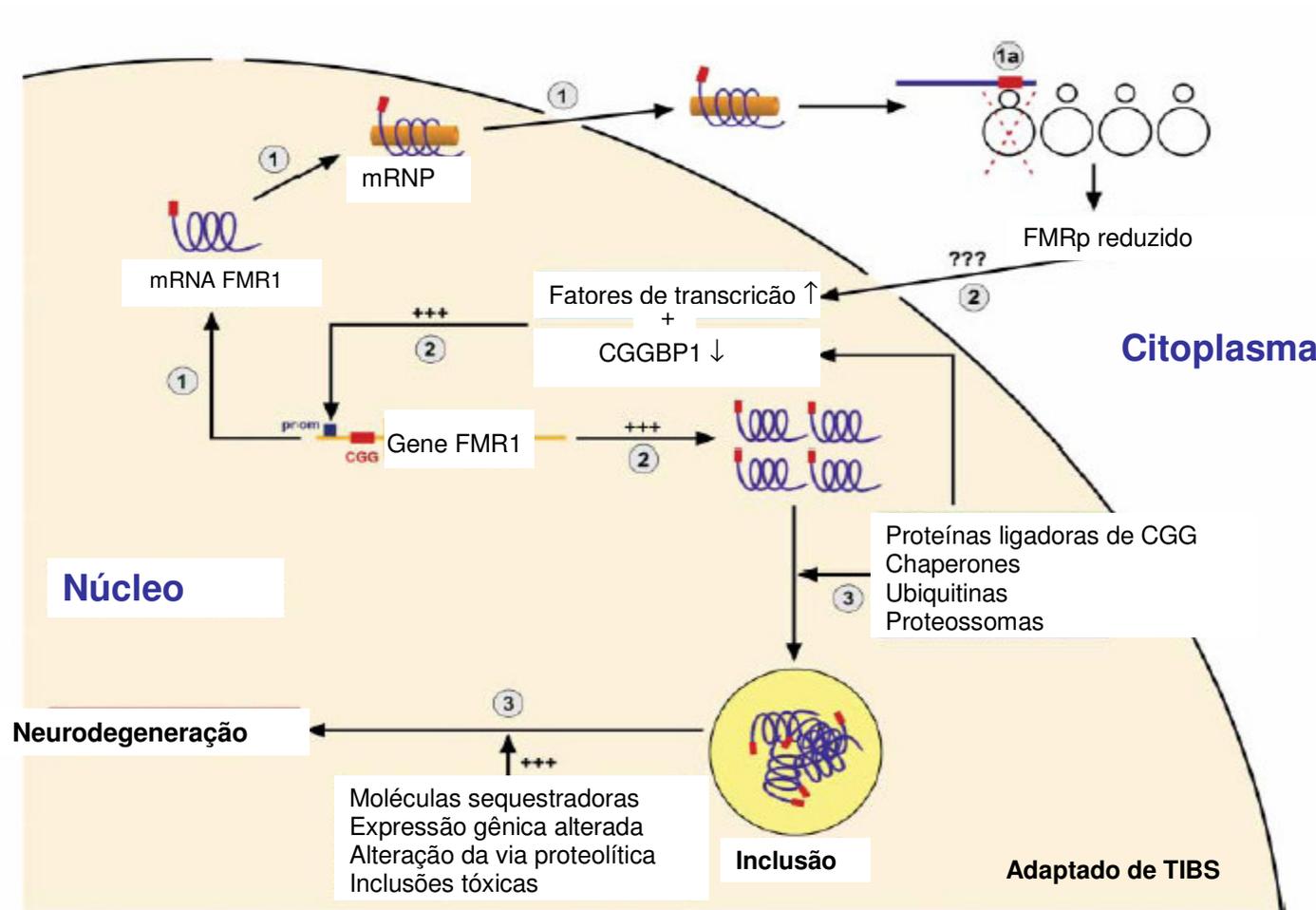
#### **1.4.1 FXTAS: modelos animais e estudos *postmortem* em humanos**

Ao exame anátomo-patológico de indivíduos portadores da pré-mutação em FMR1 e que apresentaram ataxia e tremor foi descrita a presença de inclusões intranucleares eosinofílicas em neurônios e astrócitos, além de atrofia cerebral com perda de parte das células de Purkinje. Estas inclusões foram encontradas em todo o córtex e tronco cerebral com maiores densidades localizadas no hipocampo e no córtex frontal. Foi demonstrado que o número de inclusões está diretamente relacionado ao número de repetições de CGG, embora estejam ausentes em pacientes com mutações completas em FMR1 (Brunberg e cols., 2002; Greco e cols., 2002; Hagerman e cols., 2003; Jacquemont e cols., 2004a; Greco e cols., 2006).

As inclusões intranucleares também foram encontradas quando *Drosophila* foram transformadas com um vetor contendo parte do gene FMR1 com 90 repetições de CGG. Diferentemente do que ocorre em humanos, em *Drosophila* foram observadas inclusões citoplasmáticas além das nucleares. Inclusões citoplasmáticas também foram vistas quando camundongos foram usados como modelo. A falta de inclusões citoplasmáticas em humanos pode refletir variações funcionais espécie-específicas ou depender da idade do paciente e estágio da doença (Jin e cols., 2003; Kooy, 2003; Willemsen e cols., 2003; Van Dam e cols., 2005).

A análise das inclusões citoplasmáticas e nucleares em *Drosophila* e camundongos revelou a presença de complexos de ubiquitina e proteossoma, sugerindo que a degradação de proteínas possa ser um dos elementos responsáveis pela neurodegeneração progressiva encontrada nestes modelos animais (Jin e cols., 2003; Willemsen e cols., 2003; Willemsen e cols., 2005; Iwahashi e cols., 2006).

Na figura 2 (adaptada de Oostra, 2003) é apresentado um modelo para explicar a formação das inclusões intranucleares. **Passo 1:** Os transcritos de FMR1 contendo expansões de CGG são normalmente incorporados em partículas de ribonucleoproteínas e transportados para fora do núcleo; **Passo 1a:** As longas repetições de CGG atrasam ou impedem a migração linear da subunidade 40S do ribossomo até o primeiro códon AUG, resultando em um prejuízo para a transcrição. Conseqüentemente, a célula nervosa apresenta níveis reduzidos de FMRp. **Passo 2:** Em resposta aos baixos níveis de FMRp, ocorre um aumento da quantidade de fatores de transcrição que vão estimular a transcrição de FMR1. **Passo 3:** A célula nervosa tenta diminuir os níveis de transcrito através do emprego de chaperonas e componentes de vias de degradação. Se os elevados níveis de transcrito subsistem, as inclusões intranucleares são formadas. Essas inclusões poderiam desencadear a neurodegeneração por apresentarem compostos considerados neurotóxicos.



**Figura 2 : Mecanismo proposto para a formação das inclusões.**

## **1.5 Tratamento baseado em estudos moleculares: síndrome do X frágil e FXTAS**

O prejuízo cognitivo na Síndrome do X frágil é causado pela ausência de FMRp nos neurônios. Baseado neste fato, terapias poderiam ser feitas com o objetivo de restaurar FMRp no cérebro. Pacientes com mosaicismos do FRAXA, que sintetizam mais de 25% de FMRp, são tão severamente afetados quanto os que possuem a mutação completa. Isso sugere que a reposição parcial de FMRp não amenizaria os sintomas clínicos e portanto uma terapia baseada na introdução da proteína nos pacientes talvez não solucionasse o problema (Kooy e cols., 2000).

Considerando o estado de metilação de FMR1 e acetilação de histonas de indivíduos com a Síndrome do X frágil, foram feitos testes tratando-se linhagens de linfoblastos destes indivíduos com agentes demetilantes. O resultado foi um aumento da taxa de transcrição, quase restaurando o padrão normal. O tratamento com agentes hiperacetilantes também resultou em aumento de FMRp, porém em níveis bem mais baixos. Entretanto, foi demonstrado que a combinação de agentes demetilantes e hiperacetilantes é capaz de ativar oncogenes. Estes agentes então, apesar de aumentarem os níveis de FMRp, não seriam aconselhados para o tratamento da síndrome (Kooy e cols., 2000).

Em contrapartida, os indivíduos que apresentam FXTAS têm níveis de FMRp normais ou ligeiramente diminuídos. Foi sugerido que o fenótipo seja causado pelos altos níveis de mRNA. A patogênese molecular das FXTAS ainda não está esclarecida e portanto não é possível ainda estabelecer tratamentos moleculares. As drogas disponíveis (tais como medicamentos utilizados para o controle de parkinsonismo, tremor e ataxia em outras doenças que se sobreponham este quadro clínico), podem amenizar os sintomas, mas não eliminá-los (Jacquemont e cols., 2004b; Baba & Uitti, 2005).

## **1.6 Impacto**

A alta frequência de mutações em FMR1, sugere a discussão sobre a implementação da triagem genética na população em geral, especialmente nos indivíduos com história familiar da Síndrome do X frágil, que apresentem sintomas de doenças neurodegenerativas. A descoberta recente das FXTAS e a semelhança dos seus sintomas com os de algumas doenças neurodegenerativas, faz com que muitos pacientes sejam diagnosticados erroneamente.

Em 2005, foi realizado um levantamento do número de pacientes portadores de FXTAS diagnosticados primariamente como portador de outra doença neurodegenerativa. De

um grupo total de 98 pacientes, 56 foram diagnosticados erroneamente como portadores de parkinsonismo (Doença de Parkinson e atrofia de múltiplos sistemas), tremor (essencial, cerebelar, alcólico e distônico), demência (doença de Alzheimer, demência vascular), doenças cerebrovasculares, neuropatia periferal além de outras (Hall e cols., 2005). Hagerman em seus trabalhos sugere que uma parte dos pacientes diagnosticados como portadores de Doença de Parkinson atípico, na verdade podem ser portadores de FXTAS. O diagnóstico correto contribuir para o planejamento familiar baseado em aconselhamento genético

Todavia, a implementação da triagem genética para mutações em FMR1 na população deve ser discutida levando-se em consideração os aspectos éticos e sociais envolvidos.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo geral**

Investigar a contribuição da pré-mutação em FMR1 para os fenótipos ataxia e/ou tremor e/ou parkinsonismo.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- Padronizar os métodos de triagem da pré-mutação no gene FMR1;
- Investigar a contribuição da pré-mutação em FMR1 assim como de alelos da zona cinzenta para o fenótipo ataxia, tremores e ou parkinsonismo, através da comparação das frequências observadas em uma amostra de indivíduos afetados e de controles normais.

## **1.8 Relevância**

A síndrome de ataxia e tremor associada ao X frágil, é uma doença descoberta recentemente e tem manifestações clínicas importantes. Assim como outras doenças neurodegenerativas, possui caráter progressivo, fazendo-se necessário o diagnóstico precoce e correto para a instituição de terapia apropriada e aconselhamento genético das famílias.

Quando delineamos este projeto de pesquisa ainda não havia estudos publicados na literatura internacional. Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, foram publicados seis artigos investigando a frequência de pré-mutação em FMR1 em sujeitos com o espectro fenotípico da FXTAS.

No Brasil, ainda não existem estudos publicados sobre a FXTAS e os estudos sobre a pré-mutação no gene FMR1 são poucos e não abordam o aspecto populacional. A investigação da contribuição da pré-mutação para o fenótipo da FXTAS, proposta neste projeto, é de grande importância clínica, visto que existem casos de diagnóstico errado devido o desconhecimento desta síndrome e à sua semelhança com outras doenças neurodegenerativas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 A amostra

A população do presente estudo foi reunida através da colaboração do Instituto Hermes Pardini e do Serviço de Neurologia do Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas de Minas Gerais. Foram formados dois grupos: Alvo, constituído pelos indivíduos com fenótipo ataxia, tremor ou parkinsonismo e Controle, constituído pelos indivíduos fenotipicamente normais. (a tabela com a origem e fenótipo dos indivíduos da amostra alvo encontra-se no apêndice A).

O Departamento de Genética Humana do Instituto H. Pardini realiza o diagnóstico das ataxias espinocerebelares 1, 2, 3 e 10, além da ataxia de Friedreich e da doença de Huntington. Estas doenças possuem fenótipos semelhantes aos encontrados em portadores de FXTAS. Os indivíduos que apresentaram exames negativos para as doenças acima e que tinham 45 anos ou mais foram selecionados para fazer parte da presente amostra.

O Serviço de Neurologia do Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas de Minas Gerais, por sua vez, possui um ambulatório especializado em distúrbios do movimento, atendendo pacientes com sintomas diversos, tais como parkinsonismo, ataxia, tremor e demência. Deste grupo de pacientes, os que ainda não possuíam diagnóstico estabelecido e que tenham 45 anos ou mais foram selecionados também para constituir a população deste estudo.

Paralelamente, foram triados 74 sujeitos normais, escolhidos aleatoriamente entre indivíduos encaminhados ao Instituto H. Pardini para a realização de outros exames, incluindo testes de paternidade. A necessidade de um grupo controle é devida à inexistência de dados da frequência da pré-mutação no gene FMR1 nesta população.

### 2.2 Coleta de material e extração de DNA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ver parecer no apêndice B). As amostras de DNA armazenadas no Instituto H. Pardini e os *swabs* bucais dos pacientes do Ambulatório Bias Fortes, foram utilizados e coletados, respectivamente mediante consentimento (os termos de consentimento livre e esclarecido constam no apêndice C).

As extrações de DNA dos pacientes do Instituto H. Pardini (incluindo o grupo controle) foram feitas a partir de sangue periférico, utilizando-se o kit *Puregene* (Gentra,

EUA). As extrações de DNA a partir dos *swabs* bucais, coletados dos pacientes do Ambulatório Bias Fortes, foram feitas conforme protocolo adaptado de Sambrook & Russel, 2001.

### **2.2.1 Coleta do *swab* bucal**

O *swab* foi coletado com luvas estéreis, utilizando uma escova cervical também estéril. A mucosa oral foi escovada por 1 minuto (30 segundos de cada lado) e depois introduzida em tubos de microcentrifugação de 1,5 ml, contendo 1mL de TE estéril previamente preparado no laboratório. A escova foi girada dentro do líquido por 20 segundos com o objetivo de colocar as células em solução. A escova é descartada e os tubos são congelados até o momento da extração do DNA.

### **2.2.2 Extração de DNA a partir do *swab* bucal**

O protocolo de extração de DNA utilizado (Sambrook & Russel, 2001), foi adaptado no Laboratório de Genética Humana e Médica, BIG, ICB, UFMG, e executado como descrito abaixo:

1. Centrifugar em micro centrífuga a 10.000rpm / 10 min. / 120 segundos de parada.
2. Desprezar sobrenadante e descolar pellets.
3. Colocar 300 µL de solução de Tris-Edta (TE) pH. 8,3 e centrifugar novamente a 10.000rpm / 10 min. / 120 segundos de parada.
4. Desprezar sobrenadante e deslocar pellets.
5. Colocar: 500 µL de solução de Cloreto de sódio-Edta (SE) pH. 8,0, 25 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e 15 µL de Proteinase K (2mg/mL).
6. Deixar em banho-maria a 56°C over-night.
7. Colocar 150 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 5M e agitar no Vortex.
8. Centrifugar a 6500rpm / 5 min. / 90 segundos de parada.
9. Numerar tubos novos, transferindo o sobrenadante para eles.
10. Precipitar fragmentos menores com solução de acetato de Sódio 3M, pH. 5,2, na proporção de 1:10 do volume, misturando delicadamente por inversão (1-2 min).

11. Precipitar fragmentos maiores com Isopropanol (proporção de 1:1) ou Etanol 100% (proporção 2:1). Misturar por inversão (1-2 min). Deixar de 2 horas a 24 horas em freezer antes de centrifugar.
12. Centrifugar a 13000 rpm / 15 min. / 120 segundos de parada.
13. Se formou o pellet no fundo, desprezar o isopropanol.
14. Lavar com Etanol 70% gelado:
  - a. Colocar 1000 µL de Etanol 70%, centrifugar 13000 rpm /5 min. /120 segundos de parada.
  - b. Desprezar Etanol.
  - c. Colocar 1000 µL de Etanol 70%, centrifugar 13000 rpm /5 min. /120 segundos de parada.
  - d. Desprezar Etanol.
15. Retirar o excesso de Etanol com pipeta tomando cuidado para não encostar no pellet.
16. Deixar secar por 15 a 30 min.
17. Colocar solução de Tris-Edta (TE) pH. 8,3 de acordo com o tamanho dos pellets. (de 30-100 µL).
18. Deixar em banho Maria a 56° C por uma hora.
19. Armazenar em geladeira (2- 8°C)

### 2.3 Amplificação por PCR

O segmento da região 5' não traduzida do gene FMR1, que contém a expansão de CGG, foi amplificado por PCR conforme o esquema apresentado na figura 3. A TAB. 1 mostra os iniciadores marcados com fluoresceína utilizados:

TABELA 1: Iniciadores utilizados na PCR

Primers (5' - 3')
(F): 5' GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC 3'
(R): 5' AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT 3'

Fonte: Fu e cols., 1991

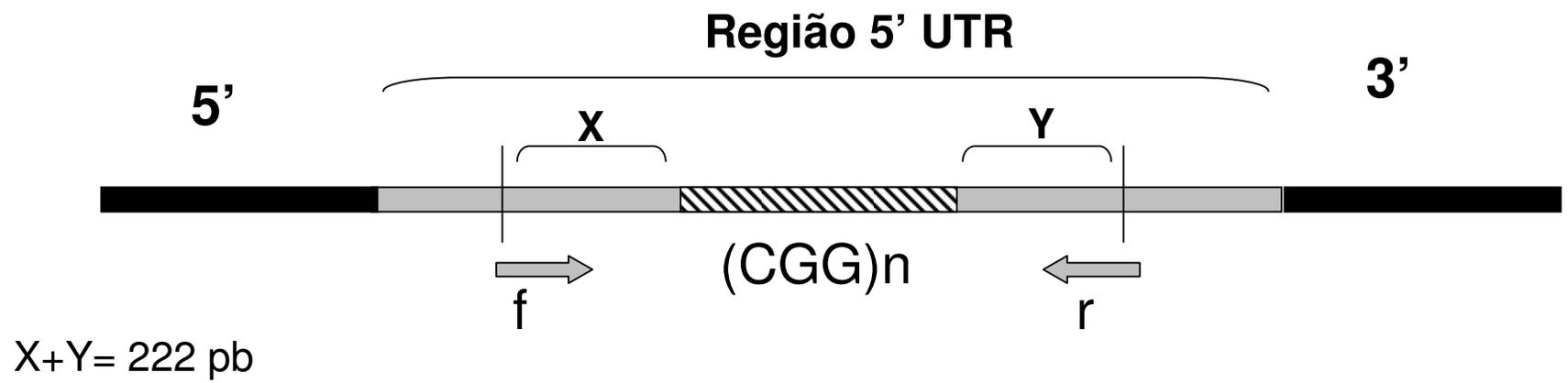


Figura 3: Esquema da amplificação do segmento de interesse do Gene FMR1.

As reações de PCR foram realizadas em tubo de microcentrifugação tipo *Eppendorf* de 200 µL, num volume final de 15 µL, e foram padronizadas quanto à temperatura de anelamento, número de ciclos, concentração de iniciadores, etc.

O programa da reação de PCR consta de: desnaturação inicial de 95° C por 8 minutos, seguida por 40 ciclos com desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 66°C por 50 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72° C por 8 minutos.

Cada reação de PCR contém 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,4 (Tampão II - *Accuprime system* – *Invitrogen*, EUA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 150 µM de 7-deaza-dGTP (*Amersham Pharmacia Biotech*, EUA), 10% de DMSO, 10 pM de cada iniciador, 1,0 U de Taq DNA polimerase (*Accuprime system -Invitrogen*, EUA) e 100 ng de DNA. Para a realização das reações da PCR, foi utilizado o termociclador Gene Amp PCR System 2400 (*Applied Biosystems*, EUA).

Em toda reação de PCR foi usado um controle negativo, no qual todos os reagentes estavam presentes e o DNA foi substituído por água bidestilada, deionizada (DDW), estéril.

#### **2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida, visualização do produto e tipagem alélica**

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 4% e corados com prata ou analisado no leitor de fluorescência FmbioII (*Hitachi Denshi*, Japão). O número de repetições nos alelos foi determinado com base em um padrão de peso molecular de DNA (*Power Plex, Promega, EUA*) e através do programa Alpha DigDoc 1200&1201 (*Alpha Innotech*, Reino Unido). Para encontrarmos o número de repetições de CGG para cada alelo, procedemos da seguinte forma: do número de pares de bases encontrado foi subtraído 222pb, que corresponde ao fragmento amplificado fora da região das repetições e o restante foi dividido por três (pois as repetições são trinucleotídeos).

### **3. Resultados e discussão**

Artigo a ser submetido na revista Genetics and Molecular Research

#### **Frequência da pré-mutação em FMR1 em pacientes com ataxia, tremor e/ou parkinsonismo e revisão crítica da literatura**

A publicação que se segue apresenta os resultados alcançados a partir do desenvolvimento metodológico deste estudo.

# Freqüência da pré-mutação em FMR1 em pacientes com ataxia, tremor e/ou parkinsonismo e revisão crítica da literatura

Adriana H. de Oliveira Reis<sup>1</sup>, Alessandro Clayton de S. Ferreira<sup>2</sup>, Marcos José B. de Aguiar<sup>3,4</sup>, Cleusa Graça da Fonseca<sup>1</sup>, Francisco E. Cardoso<sup>5,6</sup>, Victor C. Pardini<sup>2</sup>, Maria Raquel S. Carvalho<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Genética Humana, Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

<sup>4</sup> Núcleo de Pesquisa em Apoio ao Diagnóstico, NUPAD, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

<sup>6</sup> Serviço de Neurologia, Ambulatório Bias Fortes, Hospital das Clínicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

## Resumo

Recentemente, Hagerman e colaboradores descreveram a ocorrência de uma síndrome neurológica de início tardio em indivíduos portadores de pré-mutação no gene FMR1. O quadro clínico desta síndrome, denominada como Síndrome de ataxia e tremor associado ao X frágil (FXTAS), é composto por tremor de intenção, ataxia cerebelar, parkinsonismo e declínio cognitivo. Nós nos propusemos a investigar a contribuição da pré-mutação para o fenótipo de ataxia, tremor e/ou parkinsonismo. Foram testados 66 homens com esse fenótipo, com mais de 45 anos, provenientes do Estado de Minas Gerais, Brasil. Paralelamente, foram triados 74 indivíduos normais, pareados por sexo, escolhidos aleatoriamente na população para constituir o grupo controle. Não foram encontrados portadores de pré-mutação no grupo de pacientes, o que está de acordo com a freqüência observada em outros trabalhos, que variou de 0-5%. A freqüência de alelos de zona cinzenta não apresentou diferenças significativas, quando comparados pacientes e controles. Esta é a sétima amostra descrita na literatura. A contribuição da FXTAS em pacientes com manifestações fenotípicas do espectro da FXTAS foi de 15/748, ou 2%. A presença de alelos de zona cinzenta não parece estar correlacionada a risco de FXTAS.

Palavras-chave: Ataxia; FMR1; FXTAS; Parkinsonismo; Tremor; pré-mutação

## Introdução

A Síndrome do X frágil (OMIM 309550) é uma doença genética ligada ao sexo e de caráter semi-dominante (30% a 60% de penetrância nas mulheres e 80% a 100% nos homens). A sua freqüência varia de 1 em 4000-6000 homens na população caucasiana segundo triagens realizadas na Holanda, Reino Unido e Austrália (Flannery e cols., 1995; Murray e cols., 1996; Turner e cols., 1996; De Vries e cols., 1997; De Vries e cols., 1999; Jin & Warren, 2003; Mandel & Biancalana, 2004; Capelli e cols., 2005; Van Esch e cols., 2006).

Esta síndrome é causada predominantemente pela expansão da repetição do trinucleotídeo CGG dentro da região 5' não-traduzida (5' UTR) do gene do Retardo Mental Familiar tipo 1 (FMR1). Indivíduos normais têm aproximadamente 5-40 repetições e os indivíduos considerados portadores de pré-mutação têm 55-200 repetições. Acima de 200 cópias da repetição ocorre inativação do gene e aparece o retardo mental. Os alelos que carregam 41-60 cópias de CGG são denominados de alelos de zona cinzenta, pois não caracterizam um indivíduo normal, mas também não constituem uma pré-mutação. Os limites entre normal e zona cinzenta e entre zona cinzenta e pré-mutação variam entre as diferentes publicações. Apenas raramente, a doença não é causada pela

expansão da repetição de CGG, mas sim por mutações levando à perda de função do gene FMR1 (Oostra & Willemsen, 2003; Jin & Warren, 2003; Leehey e cols., 2003; Mandel & Biancalana, 2004; Capelli e cols., 2005).

Recentemente, foi descoberta a associação da pré-mutação a um quadro clínico composto por tremor de intenção, ataxia cerebelar, parkinsonismo e declínio cognitivo. A este quadro foi dado o nome de Síndrome de ataxia e tremor associado ao X frágil (FXTAS). Outros sintomas tais como perda de memória, déficit das funções executivas, demência (somente em homens afetados) e disfunções autonômicas (impotência, incontinência urinária e intestinal) podem ser encontrados (Hagerman & Hagerman, 2001; Hagerman e cols., 2001; Greco e cols., 2002; Brunberg e cols., 2002; Jacquemont e cols., 2003; Rogers e cols., 2003; Tan e cols., 2004; Baba & Uitti, 2005, Greco e cols., 2006).

Ao exame anátomo-patológico *postmortem* do cérebro de indivíduos portadores de FXTAS foram encontradas inclusões eosinofílicas intranucleares em neurônios e astrócitos, além de atrofia cerebral com perda de parte das células de Purkinje. Estas inclusões não têm sido vistas em pacientes com mutações completas em FMR1 (Greco e cols., 2002; Brunberg e cols., 2002, Greco e cols., 2006) As inclusões intranucleares também foram encontradas quando *Drosophilas* e camundongos foram utilizados como modelo (Jin e cols., 2003; Willemsen e cols., 2003).

A frequência da pré-mutação em FMR1 foi estimada em 1:259 para mulheres e em 1:813 para homens em populações caucasianas (Rousseau e cols, 1995; Dombrowski e cols., 2002), a frequência da FXTA foi estimada em 1:3000, para homens com mais de 50 anos (Jacquemont e cols., 2004; Hagerman & Hagerman, 2004a).

Alguns autores sugerem que uma porcentagem dos pacientes diagnosticados como portadores de Doença de Parkinson e atrofia de múltiplos sistemas, na verdade possam ser portadores de FXTAS. O diagnóstico correto pode contribuir para o planejamento familiar baseado em aconselhamento genético (Tan e cols., 2004; Hall e cols., 2005; Kamm e cols., 2005 ).

A maior parte dos estudos enfoca a frequência de FXTAS em sujeitos portadores de pré-mutação averiguados em função de seu parentesco com indivíduos com X frágil. Já a contribuição da pré-mutação para o fenótipo ataxia-tremor-parkinsonismo têm sido menos estudada, e os estudos têm tido resultados discordantes entre as diversas amostras testadas (Macpherson e cols., 2003; Tan e cols., 2004; Zühlke e cols., 2004; Van Esch e cols., 2004; Brussino e cols., 2005; Seixá e cols., 2005). Em vista disto, nos propusemos a averiguar a frequência da pré-mutação em FMR1 em uma amostra de pacientes com ataxia, tremor, e/ou parkinsonismo do Estado de Minas Gerais.

## **Materiais e Métodos**

A amostra foi constituída de 66 indivíduos do sexo masculino portadores de ataxia, tremor e/ou parkinsonismo, além de 74 indivíduos normais, pareados por sexo, escolhidos aleatoriamente na população para constituir o grupo controle. O projeto de pesquisa teve aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. A coleta foi realizada mediante assinatura de consentimento informado dos sujeitos. Todos os indivíduos foram reunidos através da colaboração do Instituto Hermes Pardini e do Serviço de Neurologia do Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As extrações de DNA foram feitas a partir de sangue periférico, utilizando-se o kit *Puregene* (*Gentra*, EUA) ou a partir dos *swabs* bucais, conforme protocolo adaptado de Sambrook & Russel, 2001. Um segmento da região 5' não-traduzida do gene FMR1 foi amplificado por PCR. Os iniciadores utilizados foram os descritos na literatura (Fu e cols., 1991). Para cada reação de PCR (volume final de 15 µL) foram utilizados 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, (Tampão II - *Accuprime system-Invitrogen*, EUA), 150 µM de 7-deaza-dGTP (*Amersham Pharmacia Biotech*, EUA), 10% de dimetilsulfóxido, 10 pM de cada iniciador, 1,0 U de Taq DNA polimerase (*Accuprime system-Invitrogen*, EUA) e 100 ng de DNA. O programa da reação de PCR consta de: desnaturação inicial de 95° C por 8 min, seguida por 40 ciclos com desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 66°C por 50 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72° C por 8 minutos. Foi utilizado o termociclador Gene Amp PCR System 2400 (*Applied Biosystems*, EUA).

A seguir, foi realizada a eletroforese dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida desnaturante 4% e visualização através do leitor de fluorescência FmbioII (*Hitachi Denshi*, Japão) ou coloração com nitrato de prata para a identificação dos alelos. O tamanho dos alelos e o número de repetições de CGG foi determinado com base em um padrão de peso molecular de DNA (*Power Plex*, *Promega*, EUA) e através do programa Alpha DigDoc 1200&1201 (*Alpha Innotech*, Inglaterra).

## **Resultados**

### **Amplificação da região 5' UTR do gene FMR1**

As reações de PCR para a amplificação de um segmento da região 5' UTR do gene FMR1 foram realizadas para 140 indivíduos do sexo masculino (66 do grupo alvo e 74 do grupo controle). Todas as reações tiveram um rendimento suficiente para a visualização em gel de poliacrilamida

corados com nitrato de prata ou captados pelo leitor de fluorescência FmbioII (*Hitachi Denshi*, Japão).

Na figura 1, pode ser visualizada a separação eletroforética em gel de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. Nas canaletas 3 a 7 foram aplicados os produtos das reações de PCR de diferentes pacientes da amostra alvo. Nas canaletas de 9, 11, 12 e 13, foram aplicados os produtos das reações de PCR de indivíduos da amostra controle. O indivíduo da canaleta 13 é portador de um alelo com um número de repetições na faixa da pré-mutação (controle positivo da PCR). Na canaleta 10 foi aplicado um controle negativo de PCR. Nas canaletas 1 e 14 foi aplicado um marcador de peso molecular de DNA que varia de 254pb a 331pb com intervalos de 4pb (*Power Plex ladder, Promega*, EUA) e nas canaletas 2, 8 e 15 foi aplicado um marcador de peso molecular de DNA de 50pb (*Invitrogen*, EUA).

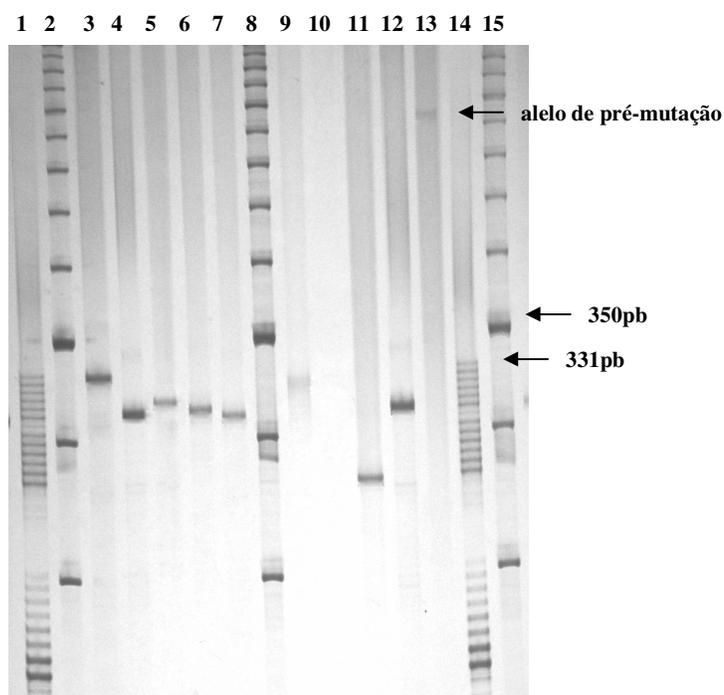


Figura 1: Gel de poliacrilamida 4% corado com prata, mostrando a amplificação do segmento contendo as repetições de CGG do gene FMR1. A seta na canaleta 13 indica um alelo de pré-mutação.

## Freqüências alélicas encontradas nos indivíduos da amostra alvo e controle

Não foram encontrados alelos na faixa da pré-mutação entre os portadores de ataxia, tremor e/ou parkinsonismo. No grupo controle (indivíduos normais) foi encontrado um alelo de pré-mutação. As curvas de distribuição dos alelos nas amostras alvo e controle são mostradas na FIG. 2. Os alelos mais freqüentes foram os que carregam 29 e 30 repetições de CGG, o que está de acordo com dados na literatura (Capelli e cols., 2005; Willemsen e cols., 2005; Van Esch e cols., 2006). Alelos da zona cinzenta foram identificados nos grupos alvo e controle, com freqüências de 3,03% e 2,70%, respectivamente, não diferindo significativamente uma da outra (teste exato de Fisher  $P=0,38$ ). As freqüências encontradas de alelos da zona cinzenta em ambos os grupos estão de acordo com as freqüências observadas em estudos prévios (Haddad e cols., 1999; Garcia Arocena e cols., 2004; Toft e cols., 2005).

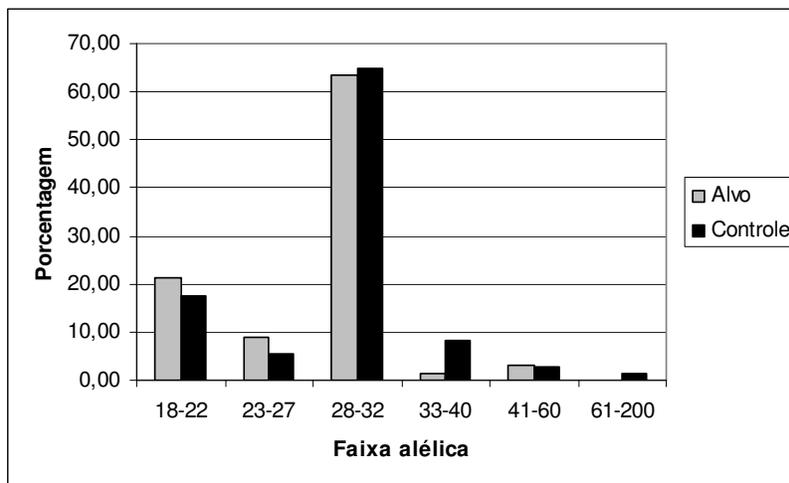


Figura 2: Gráfico representando a porcentagem dos alelos encontrada nas amostras estudadas. Nota: O nome do alelo é dado segundo o número de repetições de CGG encontrado.

## Discussão

Todos os estudos já publicados, investigando a contribuição da pré-mutação para o fenótipo ataxia, tremor e/ou parkinsonismo estão listados na TAB. 1. As amostras variam entre 59 e 243 homens com mais de cinquenta anos. Em algumas delas, o fenótipo é descrito apenas como ataxia, outras testaram fenótipos diversificados. Mesmo naquelas amostras em que o fenótipo foi descrito apenas como ataxia, é possível que tenha havido heterogeneidade, a julgar pelos testes diagnósticos feitos, para doenças como coreia de Huntington ou DRPLA (atrofia dentado-rubro-palido-luysiana). Na maioria das publicações, os pacientes foram submetidos a diagnósticos moleculares. Entretanto, os testes realizados variaram entre as amostras. Alguns trabalhos não incluíram grupo controle (Garcia

Arocena e cols., 2004; Van Esch e cols., 2004; Biancalana e cols., 2005; Brussino e cols., 2005; Seixa e cols., 2005; Toft e cols., 2005; Zuhlke e cols., 2005).

O tamanho amostral variou conforme a estringência do fenótipo averiguado, sendo menores as amostras que colocam como critério a ocorrência de fenótipos compostos em indivíduos com idade preferencialmente superior a 50 anos. Além disto, como o teste molecular baseado em PCR não tem boa sensibilidade em mulheres, algumas das amostras se restringem aos indivíduos do sexo masculino. Por outro lado, a probabilidade de FXTAS será maior se forem afastadas outras causas de ataxia ou distúrbios degenerativos do movimento. Em função disto, as amostras têm sido pequenas.

Tabela 1: Frequência da pré-mutação em FMR1 em grupos de indivíduos com sintomas ataxia, tremor, parkinsonismo e controles em diferentes populações.

Referência	Origem da população	Número de indivíduos	Característica da amostra	Frequência de alelos de zona cinzenta	Frequência de pré-mutação encontrada	Número de indivíduos portador de pré-mutação
Macpherson e cols., 2003	Reino Unido	59 H	Fenótipo:ataxia. Negativos para SCA 1, 2, 3, 6, e 7	Não informado	5%	3 indivíduos
		4493 controles	Meninos com necessidades educacionais especiais e homens normais	Não informado	Não informado	Não informado
Tan e cols., 2004	Ásia	91 H e 76 M	Grupo 1: tremor essencial; grupo 2: provável MSA; grupo 3: baixa resposta à levodopa, disfunção cognitiva, parkinsonismo; grupo 4: SCA com sinais de disfunção cerebelar. Todos os grupos negativos para SCA 1,2,3,6,7,8,10,19,DRPLA e FRDA	0%	Zero	Zero
		200 controles	Mulheres e homens normais	2 (1%)	Zero	Zero
Van Esch e cols., 2004	Bélgica	122 H	Fenótipo:ataxia. Indivíduos com mais de 50 anos. Negativos para SCA 1, 2, 3, 6, e 7	1,64% (2 indivíduos com 45 e 50 CGGs)	4.1%	5 indivíduos
Zühlke e cols. 2004	Alemanha	269 H e 241M	Fenótipo:ataxia. Indivíduos com mais de 50 anos. Negativos para SCA 1, 2, 3, 6, 7, 12 e 17	4,4% (16 homens com repetições de 41 a 53 CGG)	0% H e 0,19% M	1 mulher
Seixa e cols., 2005	Estados unidos	93 H e 140 M	Evidências radiológicas de FXTAS ou SCA; Faixa etária variável (64 homens com mais de 50 anos); Negativos para DRPLA, HD, HDL2 e SCA1,2,3,6,8,12	Não informado	1.56%	1 homem com mais de 50 anos
Brussino e cols., 2005	Itália	275 H	Ataxia da marcha associado variavelmente à disartria, ataxia dos membros e tremor de intenção; Faixa etária 20-82 (143 homens com mais de 50 anos) e negativos para SCA 1,2 e FRDA e alguns também para SCA 3, 6 e 7	Não informado	4.2%	6 homens com mais 50 anos
Presente estudo	Brasil (Minas Gerais)	68 H	Fenótipos: ataxia, tremor, parkinsonismo, coreia e distonia generalizada. Faixa etária: acima de 45 anos	3,03% (2 indivíduos)	Zero	Zero
		74 H	Indivíduos normais	2,70% (2 indivíduos)	1,35%	1 indivíduo

Nota: HDL2-Lipoproteína 2 de alta densidade; HD-Doença de Huntington; FRDA-Ataxia de Friedreich; DRPLA-atrofia dentado-rubro-palido-luisiana; SCA-ataxia espinocerebelar; M-Mulher; H- Homen. A zona cinzenta tem várias definições na literatura.

No presente estudo, os critérios de inclusão de indivíduos na amostra alvo foram homogêneos quanto ao sexo (apenas indivíduos do sexo masculino), idade (a partir de 45 anos) e origem (Estado de Minas Gerais). Os fenótipos testados foram ataxia com ou sem sintomas associados (13,2% dos pacientes) e outros fenótipos do espectro das manifestações das FXTAS, sem ataxia (86,8% dos pacientes). Os indivíduos testados não foram triados sistematicamente para outras ataxias cerebelares e/ou doenças neurodegenerativas, que compartilham estes sintomas e têm frequências mais altas na população. Apenas alguns indivíduos realizaram testes genéticos para ataxias espinocerebelares e Doença de Huntington.

A pequena variação encontrada na frequência da pré-mutação entre os trabalhos (0-5%), pode ser devida aos tamanhos amostrais pequenos, critérios diferenciados de seleção dos pacientes, diferentes *backgrounds* genéticos e ao compartilhamento destes fenótipos com outras doenças neurodegenerativas que possuem frequências mais altas na população. O fato de não termos encontrado portadores de pré-mutação na amostra alvo está de acordo com o descrito na literatura.

Ao considerarmos as averiguações da pré-mutação entre os grupos controles, a frequência encontrada nos indivíduos normais deste estudo (1/74) foi mais alta que as demais, ficando acima também da frequência estimada na população caucasiana, que foi de 13/10.572 (Dombrowski e cols.,2002). Esta diferença pode implicar uma frequência de pré-mutação realmente mais alta na população brasileira, para a qual não existem averiguações, mas pode também ser um evento casual, (teste exato de Fisher  $P= 0,09$ ) condicionado pelo tamanho pequeno do grupo controle em relação à frequência da pré-mutação descrita em outras populações. Já a diferença da frequência observada entre as amostras alvo (0/66) e controle (1/74) do presente estudo não foi significativa (teste exato de Fisher  $P= 0,53$ ).

Em relação aos alelos de zona cinzenta, a frequência observada nos grupos de pacientes dos diversos estudos é semelhante às descritas nos controles, quando a informação está disponível (TAB. 1). As frequências de alelos de zona cinzenta anteriormente descritas na literatura variam de 2-5% (Haddad e cols., 1999; Garcia Arocena e cols., 2004; Toft e cols., 2005). As frequências de alelos na amostra alvo e no grupo controle do presente estudo estão dentro deste intervalo. Já para indivíduos com retardo da população brasileira, já foi descrito um excesso de alelos de zona cinzenta (Haddad e cols., 1999).

Analisando os trabalhos mostrados na TAB. 1, foram testados 748 homens com 50 anos ou mais, que apresentavam fenótipos correlatos à FXTAS, tendo sido identificados 15 portadores de pré-mutação, resultando em uma contribuição média de 15/748, ou seja, de aproximadamente 2,0%. Quanto às mulheres, foram testadas 457, sendo encontrada apenas

uma portadora de pré-mutação em FMR1, dando uma contribuição média de 0,22%. Além da frequência mais baixa, as manifestações fenotípicas nas mulheres também são mais brandas (Jacquemont e cols., 2004; Hagerman e cols., 2004; Berry-Kravis e cols., 2005).

Duas hipóteses têm sido aventadas para justificar estes resultados: a) um efeito sexo-específico, porque mulheres com reposição hormonal de estrógenos apresentam sintomas mais brandos de FXTAS; b) inativação preferencial do cromossoma X contendo a pré-mutação em FMR1. De fato, foi demonstrado que mulheres expressando predominantemente o cromossoma X com a pré-mutação em FMR1 apresentam manifestações clínicas semelhantes às observadas nos homens (Hagerman e cols., 2004; Berry-Kravis e cols., 2005).

Nos últimos três anos tem se observado na literatura uma ampliação do fenótipo associado à pré-mutação em FMR1. O fenótipo FXTAS descrito originalmente foi descoberto nos homens portadores de pré-mutação em famílias onde segrega o retardo mental familiar 1. Estes pacientes apresentavam manifestações clínicas variadas, alguns com ataxia, tremor e parkinsonismo, outros com combinações variadas destes sintomas, ou mesmo com apenas um deles (Hagerman & Hagerman, 2001; Hagerman e cols., 2001; Greco, e cols., 2002; Jacquemont e cols., 2003). Progressivamente, outros sintomas foram adicionados ao quadro clínico: distúrbios autonômicos, convulsões, perda de habilidades cognitivas, ansiedade, demência, resultados de teste de QI no limite inferior do normal, instabilidade emocional, surdez, distúrbios obsessivo-compulsivos, personalidade esquizotípica e/ou depressão, irritabilidade exacerbada e episódios de perda de auto-controle. Alguns dos pacientes apresentam atrofia cerebral ou cerebelar difusas, neuropatia periférica, distúrbios sensitivos (Hagerman & Hagerman, 2004b; Jacquemont e cols., 2004a; Van Dam e cols., 2005). Cabe ressaltar que muitos dos sintomas descritos são frequentes na faixa etária dos afetados por FXTAS e que podem representar associações fortuitas.

Alguns achados são sugestivos do diagnóstico, como a presença de inclusões nucleares eosinofílicas nos neurônios e astrócitos (Greco e cols., 2002; Hagerman & Hagerman, 2004b), acentuação da intensidade do sinal T2 no pedúnculo cerebelar médio ou atrofia cerebral, às custas de redução de substância branca (Hagerman e cols., 2004).

Outra questão é a contribuição da FXTAS para os distúrbios do movimento de um modo geral. Já foram testados indivíduos com Doença de Parkinson (414 indivíduos), tremor essencial (81 sujeitos) e atrofia de múltiplos sistemas (123 pacientes). Aparentemente, estes fenótipos não são causados pela pré-mutação em FMR1 (Toft e cols., 2005; Garcia Arocena e cols., 2004; Biancalana e cols., 2005).

A idade de início e o curso clínico da FXTAS variam muito entre os pacientes. A doença progride, levando ao óbito em 10 a 15 anos. Este quadro clínico apresenta aumento da penetrância em função da idade. A variação da penetrância foi estimada de 17 a 75% entre os 50 e os 80 anos ou mais (Jacquemont e cols., 2004). Isto coloca a pergunta de que outros fatores condicionam o aparecimento dos sintomas. As possibilidades são a interação de alelos recessivos em outros loci, herança digênica e herança multifatorial. Fatores ambientais não foram descritos. Já existe na literatura a descrição do fenótipo ataxia apresentando pré-mutação em FMR1 e mutação no gene FRDA, da ataxia de Friedreich, em uma mulher de 58 anos (Zumrova e cols., 2005). Em função da sobreposição de sintomas com doenças comuns, é possível que os outros fatores desencadeantes sejam heterogêneos.

### Referências Bibliográficas

**Baba, Y. and Uitti, R.J.** (2005). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and movements disorders. *Curr Opin Neurol* 18: 393-8.

**Berry-Kravis, E., Potanos, K., Weinberg, D., Zhou, L. and Goetz, C.G.** (2005). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation. *Ann Neurol* 57: 144-7.

**Biancalana, V., Toft, M., Le Ber, I., Tison, F., Scherrer, E., Thibodeau, S., Mandel, J.L., Brice, A., Farrer, M.J. and Durr, A.** (2005). FMR1 premutations associated with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in multiple system atrophy. *Arch Neurol* 62: 962-6.

**Brunberg, J. A., Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E. M., Grigsby, J., Leehey, M. A., Tassone, F., Brown, W. T., Greco, C. M. and Hagerman, P. J.** (2002). Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23: 1757-66.

**Brussino, A., Gellera, C., Saluto, A., Mariotti, C., Arduino, C., Castellotti, B., Camerlingo, M., de Angelis, V., Orsi, L., Tosca, P., Migone, N., Taroni, F. and Brusco, A.** (2005). FMR1 gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. *Neurology* 64: 145-7.

**Capelli, L. P., Mingroni-Netto, R. C. and Vianna-Morgante, A. M.** (2005) Structure and stability upon maternal transmission of common and intermediate FMR1

(Fragile X Mental Retardation 1) alleles in a sample of the Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology* 28, 1, 10-15.

**de Vries, B.B., van den Ouweland, A.M., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H.J., Mol, E., Gelsema, K., van Rijn, M., Halley, D.J., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., Tibben, A. and Niermeijer, M.F.** (1997). Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 61: 660-7.

**de Vries, B.B., Mohkamsing, S., van den Ouweland, A.M., Mol, E., Gelsema, K., van Rijn, M., Tibben, A., Halley, D.J., Duivenvoorden, H.J., Oostra, B.A. and Niermeijer, M.F.** (1999). Screening for the fragile X syndrome among the mentally retarded: a clinical study. The Collaborative Fragile X Study Group. *J Med Genet* 36: 467-70.

**Dombrowski, C., Levesque, S., Morel, M.L., Rouillard, P., Morgan, K. and Rousseau, F.** (2002). Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet* 11: 371-8.

**Flannery, A. V., Hirst, M. C., Knight, S. J., Ritchie, R. J. and Davies, K. E.** (1995). The fragile X syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 1271: 293-303.

**Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J., Holden, J.J., Fenwick, R.G., Jr., Warren, S.T. and et al.** (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-58.

**Garcia Arocena, D., Louis, E.D., Tassone, F., Gilliam, T.C., Ottman, R., Jacquemont, S. and Hagerman, P.J.** (2004). Screen for expanded FMR1 alleles in patients with essential tremor. *Mov Disord* 19: 930-3.

**Greco, C. M., Hagerman, R. J., Tassone, F., Chudley, A. E., Del Bigio, M. R., Jacquemont, S., Leehey, M. and Hagerman, P. J.** (2002). Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain*. 125: 1760-71.

**Greco, C.M., Berman, R.F., Martin, R.M., Tassone, F., Schwartz, P.H., Chang, A., Trapp, B.D., Iwahashi, C., Brunberg, J., Grigsby, J., Hessel, D., Becker, E.J., Papazian, J., Leehey, M.A., Hagerman, R.J. and Hagerman, P.J.** (2006). Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain* 129: 243-55.

**Haddad, L.A., Aguiar, M.J., Costa, S.S., Mingroni-Netto, R.C., Vianna-Morgante, A.M. and Pena, S.D.** (1999). Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet* 84: 198-201.

**Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2001). fragile X syndrome: A model of gene brain behaviour relationships. *Rev Neurol.* 33 Suppl 1: S51-7.

**Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2004a). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10: 25-30.

**Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2004b). The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet.* 74: 805-16.

**Hagerman, R. J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B. and Hagerman, P. J.** (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 57: 127-30.

**Hagerman, R. J., Leavitt, B. R., Farzin, F., Jacquemont, S., Greco, C. M., Brunberg, J. A., Tassone, F., Hessler, D., Harris, S. W., Zhang, L., Jardini, T., Gane, L. W., Ferranti, J., Ruiz, L., Leehey, M. A., Grigsby, J. and Hagerman, P. J.** (2004). Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet.* 74: 1051-6.

**Hall, D.A., Berry-Kravis, E., Jacquemont, S., Rice, C.D., Cogswell, J., Zhang, L., Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. and Leehey, M.A.** (2005). Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 65: 299-301.

**Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M. A., Hall, D. A., Levine, R. A., Brunberg, J. A., Zhang, L., Jardini, T., Gane, L. W., Harris, S. W., Herman, K., Grigsby, J., Greco, C. M., Berry-Kravis, E., Tassone, F. and Hagerman, P. J.** (2004). Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *Jama.* 291: 460-9.

**Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J. A., Greco, C., Des Portes, V., Jardini, T., Levine, R., Berry-Kravis, E., Brown, W. T., Schaeffer, S., Kissel, J., Tassone, F. and Hagerman, P. J.** (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet.* 72: 869-78.

**Jin, P. and Warren, S. T.** (2003). New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci.* 28: 152-8.

**Jin, P., Zarnescu, D. C., Zhang, F., Pearson, C. E., Lucchesi, J. C., Moses, K. and Warren, S. T.** (2003). RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron.* 39: 739-47.

**Kamm, C. and Gasser, T.** (2005). The variable phenotype of FXTAS: a common cause of "idiopathic" disorders. *Neurology* 65: 190-1.

**Leehey, M. A., Munhoz, R. P., Lang, A. E., Brunberg, J. A., Grigsby, J., Greco, C., Jacquemont, S., Tassone, F., Lozano, A. M., Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2003). The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch Neurol.* 60: 117-21.

**Macpherson, J., Waghorn, A., Hammans, S. and Jacobs, P.** (2003). Observation of an excess of fragile-X premutations in a population of males referred with spinocerebellar ataxia. *Hum Genet* 112: 619-20.

**Mandel, J. L. and Biancalana, V.** (2004). Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res.* 14 Suppl A: S158-65.

**Murray, A., Youngs, S., Dennis, N., Latsky, L., Linehan, P., McKechnie, N., Macpherson, J., Pound, M. and Jacobs, P.** (1996). Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 5: 727-35.

**Oostra, B. A. and Willemsen, R.** (2003). A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet.* 12 Spec No 2: R249-57.

**Rogers, C., Partington, M. W. and Turner, G. M.** (2003). Tremor, ataxia and dementia in older men may indicate a carrier of the fragile X syndrome. *Clin Genet.* 64: 54-6.

**Rousseau, F., Rouillard, P., Morel, M.L., Khandjian, E.W. and Morgan, K.** (1995). Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 57: 1006-18.

**Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001). Rapid isolation of mammalian DNA In: *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press) Cold Spring Harbor, New York, pp. 6.28-6.30

**Seixas, A.I., Maurer, M.H., Lin, M., Callahan, C., Ahuja, A., Matsuura, T., Ross, C.A., Hisama, F.M., Silveira, I. and Margolis, R.L.** (2005). FXTAS, SCA10, and SCA17 in American patients with movement disorders. *Am J Med Genet A* 136: 87-9.

**Tan, E. K., Zhao, Y., Puong, K. Y., Law, H. Y., Chan, L. L., Yew, K., Tan, C., Shen, H., Chandran, V. R., Teoh, M. L., Yih, Y., Pavanni, R., Wong, M. C. and Ng, I. S.** (2004). Fragile X premutation alleles in SCA, ET, and parkinsonism in an Asian cohort. *Neurology.* 63: 362-3.

**Toft, M., Aasly, J., Bisceglia, G., Adler, C.H., Uitti, R.J., Krygowska-Wajs, A., Lynch, T., Wszolek, Z.K. and Farrer, M.J.** (2005). Parkinsonism, FXTAS, and FMR1 premutations. *Mov Disord* 20: 230-3.

**Turner, G., Webb, T., Wake, S. and Robinson, H.** (1996). Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 64: 196-7.

**Van Dam, D., Errijgers, V., Kooy, R.F., Willemsen, R., Mientjes, E., Oostra, B.A. and De Deyn, P.P.** (2005). Cognitive decline, neuromotor and behavioural disturbances in a mouse model for fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Behav Brain Res* 162: 233-9.

**Van Esch, H.** (2006). The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet* 49: 1-8.

**Van Esch, H., Dom, R., Bex, D., Salden, I., Caeckebeke, J., Wibail, A., Borghgraef, M., Legius, E., Fryns, J.P. and Matthijs, G.** (2004). Screening for FMR-1 premutations in 122 older Flemish males presenting with ataxia. *Eur J Hum Genet* 13: 121-3.

**Willemsen, R., Hoogeveen-Westerveld, M., Reis, S., Holstege, J., Severijnen, L. A., Nieuwenhuizen, I. M., Schrier, M., van Unen, L., Tassone, F., Hoogeveen, A. T., Hagerman, P. J., Mientjes, E. J. and Oostra, B. A.** (2003). The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet.* 12: 949-59.

**Willemsen, R., Mientjes, E. and Oostra, B.A.** (2005). FXTAS: a progressive neurologic syndrome associated with Fragile X premutation. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 405-10.

**Zuhlke, C., Budnik, A., Gehlken, U., Dalski, A., Purmann, S., Naumann, M., Schmidt, M., Burk, K. and Schwinger, E.** (2004). FMR1 premutation as a rare cause of late onset ataxia--evidence for FXTAS in female carriers. *J Neurol* 251: 1418-9.

**Zumrova, A., Mazanec, R., Vyhnalek, M., Krepelova, A., Musova, Z., Krilova, S., Appltova, L. and Havlovicova, M.** (2005). Concomitancy of mutation in FRDA gene and FMR1 premutation in 58 year-old woman. *Neuro Endocrinol Lett* 26: 71-4.

## 4. Conclusões

- Em uma revisão crítica da literatura e incluindo-se os dados do presente trabalho, foram identificados 15 portadores de pré-mutação em 748 homens triados, resultando em uma frequência média de 2%, com um intervalo de variação de 0-5%. Quanto às mulheres, foram testadas 457, sendo encontrada apenas uma portadora de pré-mutação em FMR1, dando uma contribuição média de 0,22%.
- Não foram encontrados portadores de pré-mutação no grupo alvo, o que está de acordo com a frequência observada em outros trabalhos, que variou de 0-5%.
- Alelos da zona cinzenta foram identificados nos grupos alvo e controle, com frequências de 3,03% e 2,70%, respectivamente, não diferindo significativamente uma da outra (Teste exato de Fisher  $P=0,38$ ).
- A frequência observada da pré-mutação nas amostras alvo (0/66) e controle (1/74) não diferiram significativamente entre si (Teste exato de Fisher  $P=0,53$ ).
- A frequência de pré-mutação encontrada nos indivíduos normais deste estudo (1/74) foi mais alta que a frequência estimada na população caucasiana, que é de 13/10.572 (Dombrowski e cols., 2002). Esta diferença pode implicar uma frequência de pré-mutação realmente mais alta na população brasileira, para a qual não existem averiguações, mas pode também ser um evento casual (Teste exato de Fisher  $P=0,09$ ) condicionado pelo tamanho pequeno do grupo controle em relação à frequência da pré-mutação descrita em outras populações.
- A metodologia de PCR é eficaz na detecção da pré-mutação em indivíduos do sexo masculino. Conforme já descrito na literatura, para os indivíduos do sexo feminino, o teste mais apropriado seria o *Southern blot*, devido à amplificação preferencial de alelos com pequenas expansões em heterozigose com alelos com grandes expansões e devido à frequência considerável de homozigose para os alelos mais comuns (Snow e cols., 1993; Haddad e cols., 1996).
- Os fenótipos relacionados à FXTAS são compartilhados por outras doenças neurodegenerativas. Mediante o pequeno número de trabalhos sobre este assunto é desejável que estudos colaborativos sejam feitos para o esclarecimento da contribuição da FXTAS para estes fenótipos.

## 5. Referências Bibliográficas

**Baba, Y. and Uitti, R.J.** (2005). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and movements disorders. *Curr Opin Neurol* 18: 393-8.

**Bardoni, B. and Mandel, J. L.** (2002). Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 284-93.

**Beilina, A., Tassone, F., Schwartz, P. H., Sahota, P. and Hagerman, P. J.** (2004). Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. *Hum Mol Genet.* 13: 543-9.

**Berry-Kravis, E., Potanos, K., Weinberg, D., Zhou, L. and Goetz, C.G.** (2005). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation. *Ann Neurol* 57: 144-7.

**Biancalana, V., Toft, M., Le Ber, I., Tison, F., Scherrer, E., Thibodeau, S., Mandel, J.L., Brice, A., Farrer, M.J. and Durr, A.** (2005). FMR1 premutations associated with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in multiple system atrophy. *Arch Neurol* 62: 962-6.

**Brunberg, J. A., Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E. M., Grigsby, J., Leehey, M. A., Tassone, F., Brown, W. T., Greco, C. M. and Hagerman, P. J.** (2002). Fragile X premutation carriers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23: 1757-66.

**Brussino, A., Gellera, C., Saluto, A., Mariotti, C., Arduino, C., Castellotti, B., Camerlingo, M., de Angelis, V., Orsi, L., Tosca, P., Migone, N., Taroni, F. and Brusco, A.** (2005). FMR1 gene premutation is a frequent genetic cause of late-onset sporadic cerebellar ataxia. *Neurology* 64: 145-7.

**Capelli, L. P., Mingroni-Netto, R. C. and Vianna-Morgante, A. M.** (2005) Structure and stability upon maternal transmission of common and intermediate FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) alleles in a sample of the Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology* 28, 1, 10-15.

**Chen, L. S., Tassone, F., Sahota, P. and Hagerman, P. J.** (2003a). The (CGG)<sub>n</sub> repeat element within the 5' untranslated region of the FMR1 message provides both positive and negative cis effects on in vivo translation of a downstream reporter. *Hum Mol Genet.* 12: 3067-74.

**Chen, L., Yun, S.W., Seto, J., Liu, W. and Toth, M.** (2003b). The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience* 120: 1005-17.

**Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T. and Darnell, R. B.** (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*. 107: 489-99.

**de Vries, B.B., van den Ouweland, A.M., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H.J., Mol, E., Gelsema, K., van Rijn, M., Halley, D.J., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., Tibben, A. and Niermeijer, M.F.** (1997). Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 61: 660-7.

**de Vries, B.B., Mohkamsing, S., van den Ouweland, A.M., Mol, E., Gelsema, K., van Rijn, M., Tibben, A., Halley, D.J., Duivenvoorden, H.J., Oostra, B.A. and Niermeijer, M.F.** (1999). Screening for the fragile X syndrome among the mentally retarded: a clinical study. The Collaborative Fragile X Study Group. *J Med Genet* 36: 467-70.

**Denman, R. B.** (2003). Deja vu all over again: FMRP binds U-rich target mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 310: 1-7.

**Dombrowski, C., Levesque, S., Morel, M.L., Rouillard, P., Morgan, K. and Rousseau, F.** (2002). Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet* 11: 371-8.

**Flannery, A. V., Hirst, M. C., Knight, S. J., Ritchie, R. J. and Davies, K. E.** (1995). The fragile X syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 1271: 293-303.

**Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J., Holden, J.J., Fenwick, R.G., Jr., Warren, S.T. and et al.** (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-58.

**Garcia Arocena, D., Louis, E.D., Tassone, F., Gilliam, T.C., Ottman, R., Jacquemont, S. and Hagerman, P.J.** (2004). Screen for expanded FMR1 alleles in patients with essential tremor. *Mov Disord* 19: 930-3.

**Greco, C. M., Hagerman, R. J., Tassone, F., Chudley, A. E., Del Bigio, M. R., Jacquemont, S., Leehey, M. and Hagerman, P. J.** (2002). Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain*. 125: 1760-71.

**Greco, C.M., Berman, R.F., Martin, R.M., Tassone, F., Schwartz, P.H., Chang, A., Trapp, B.D., Iwahashi, C., Brunberg, J., Grigsby, J., Hessler, D., Becker, E.J., Papazian, J., Leehey, M.A., Hagerman, R.J. and Hagerman, P.J.** (2006). Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain* 129: 243-55.

**Greenough, W.T., Klintsova, A.Y., Irwin, S.A., Galvez, R., Bates, K.E. and Weiler, I.J.** (2001). Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7101-6.

**Haddad, L.A., Mingroni-Netto, R.C., Vianna-Morgante, A.M. and Pena, S.D.** (1996). A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet* 97: 808-12.

**Haddad, L.A., Aguiar, M.J., Costa, S.S., Mingroni-Netto, R.C., Vianna-Morgante, A.M. and Pena, S.D.** (1999). Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet* 84: 198-201.

**Hagerman, P. J., Greco, C. M. and Hagerman, R. J.** (2003). A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X premutation carriers. *Cytogenet Genome Res.* 100: 206-12

**Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2001). fragile X syndrome: A model of gene brain behaviour relationships. *Rev Neurol.* 33 Suppl 1: S51-7.

**Hagerman, R. J. and Hagerman, P. J.** (2002). The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 278-83.

**Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2004a). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10: 25-30.

**Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2004b). The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet.* 74: 805-16.

**Hagerman, R. J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B. and Hagerman, P. J.** (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 57: 127-30.

**Hagerman, R. J., Leavitt, B. R., Farzin, F., Jacquemont, S., Greco, C. M., Brunberg, J. A., Tassone, F., Hessler, D., Harris, S. W., Zhang, L., Jardini, T., Gane, L. W., Ferranti, J., Ruiz, L., Leehey, M. A., Grigsby, J. and Hagerman, P. J.** (2004). Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet.* 74: 1051-6.

**Hall, D.A., Berry-Kravis, E., Jacquemont, S., Rice, C.D., Cogswell, J., Zhang, L., Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. and Leehey, M.A.** (2005). Initial diagnoses given to

persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 65: 299-301.

**Hessl, D., Tassone, F., Loesch, D.Z., Berry-Kravis, E., Leehey, M.A., Gane, L.W., Barbato, I., Rice, C., Gould, E., Hall, D.A., Grigsby, J., Wegelin, J.A., Harris, S., Lewin, F., Weinberg, D., Hagerman, P.J. and Hagerman, R.J.** (2005). Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139: 115-21.

**Huang, Y. S. and Richter, J. D.** (2004). Regulation of local mRNA translation. *Curr Opin Cell Biol.* 16: 308-13.

**Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T. and Bear, M. F.** (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 7746-50.

**Iwahashi, C.K., Yasui, D.H., An, H.J., Greco, C.M., Tassone, F., Nannen, K., Babineau, B., Lebrilla, C.B., Hagerman, R.J. and Hagerman, P.J.** (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain* 129: 256-71.

**Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J. A., Greco, C., Des Portes, V., Jardini, T., Levine, R., Berry-Kravis, E., Brown, W. T., Schaeffer, S., Kissel, J., Tassone, F. and Hagerman, P. J.** (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet.* 72: 869-78.

**Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M. A., Hall, D. A., Levine, R. A., Brunberg, J. A., Zhang, L., Jardini, T., Gane, L. W., Harris, S. W., Herman, K., Grigsby, J., Greco, C. M., Berry-Kravis, E., Tassone, F. and Hagerman, P. J.** (2004a). Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *Jama.* 291: 460-9.

**Jacquemont, S., Farzin, F., Hall, D., Leehey, M., Tassone, F., Gane, L., Zhang, L., Grigsby, J., Jardini, T., Lewin, F., Berry-Kravis, E., Hagerman, P.J. and Hagerman, R.J.** (2004b). Aging in individuals with the FMR1 mutation. *Am J Ment Retard* 109: 154-64.

**Jacquemont, S., Orrico, A., Galli, L., Sahota, P.K., Brunberg, J.A., Anichini, C., Leehey, M., Schaeffer, S., Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. and Tassone, F.** (2005). Spastic paraparesis, cerebellar ataxia, and intention tremor: a severe variant of FXTAS? *J Med Genet* 42: e14.

**Jin, P. and Warren, S. T.** (2003). New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci.* 28: 152-8.

**Jin, P., Zarnescu, D. C., Zhang, F., Pearson, C. E., Lucchesi, J. C., Moses, K. and Warren, S. T.** (2003). RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron*. 39: 739-47.

**Kamm, C. and Gasser, T.** (2005a). The variable phenotype of FXTAS: a common cause of "idiopathic" disorders. *Neurology* 65: 190-1.

**Kamm, C., Healy, D.G., Quinn, N.P., Wullner, U., Moller, J.C., Schols, L., Geser, F., Burk, K., Borglum, A.D., Pellecchia, M.T., Tolosa, E., del Sorbo, F., Nilsson, C., Bandmann, O., Sharma, M., Mayer, P., Gasteiger, M., Haworth, A., Ozawa, T., Lees, A.J., Short, J., Giunti, P., Holinski-Feder, E., Illig, T., Wichmann, H.E., Wenning, G.K., Wood, N.W. and Gasser, T.** (2005b). The fragile X tremor ataxia syndrome in the differential diagnosis of multiple system atrophy: data from the EMSA Study Group. *Brain* 128: 1855-60.

**Kooy, R.F.** (2003). Of mice and the fragile X syndrome. *Trends Genet* 19: 148-54.

**Kooy, R. F., Willemsen, R. and Oostra, B. A.** (2000). Fragile X syndrome at the turn of the century. *Mol Med Today*. 6: 193-8.

**Leehey, M. A., Munhoz, R. P., Lang, A. E., Brunberg, J. A., Grigsby, J., Greco, C., Jacquemont, S., Tassone, F., Lozano, A. M., Hagerman, P. J. and Hagerman, R. J.** (2003). The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch Neurol*. 60: 117-21.

**Macpherson, J., Waghorn, A., Hammans, S. and Jacobs, P.** (2003). Observation of an excess of fragile-X premutations in a population of males referred with spinocerebellar ataxia. *Hum Genet* 112: 619-20.

**Mandel, J. L. and Biancalana, V.** (2004). Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res*. 14 Suppl A: S158-65.

**Murray, A., Youngs, S., Dennis, N., Latsky, L., Linehan, P., McKechnie, N., Macpherson, J., Pound, M. and Jacobs, P.** (1996). Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 5: 727-35.

**OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man**

**<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>**

**Oostra, B. A.** (2002). Functions of the fragile X protein. *Trends Mol Med*. 8: 102-3.

**Oostra, B. A. and Willemsen, R.** (2003). A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet*. 12 Spec No 2: R249-57.

**Primerano, B., Tassone, F., Hagerman, R. J., Hagerman, P., Amaldi, F. and Bagni, C.** (2002). Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *Rna*. 8: 1482-8.

**Rogers, C., Partington, M. W. and Turner, G. M.** (2003). Tremor, ataxia and dementia in older men may indicate a carrier of the fragile X syndrome. *Clin Genet*. 64: 54-6.

**Rousseau, F., Rouillard, P., Morel, M.L., Khandjian, E.W. and Morgan, K.** (1995). Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 57: 1006-18.

**Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001). Rapid isolation of mammalian DNA In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press) Cold Spring Harbor, New York, pp. 6.28-6.30

**Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Moine, H.** (2003). The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell*. 95: 221-8.

**Seixas, A.I., Maurer, M.H., Lin, M., Callahan, C., Ahuja, A., Matsuura, T., Ross, C.A., Hisama, F.M., Silveira, I. and Margolis, R.L.** (2005). FXTAS, SCA10, and SCA17 in American patients with movement disorders. *Am J Med Genet A* 136: 87-9.

**Snow, K. Doud, L. K., Hagerman, R., Pergolizzi, R.G.** (1993) Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am. J.Hum. Genet*. v.53, 1217-1228.

**Sullivan, A.K., Crawford, D.C., Scott, E.H., Leslie, M.L. and Sherman, S.L.** (2002). Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. *Am J Hum Genet* 70: 1532-44.

**Sung, Y. J., Conti, J., Currie, J. R., Brown, W. T. and Denman, R. B.** (2000). RNAs that interact with the fragile X syndrome RNA binding protein FMRP. *Biochem Biophys Res Commun*. 275: 973-80.

**Tan, E. K., Zhao, Y., Puong, K. Y., Law, H. Y., Chan, L. L., Yew, K., Tan, C., Shen, H., Chandran, V. R., Teoh, M. L., Yih, Y., Pavanni, R., Wong, M. C. and Ng, I. S.** (2004). Fragile X premutation alleles in SCA, ET, and parkinsonism in an Asian cohort. *Neurology*. 63: 362-3.

**Tassone, F. and Hagerman, P. J.** (2003). Expression of the FMR1 gene. *Cytogenet Genome Res*. 100: 124-8.

**Tassone, F., Hagerman, R.J., Garcia-Arocena, D., Khandjian, E.W., Greco, C.M. and Hagerman, P.J.** (2004). Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *J Med Genet* 41: 43.

**Toft, M., Aasly, J., Bisceglia, G., Adler, C.H., Uitti, R.J., Krygowska-Wajs, A., Lynch, T., Wszolek, Z.K. and Farrer, M.J.** (2005). Parkinsonism, FXTAS, and FMR1 premutations. *Mov Disord* 20: 230-3.

**Turner, G., Webb, T., Wake, S. and Robinson, H.** (1996). Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 64: 196-7.

**Van Dam, D., Errijgers, V., Kooy, R.F., Willemsen, R., Mientjes, E., Oostra, B.A. and De Deyn, P.P.** (2005). Cognitive decline, neuromotor and behavioural disturbances in a mouse model for fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Behav Brain Res* 162: 233-9.

**Van Esch, H., Matthijs, G. and Fryns, J.P.** (2005). Should we screen for FMR1 premutations in female subjects presenting with ataxia? *Ann Neurol* 57: 932-3.

**Van Esch, H.** (2006). The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet* 49: 1-8.

**Van Esch, H., Dom, R., Bex, D., Salden, I., Caeckebeke, J., Wibail, A., Borghgraef, M., Legius, E., Fryns, J.P. and Matthijs, G.** (2004). Screening for FMR-1 premutations in 122 older Flemish males presenting with ataxia. *Eur J Hum Genet* 13: 121-3.

**Willemsen, R., Hoogeveen-Westerveld, M., Reis, S., Holstege, J., Severijnen, L. A., Nieuwenhuizen, I. M., Schrier, M., van Unen, L., Tassone, F., Hoogeveen, A. T., Hagerman, P. J., Mientjes, E. J. and Oostra, B. A.** (2003). The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet.* 12: 949-59.

**Willemsen, R., Mientjes, E. and Oostra, B.A.** (2005). FXTAS: a progressive neurologic syndrome associated with Fragile X premutation. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5: 405-10.

**Zuhlke, C., Budnik, A., Gehlken, U., Dalski, A., Purmann, S., Naumann, M., Schmidt, M., Burk, K. and Schwinger, E.** (2004). FMR1 premutation as a rare cause of late onset ataxia--evidence for FXTAS in female carriers. *J Neurol* 251: 1418-9.

## **Apêndice A**

Tabela mostrando a origem e o fenótipo de cada indivíduo do grupo alvo.

<b>No.</b>	<b>Origem</b>	<b>Nº do DNA</b>	<b>Fenótipo</b>
1	Instituto H. Pardini	3	Ataxia
2	Instituto H. Pardini	4	Ataxia
3	Instituto H. Pardini	6	Ataxia
4	Instituto H. Pardini	7	Ataxia
5	Instituto H. Pardini	9	Coréia
6	Instituto H. Pardini	18	Coréia
7	Instituto H. Pardini	19	Coréia
8	Instituto H. Pardini	20	Coréia
9	Instituto H. Pardini	22	Coréia
10	Instituto H. Pardini	29	Coréia
11	Instituto H. Pardini	31	Coréia
12	Instituto H. Pardini	37	Ataxia
13	Instituto H. Pardini	47	Ataxia
14	Instituto H. Pardini	50	Coréia
15	Instituto H. Pardini	51	Coréia
16	Instituto H. Pardini	52	Coréia
17	Amb. Bias Fortes	508	Tremor e marcha alterada
18	Amb. Bias Fortes	519	Tremor
19	Amb. Bias Fortes	521	Parkinsonismo e Tremor
20	Amb. Bias Fortes	522	Parkinsonismo
21	Amb. Bias Fortes	523	Parkinsonismo
22	Amb. Bias Fortes	524	Parkinsonismo
23	Amb. Bias Fortes	527	Tremor
24	Amb. Bias Fortes	546	Parkinsonismo
25	Amb. Bias Fortes	551	Parkinsonismo
26	Amb. Bias Fortes	547	Parkinsonismo
27	Amb. Bias Fortes	603	Parkinsonismo e Tremor
28	Amb. Bias Fortes	604	Tremor
29	Amb. Bias Fortes	605	Tremor
30	Amb. Bias Fortes	606	Parkinsonismo e Tremor
31	Amb. Bias Fortes	607	Tremor
32	Amb. Bias Fortes	610	Tremor
33	Amb. Bias Fortes	611	Parkinsonismo
34	Amb. Bias Fortes	724	Parkinsonismo
35	Amb. Bias Fortes	726	Parkinsonismo
36	Amb. Bias Fortes	728	Tremor
37	Amb. Bias Fortes	830	Parkinsonismo
38	Amb. Bias Fortes	831	Parkinsonismo
39	Amb. Bias Fortes	879	Tremor
40	Amb. Bias Fortes	881	Parkinsonismo e distonia focal
41	Amb. Bias Fortes	883	Parkinsonismo
42	Amb. Bias Fortes	885	Coréia e declínio cognitivo

43	Amb. Bias Fortes	887	Tremor
44	Amb. Bias Fortes	888	Parkinsonismo
45	Amb. Bias Fortes	889	Parkinsonismo e Tremor
46	Amb. Bias Fortes	890	Parkinsonismo
47	Amb. Bias Fortes	893	Tremor
48	Amb. Bias Fortes	895	Tremor essencial
49	Amb. Bias Fortes	896	Ataxia da marcha
50	Amb. Bias Fortes	899	Tremor
51	Amb. Bias Fortes	900	Ataxia
52	Amb. Bias Fortes	916	Distonia generalizada
53	Amb. Bias Fortes	917	Distonia generalizada
54	Amb. Bias Fortes	921	Parkinsonismo
55	Amb. Bias Fortes	925	Tremor
56	Amb. Bias Fortes	930	Parkinsonismo
57	Amb. Bias Fortes	931	Parkinsonismo e Tremor
58	Amb. Bias Fortes	950	Espasmo hemifacial e Tremor
59	Amb. Bias Fortes	951	Parkinsonismo
60	Amb. Bias Fortes	952	Parkinsonismo
61	Amb. Bias Fortes	953	Tremor
62	Amb. Bias Fortes	954	Parkinsonismo e marcha alterada
63	Amb. Bias Fortes	972	Parkinsonismo
64	Amb. Bias Fortes	970	Parkinsonismo
65	Amb. Bias Fortes	974	Parkinsonismo
66	Amb. Bias Fortes	971	Tremor

## **Apêndice B**

Aqui entra a cópia da aprovação do comitê

## **Apêndice C**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)