

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Bruna Serrão de Oliveira

**ANÁLISE RETROSPECTIVA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA DE
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL PELA
METODOLOGIA DE PCR CONVENCIONAL**

Porto Alegre

2017

Bruna Serrão de Oliveira

**ANÁLISE RETROSPECTIVA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA DE
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL PELA
METODOLOGIA DE PCR CONVENCIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dra. Sandra Leistner Segal

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Bruna Serrão
Análise retrospectiva por PCR metilação específica
de pacientes diagnosticados com síndrome do X frágil
pela metodologia de PCR convencional / Bruna Serrão
Oliveira. -- 2017.
38 f.
Orientadora: Sandra Leistner Segal.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Síndrome do X frágil. 2. PCR-metilação específica
. 3. Expansão CGG . 4. Diagnóstico molecular. I.
Leistner Segal, Sandra, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bruna Serrão de Oliveira

**ANÁLISE RETROSPECTIVA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA DE
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM SÍNDROME DO X-FRÁGIL PELA
METODOLOGIA DE PCR CONVENCIONAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Nome do professor - instituição

Nome do professor - instituição

Nome do professor - instituição (orientador)

RESUMO

A síndrome do X frágil é causada pela expansão da repetição de um trinucleotídeo CGG na região 5' não traduzida do gene *Fragile X Mental Retardation 1*, mapeado no cromossomo Xq27.3. Indivíduos afetados apresentam a mutação plena, caracterizada por >200 repetições do trinucleotídeo CGG. Devido aos diversos aspectos moleculares envolvidos na síndrome do X frágil, o diagnóstico da doença envolve o emprego de uma combinação de diferentes métodos de análise, sendo necessária a padronização de métodos de triagem sensíveis, com alto rendimento e boa relação custo-benefício. O presente trabalho consistiu em analisar amostras de 28 indivíduos já diagnosticados com síndrome do X frágil no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 2012 a 2015, pelo PCR convencional, empregando o método de PCR metilação-específica. Adicionalmente, 14 amostras de pacientes cujo resultado do PCR convencional foi negativo para a doença, foram submetidas a sequenciamento de Sanger, para determinar o número exato de repetições CGG. Dessas 14 amostras selecionadas para sequenciamento, 9 foram também analisadas através do sistema Agilent TapeStation 4200. Para 4 dessas amostras, dados obtidos previamente através do método *Triplet-primed* PCR estavam disponíveis. Dos 28 pacientes diagnosticados com síndrome do X frágil, 13 foram caracterizados como mosaicos, e um paciente foi reclassificado como pré-mutado. Das 14 amostras sequenciadas, apenas uma apresentou análise viável, as demais treze apresentaram leituras com *background*. Os resultados obtidos através do sistema TapeStation apresentaram resultados compatíveis com o padrão de corrida eletroforética em gel de agarose. A técnica de PCR-metilação específica pode ser associada à PCR convencional para proporcionar um diagnóstico mais acurado. A análise proposta neste trabalho será complementar à análise convencional já realizada na rotina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e irá beneficiar os pacientes possibilitando um diagnóstico mais acurado.

Palavras-chave: Metilação. PCR. Expansão. Trinucleotídeo. Síndrome do X frágil.

ABSTRACT

The Fragile X syndrome is caused by the expansion of a CGG trinucleotide repeat within the 5' untranslated region of the Fragile X Mental Retardation 1 gene, mapped on the chromosome Xq27.3. Affected individuals have the full mutation which is characterized by >200 CGG repeats. Because of the several molecular aspects involved in the fragile X syndrome, the diagnosis requires a combination of different methods of analyses with high sensitivity, as well as high-throughput and cost-effective screening methods. The present study aimed to analyze samples from 28 individuals diagnosed with fragile X syndrome by conventional PCR, from the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from 2012 to 2015 by methylation-specific PCR. Additionally, 14 samples from patients whose conventional PCR results were negative for this disease were submitted to Sanger sequencing in order to determine the exact number of CGG repeats. For the 14 samples that undergone Sanger sequencing, 9 were also analyzed by the TapeStation system. Four of these samples have been previously analyzed by triplet-primed PCR. Among 28 patients diagnosed with FXS, 14 were characterized as mosaics, and 1 patient was reclassified as pre-mutation carrier. Among the 14 sequenced samples, only one of them was viable for analysis, whereas 13 showed background noise, compatible with unspecific amplification. The TapeStation system results were compatible with electrophoresis migrating pattern in agarose gel. Methylation-specific PCR technique might be associated to conventional PCR in order to provide more accurate diagnosis. The method of analysis proposed in this study will be complementary to the conventional analysis currently performed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and will benefit patients, enabling a more accurate diagnosis.

Keywords: Methylation. PCR. Expansion. Trinucleotide. Fragile X syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gene FMR1 e a síndrome do X frágil.....	9
Figura 2 – Triagem da síndrome do X frágil por PCR convencional.....	11
Figura 3 – Protocolo de PCR-metilação específica precedido de tratamento do DNA com bissulfito de sódio.....	12
Figura 4 – Corrida eletroforética em gel de agarose de produtos da PCR-metilação específica.....	12
Figura 5 – PCR convencional aliado à PCR metilação-específica.....	13

SUMÁRIO

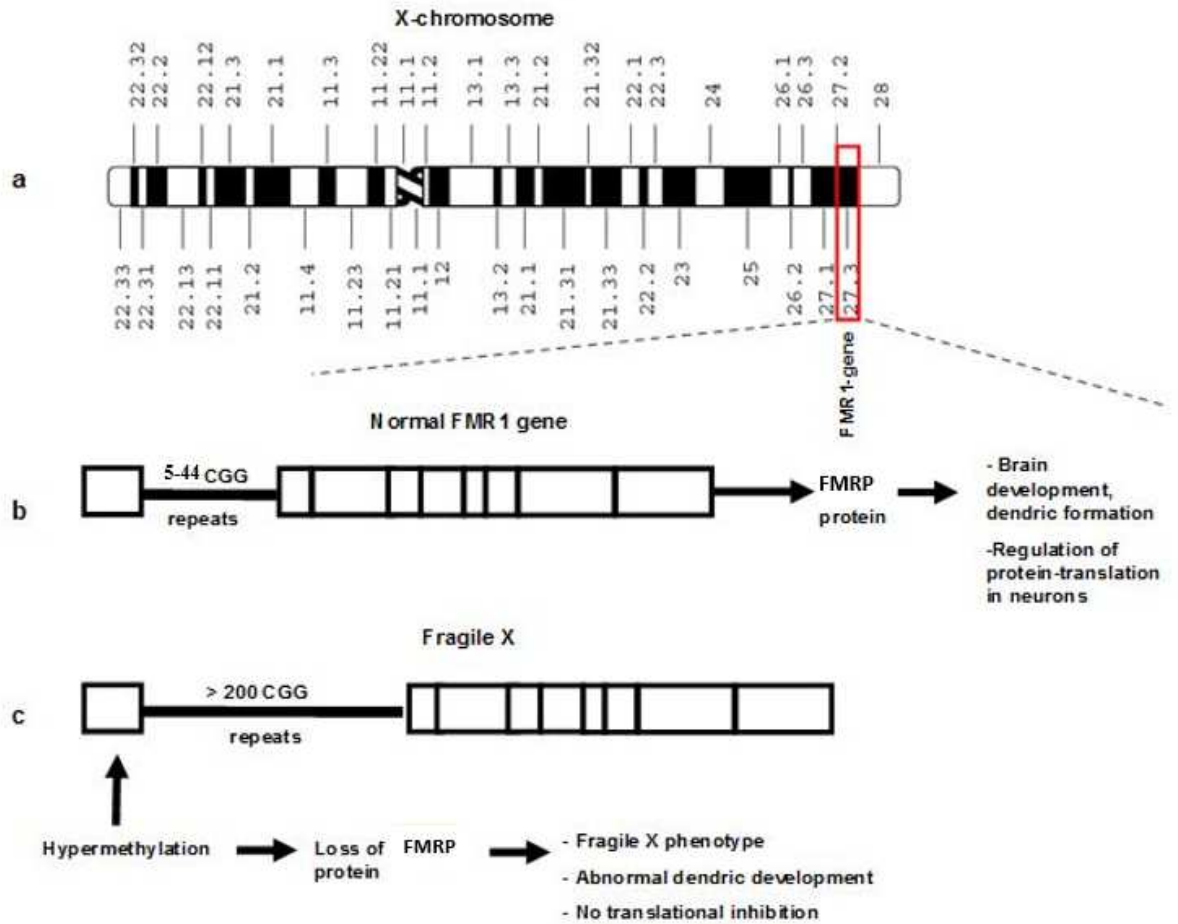
1	INTRODUÇÃO	8
1.1	JUSTIFICATIVA	14
1.2	OBJETIVOS	15
1.2.1	Objetivo Geral	15
1.2.2	Objetivos Específicos	15
2	ARTIGO CIENTÍFICO	17
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	31
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH	35

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do X frágil (SXF) é, atualmente, a mais comum causa monogênica de deficiência intelectual e a segunda causa genética mais prevalente, depois da Síndrome de Down, afetando aproximadamente 1 a cada 5000 homens e 1 a cada 4000-6000 mulheres (Dahl *et al.*, 2007; Teo *et al.*, 2012; Saldarriaga *et al.*, 2014). A SXF é causada pela expansão da repetição de um trinucleotídeo CGG na região 5' não traduzida do gene *Fragile X Mental Retardation 1* (*FMRI*, OMIM 309550), mapeado no cromossomo Xq27.3. Indivíduos afetados com SXF apresentam a mutação plena (MP), caracterizada por >200 repetições do trinucleotídeo CGG, o que leva à hipermetilação da região promotora do gene *FMRI*, reduzindo assim, os níveis de expressão da proteína FMRP, envolvida na maturação e plasticidade neuronal (figura 1). O fenótipo da doença está associado a características neurológicas, psiquiátricas e comportamentais, tais como disfunção intelectual, autismo, atraso na linguagem, ansiedade e hiperatividade. Características físicas como macro-orquidismo, face alongada e orelhas proeminentes também são um achado comum em pacientes afetados (Bell *et al.*, 1991; Saldarriaga *et al.*, 2014). O fenótipo costuma ser muito mais brando em mulheres afetadas, devido ao processo de inativação randômica do cromossomo X. Estima-se que apenas 50% das mulheres com MP são clinicamente afetadas (Monaghan *et al.*, 2013; Rajan-Babu & Chong, 2016).

Expansões CGG menores também podem ocorrer nessa região do gene *FMRI*. O *American College of Medical Genetics* define quatro formas alélicas para o gene: normal (N), aproximadamente 5 a 44 repetições; zona cinza (ZC), aproximadamente 45 a 54 repetições; pré-mutação (PM), aproximadamente 55 a 200 repetições; e mutação plena (MP), >200 repetições. Muito embora portadores da PM não apresentem o fenótipo SXF, esta forma alélica está associada a outras complicações mais tardias, tais como Síndrome do tremor/ataxia associado ao X frágil (STAXF) e falência ovariana prematura associada ao X frágil (FOPXF) (Teo *et al.*, 2012; Saldarriaga *et al.*, 2014; Rajan-Babu & Chong, 2016).

Figura 1: Gene *FMR1* e a síndrome do X frágil



a - Localização do gene *FMR1* no cromossomo X; b- alelo *FMR1* com repetições CGG na faixa normal; c- síndrome do X frágil: alelo *FMR1* com >200 repetições CGG. Fonte: Verhoeven *et al.*, 2011.

Embora a quantidade de repetições CGG esteja associada à gravidade dos aspectos clínicos, sabe-se que o mecanismo responsável pelo fenótipo da SXF não é a expansão em si, mas sim a hipermetilação da ilha CpG e o consequente silenciamento do gene *FMR1*. Em 1991, Bell *et al.* e Vincent *et al.* relataram hipermetilação em homens afetados com SXF, enquanto homens não afetados e suas filhas apresentavam DNA não metilado no cromossomo X ativo. Em 1996, Vries *et al.* descreveram três homens *FMR1* MP de uma mesma família com diferentes porcentagens de alelos não metilados: 90%, 35% e 15%, respectivamente. No primeiro indivíduo constatou-se status mental normal, enquanto seus dois primos apresentaram deficiência intelectual e comportamento característico do fenótipo SXF.

O mosaicismismo é uma fonte de variabilidade do fenótipo, que pode ter um efeito positivo sobre a função cognitiva de indivíduos *FMRI* MP, reduzindo a penetrância da SXF. A condição de mosaicismismo para a MP pode estar relacionada ao comprimento da expansão, na qual o indivíduo apresenta alelos com diferentes faixas de comprimento, ou à metilação, na qual há a presença de alelos metilados e não-metilados. O mosaicismismo está associado a níveis mais altos de quociente de inteligência (QI) nos indivíduos afetados, porém maior risco de desenvolvimento de sintomas psicóticos e desordens neurodegenerativas tardias, especialmente STAXF (Rajan-Babu & Chong, 2016).

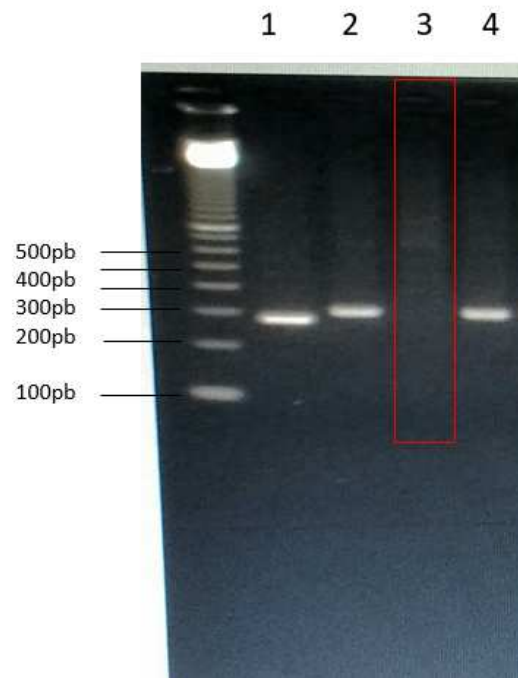
A transição de alelos PM para MP pode se dar devido à expansão, que ocorre durante a transmissão do cromossomo X materno de uma portadora PM para sua prole. Muito embora o alelo paterno com <70 repetições seja altamente instável (Nolin *et al.*, 2015), expansões para MP não se observam na transmissão do cromossomo X paterno de um indivíduo PM para sua (s) filha (s) (Saldarriaga *et al.* 2014). A transmissão materna das repetições é estável para alelos com até 40 repetições e altamente instável para alelos >54 repetições (Latham *et al.*, 2014; Nolin *et al.*, 2015). Além disso, repetições CGG no gene *FMRI* são, frequentemente, interrompidas por âncoras AGG, o que teria efeito positivo na estabilidade da transmissão dessa região. Portanto, as chances de expansão da PM para MP dependem do número de repetições CGG e também do número de interrupções AGG (Saldarriaga *et al.*, 2014; Latham *et al.*, 2014; Nolin *et al.*, 2015).

O diagnóstico e a caracterização molecular correta da SXF envolvem diversos aspectos, tais como: i) tamanho da expansão CGG; ii) tamanho das repetições CGG ininterruptas e número de interrupções AGG; iii) status de metilação; e iiiii) mosaicismismo para comprimento da expansão e/ou metilação. Para definir todos esses aspectos, faz-se necessário o emprego de uma combinação de diferentes métodos de análise. O método considerado padrão ouro para detecção de SXF é o *Southern Blot* (SB), uma técnica cara, demorada, laboriosa e dependente de reagentes radioativos para sua realização. Sendo assim, a maioria dos laboratórios utiliza métodos de triagem baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para descartar indivíduos normais para a mutação, ficando o SB como recurso de confirmação para pacientes com alelos expandidos (Rajan-Babu & Chong, 2016).

No Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA), a triagem para SXF é realizada através de PCR convencional, baseada em método descrito por Tassone *et al.*, 2008, no qual apenas os alelos de tamanho normal e possivelmente alguns PM com número de repetições inferior a cerca de 80 apresentam amplificação, enquanto os alelos PM na faixa superior de repetições e MP não amplificam

(figura 2). Desta maneira, o diagnóstico fica restrito a falta de amplificação de um alelo com repetições CGG dentro do limite normal, sem a possibilidade de detecção de mosaïcismo, ou de diferenciação entre PM com >80 repetições e MP (Das *et al.*, 1998).

Figura 2: Triagem da síndrome do X frágil por PCR convencional

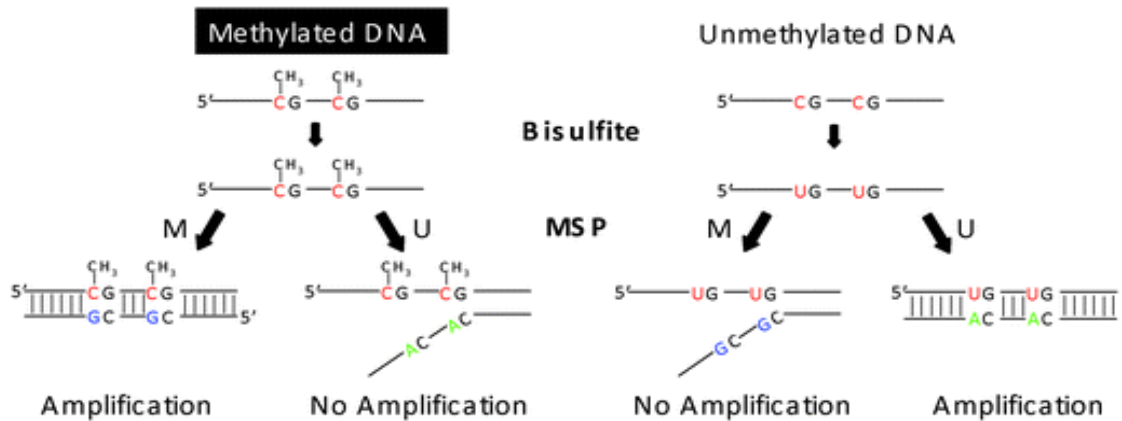


Corrida eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR convencional: amostras 1,2 e 4: diagnóstico negativo para X frágil. Amostra 3: resultado positivo para X frágil. Fonte: acervo da autora.

O trabalho aqui descrito consistiu na análise de amostras de 28 indivíduos já diagnosticados com SXF no SGM/HCPA no período de 2012 a 2015, pelo PCR convencional, empregando o método de PCR metilação-específica (MSP), descrito por Das *et al.* (1998), que consiste em uma reação de PCR realizada com dois pares de primers específicos para o alelo metilado e não metilado respectivamente. Para a realização desta técnica, as amostras de DNA são submetidas a um tratamento prévio com bissulfito de sódio, cuja finalidade consiste em converter as citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas (figura 3). Este método apresenta a vantagem de detectar alelos MP, N ou PM e mosaicos MP/PM ou MP/N, porém com a limitação de não distinguir entre alelo N e PM, sendo então necessária a realização de ambos métodos de PCR para caracterizar

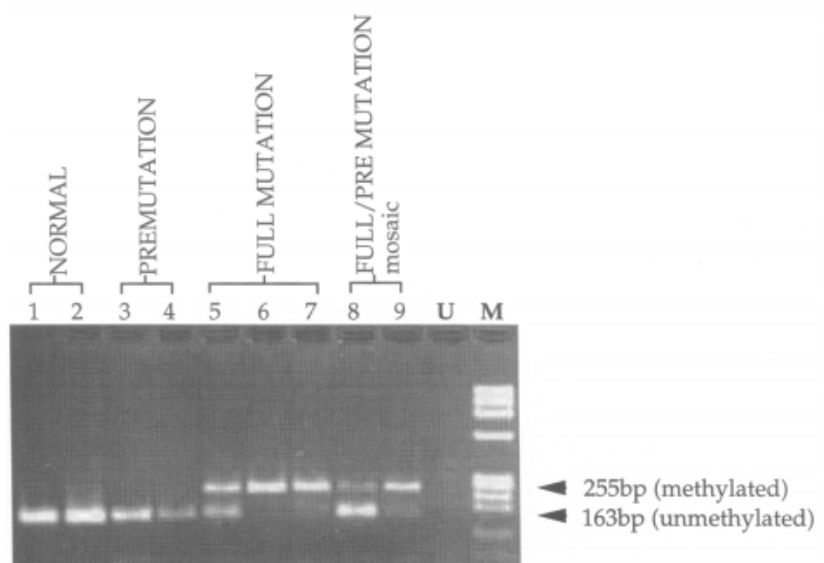
corretamente os indivíduos não afetados (figuras 4 e 5). O número de amostras analisados neste trabalho foi baseado em uma amostra de conveniência.

Figura 3: Protocolo de PCR-metilação específica precedido de tratamento do DNA com bissulfite de sódio



As amostras de DNA são submetidas a tratamento com bissulfite de sódio para a conversão das citosinas não metiladas em uracilas. Após esse tratamento, procede-se a PCR-metilação específica com pares de primers específicos para o alelo metilado e não metilado. Fonte: Zhang *et al.*, 2009

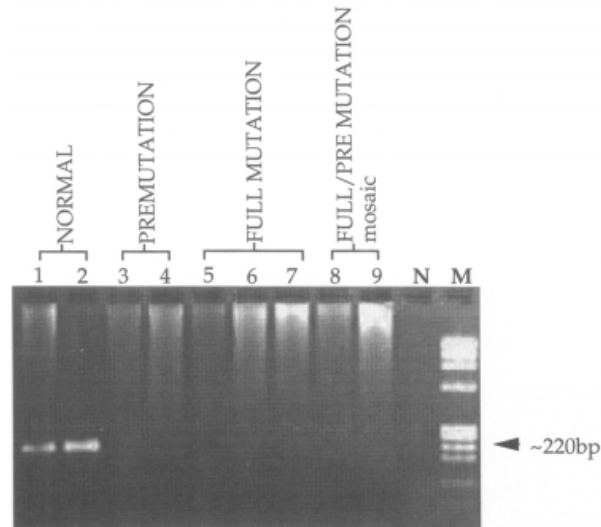
Figura 4: Corrida eletroforética em gel de agarose de produtos da PCR-metilação específica



Os alelos normais e pré-mutados (1-4) apresentam padrão de metilação normal, com amplificação apenas da banda referente ao alelo não metilado. A amplificação do alelo metilado (5-9) corresponde à presença de mutação plena. A amplificação de ambos alelos (5,8

e 9) indica mosaïcismo. Repare que a amostra 5 apresenta padrão compatível com mosaïcismo, e foi erroneamente classificada como mutação plena. Fonte: Das *et al.*, 1998.

Figura 5: PCR convencional aliado à PCR metilação-específica



Produtos de PCR convencional das amostras submetidas à PCR metilação-específica (figura 4). Apenas os alelos de comprimento normal apresentam amplificação. Fonte: Das *et al.*, 1998.

Adicionalmente, 14 amostras de pacientes cujo resultado do PCR convencional foi negativo para SXF, foram submetidas a sequenciamento de Sanger, para determinar o número exato de repetições CGG. Essas amostras foram selecionadas com base nos padrões de corrida do produto do PCR em gel de agarose, uma vez que espera-se que esses padrões reflitam o comprimento do fragmento amplificado. O propósito deste procedimento foi correlacionar o padrão de corrida das amostras no gel de agarose, com o tamanho da expansão, possibilitando assim, estimar o número de repetições CGG presentes no fragmento amplificado em PCR convencional, baseando-se no padrão de corrida da amostra. Dessas 14 amostras selecionadas para sequenciamento, 9 foram também analisadas através do sistema *Agilent TapeStation 4200*. Para 4 dessas amostras, dados obtidos previamente através do método *Triplet-primed PCR* (TP-PCR), com kit comercial *AmplidexTM*, da *Asuragen* estavam disponíveis.

O *TapeStation 4200* consiste em um método de eletroforese, para separação de ácidos nucleicos. O sistema é composto pelo equipamento *Agilent TapeStation 4200*, um laptop e *ScreenTapes*, que são dispositivos contendo 16 canaletas para separação das amostras, sendo uma canaleta para cada amostra. As amostras são inseridas no equipamento em placas de 96

poços ou em *strips*, juntamente com um marcador de peso molecular. O *screeentape* é inserido em compartimento específico no equipamento. As análises fornecem informações sobre quantidade, pureza e comprimento em pares de bases das amostras (genomics.agilent.com). Neste trabalho este sistema foi empregado com o objetivo de determinar o comprimento dos fragmentos amplificados em PCR convencional para 9 amostras. Os dispositivos e reagentes necessários foram gentilmente cedidos pela *Agilent*.

Os protocolos de PCR convencional, que tem como alvo a região da expansão CGG tem limitações para uso no diagnóstico de mulheres, pois ocorre a amplificação preferencial do alelo normal, não sendo possível distinguir uma homozigota N, com ambos alelos na mesma faixa de comprimento, de uma heterozigota portadora de um alelo normal e um expandido (Monaghan *et al.*, 2013; Rajan-Babu & Chong, 2016). A mesma limitação é associada com a metodologia de MSP, uma vez que o cromossomo X inativo sempre irá resultar em amplificação do alelo *FMR1* metilado (Das *et al.*, 1998). Por este motivo, apenas amostras de indivíduos do sexo masculino foram analisadas neste trabalho.

O diagnóstico de SXF para indivíduos do sexo feminino exige o emprego de SB, ou de kits comerciais como o *Amplidex*TM, da *Asuragen*. Este é baseado na metodologia TP-PCR, que apresenta como diferencial o emprego de três primers, sendo um deles um triple-primed (TP) primer, que anela aleatoriamente em múltiplas posições dentro da região das repetições CGG, permitindo, assim, a amplificação eficiente dos alelos PM e MP, em indivíduos de ambos sexos (Rajan-Babu & Chong, 2016). O principal empecilho, porém é o alto custo, que dificulta o emprego desta técnica como método diagnóstico de rotina. Considerando que, a maioria das requisições de teste diagnóstico para SXF são para crianças de 2 a 10 anos, com fenótipo comum a diversas outras doenças (atrasos no desenvolvimento e na linguagem, déficit de atenção, etc) (MacPherson & Murray, 2016), faz-se necessário a padronização de métodos de triagem sensíveis, com alto rendimento e boa relação custo-benefício, minimizando a necessidade de técnicas laboriosas e/ou dispendiosas.

1.1 JUSTIFICATIVA

A análise proposta neste trabalho será complementar à análise convencional já realizada na rotina do HCPA. Esta análise convencional apresenta as limitações de não identificar casos

de mosaicismos e de não distinguir entre PM na faixa superior de repetições e MP. A metodologia proposta neste estudo irá beneficiar os pacientes possibilitando um diagnóstico mais acurado. E, para os indivíduos com resultados negativos para SXF, será possível estimar o número de repetições CGG a partir do padrão de corrida dessas amostras em gel de agarose.

Até o presente momento, não há cura ou tratamento estabelecido para SXF, no entanto medidas de cuidado paliativo podem ser iniciadas em pacientes caso o diagnóstico seja confirmado. Além disso, um diagnóstico mais acurado irá beneficiar o aconselhamento genético. Por tratar-se de um estudo retrospectivo, foi solicitado junto ao Comitê de ética do HCPA (CEP/HCPA) dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Otimizar o método de triagem para SXF empregado atualmente no SGM/HCPA, permitindo a identificação de indivíduos N, MP, PM e mosaicos PM/MP ou N/MP.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Realizar análise de prontuário de pacientes atendidos no SGM/HCPA no período de 2012-2015, para os quais o resultado pela metodologia de PCR foi positivo para SXF, e analisar as amostras desses pacientes através da metodologia de PCR metilação específica (MSP).
- 2) Padronizar a metodologia de análise de metilação do gene *FMRI* utilizando PCR metilação-específica (MSP).
- 3) Determinar o número de repetições CGG em amostras N e PM com até 80 repetições e comprimentos distintos de expansão, para correlacionar o

número de repetições deste trinucleotídeo com o padrão de corrida em gel de agarose dos produtos de PCR convencional.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Análise retrospectiva por PCR metilação específica de pacientes diagnosticados com síndrome do X frágil pela metodologia de PCR convencional

Retrospective analysis by methylation-specific PCR of fragile X syndrome patients diagnosed by conventional PCR

Título resumido: PCR metilação específica e PCR convencional no diagnóstico da Síndrome do X frágil

Bruna Oliveira ^a, Francyne Kubaski ^{a,b}, Franciele Barbosa Trap ^b, Têmis Maria Félix ^b, Sandra Leistner Segal ^b

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

^b Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS

Autor correspondente:

Sandra Leistner-Segal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Rua Ramiro Barcelos, 2350- Largo Eduardo Z.Faraco. CEP: 90.035-903- Porto Alegre- RS
Email: ssegal@hcpa.edu.br

RESUMO

Introdução: A Síndrome do X frágil (SXF) é causada pela expansão da repetição de um trinucleotídeo CGG na região 5' não traduzida do gene *Fragile X Mental Retardation 1*. A caracterização molecular desta doença envolve diversos aspectos, o que exige o emprego de uma combinação de diferentes métodos de análise.

Métodos: Amostras de DNA de 28 pacientes diagnosticados com SXF através de PCR convencional foram submetidas a PCR metilação específica (MSP). 14 amostras de DNA de indivíduos com resultado negativo para SXF foram sequenciadas, com o propósito de definir o número exato de repetições CGG e, então correlacionar o tamanho da expansão com o padrão de corrida destas amostras em gel de agarose. Dessas 14 amostras selecionadas para sequenciamento, 9 foram também analisadas através do sistema *Agilent Tapestation 4200*, e, para 4 delas, dados obtidos previamente através do método *Triplet-primed PCR (TP-PCR)*, estavam disponíveis.

Resultados: Dos 28 pacientes diagnosticados com SXF, 13 foram caracterizados como mosaicos, e 1 paciente foi reclassificado como pré-mutado. Das 14 amostras sequenciadas, apenas uma apresentou análise viável, as demais 13 apresentaram leituras com *background*, sugestivo de amplificação inespecífica. Os resultados obtidos através do sistema *Tapestation* apresentaram resultados compatíveis com o padrão de corrida eletroforética em gel de agarose.

Conclusão: A técnica de MSP, pode ser associada à PCR convencional para proporcionar um diagnóstico mais acurado. O sistema *Tapestation* é uma ferramenta útil para determinar o tamanho de fragmentos amplificados em PCR, mas não para estimar número de repetições CGG.

Palavras chave: Metilação, Síndrome do X frágil, PCR, Expansão, Trinucleotídeo

ABSTRACT

Introduction: The Fragile X syndrome (FXS) is caused by the expansion of a CGG trinucleotide repeat within the 5' untranslated region of the *Fragile X Mental Retardation 1* gene. The molecular characterization of this disease involves several aspects requiring a combination of different methods of analyses.

Methods: DNA samples from 28 FXS patients diagnosed by conventional PCR were analyzed by methylation specific PCR (MSP). 14 DNA samples with FXS negative results were sequenced in order to determine the number of CGG repeats, and, therefore correlate each sample expansion length with its migrating pattern in the agarose gel electrophoresis. For 14 of the sequenced samples, 9 of them were also analyzed by Agilent TapeStation 4200 system, and 4 samples have been previously analyzed by Triplet-primed PCR (TP-PCR).

Results: Among 28 patients diagnosed with FXS, 14 were characterized as mosaics, and 1 patient was reclassified as pre-mutation carrier. Among the 14 sequenced samples, only one of them was viable for analysis, whereas 13 showed background noise, compatible with unspecific amplification. The TapeStation system results were compatible with electrophoresis migrating pattern in agarose gel.

Conclusion: MSP technique might be associated to conventional PCR in order to provide more accurate diagnosis. The TapeStation system is a useful tool to determine the fragment length of PCR products, but not to estimate number of CGG repeats.

Keywords: Methylation, Fragile X syndrome, PCR, Expansion, Trinucleotide

INTRODUÇÃO

A Síndrome do X frágil (SXF) é, atualmente, a mais comum causa monogênica de deficiência intelectual e a segunda causa genética mais prevalente, depois da Síndrome de Down, afetando aproximadamente 1 a cada 5000 homens e 1 a cada 4000-6000 mulheres^(1,2). A SXF é causada pela expansão da repetição de um trinucleotídeo CGG na região 5' não traduzida do gene *Fragile X Mental Retardation 1* (*FMRI*, OMIM 309550), mapeado no cromossomo Xq27.3. Indivíduos afetados com SXF apresentam a mutação plena (MP), caracterizada por >200 repetições do trinucleotídeo CGG, o que leva à hipermetilação da região promotora do gene *FMRI*, reduzindo assim, os níveis de expressão da proteína FMRP, envolvida na maturação e plasticidade neuronal. Expansões CGG menores também podem ocorrer nessa região do gene *FMRI*. O *American College of Medical Genetics* define quatro formas alélicas para o gene: normal (N), aproximadamente 5 a 44 repetições; zona cinza (ZC), aproximadamente 45 a 54 repetições; pré-mutação (PM), aproximadamente 55 a 200 repetições; e mutação plena (MP), >200 repetições. Muito embora portadores da PM não apresentem o fenótipo SXF, esta forma alélica está associada a outras complicações mais tardias, tais como Síndrome do tremor/ataxia associado ao X frágil (STAXF) e falência ovariana prematura associada ao X frágil (FOPXF)⁽¹⁻³⁾. O mosaïcismo para comprimento da expansão CGG e/ou para metilação também é uma fonte de variabilidade do fenótipo, que pode ter um efeito positivo sobre a função cognitiva de indivíduos *FMRI* MP, reduzindo a penetrância da SXF⁽³⁾.

Devido aos diversos aspectos moleculares envolvidos na SXF, tais como número de repetições ininterruptas, interrupções AGG, status de metilação, mosaïcismo para comprimento da expansão e/ou metilação^(3,4), o diagnóstico da doença envolve o emprego de uma combinação de diferentes métodos de análise. O método considerado padrão ouro é o *Southern Blot* (SB), uma técnica cara, demorada, laboriosa e dependente de reagentes radioativos para sua realização. Sendo assim, a maioria dos laboratórios utiliza métodos de triagem baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para descartar indivíduos normais para a mutação, ficando o SB como recurso de confirmação para pacientes com alelos expandidos⁽³⁾. Considerando que, a maioria das requisições de teste diagnóstico para SXF são para crianças de 2 a 10 anos, com fenótipo comum a diversas outras doenças (atrasos no desenvolvimento e na linguagem, déficit de atenção, etc)⁽⁴⁾, faz-se necessário a padronização de métodos de triagem sensíveis, com alto rendimento e boa relação custo-benefício, minimizando a necessidade de técnicas laboriosas e/ou dispendiosas.

No Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA), a triagem para SXF é realizada através de PCR convencional, baseado em método descrito por Tassone *et al.*, 2008⁽⁵⁾ no qual apenas os alelos de tamanho normal e alguns PM com número de repetições inferior a cerca de 80 apresentam amplificação, enquanto os alelos PM na faixa superior de repetições e MP não amplificam. Desta maneira, o diagnóstico fica restrito a falta de amplificação de um alelo

com repetições CGG dentro do limite normal, sem a possibilidade de detectar casos de mosaicismo, ou de diferenciar entre PM com >80 repetições e MP⁽⁶⁾. O trabalho aqui descrito consistiu em fazer uma análise por PCR metilação-específica (MSP) de pacientes diagnosticados com SXF pelo PCR convencional, além de empregar as metodologias do sistema *Tapestation* e sequenciamento de Sanger para estimar o número de repetições CGG em amostras cujo resultado do PCR convencional foi negativo para SXF.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de 28 indivíduos já diagnosticados com SXF no SGM/HCPA no período de 2012 a 2015, pelo PCR convencional, empregando o método de PCR metilação-específica (MSP), descrito por Das *et al.* (1998)⁽⁶⁾. Este método apresenta a vantagem de detectar alelos MP, N ou PM e mosaicos MP/PM ou MP/N, porém com a limitação de não distinguir entre alelo N e PM, sendo então necessário realizar ambos métodos de PCR para caracterizar corretamente os indivíduos não afetados. O número de amostras analisados neste trabalho foi baseado em uma amostra de conveniência (figura 1).

Adicionalmente, 14 amostras de pacientes cujo resultado do PCR convencional foi negativo para SXF, foram submetidas a sequenciamento de Sanger, para determinar o número exato de repetições CGG. Essas amostras foram selecionadas com base nos padrões de corrida do produto do PCR em gel de agarose, uma vez que espera-se que esses padrões reflitam o comprimento do fragmento amplificado. O propósito deste procedimento foi correlacionar o padrão de corrida das amostras no gel de agarose, com o tamanho da expansão, possibilitando assim, estimar o número de repetições CGG presentes no fragmento amplificado em PCR convencional, baseando-se no padrão de corrida da amostra. Dessas 14 amostras selecionadas para sequenciamento, 9 foram também analisadas através do sistema *Agilent Tapestation 4200*. Para 4 dessas amostras, dados obtidos previamente através do método *Triplet-primed PCR (TP-PCR)*, com kit comercial *Amplidex™*, da *Asuragen* estavam disponíveis (figura 1).

Os protocolos de PCR convencional, que tem como alvo a região da expansão CGG tem limitações para uso no diagnóstico de mulheres, pois ocorre a amplificação preferencial do alelo normal, não sendo possível distinguir uma homozigota N, com ambos alelos no mesmo range de comprimento, de uma heterozigota portadora de um alelo normal e um expandido^(3,6). A mesma limitação apresenta a metodologia MSP, uma vez que o cromossomo X inativo sempre irá resultar em amplificação do alelo FMR1 metilado⁽⁵⁾. Por este motivo, apenas amostras de indivíduos do sexo masculino foram analisadas neste trabalho.

Amostras

Foram analisadas 42 amostras de DNA genômico de indivíduos do sexo masculino, dos quais 28 tinham diagnóstico positivo para SXF, e 14 com resultado negativo para esta doença, através do método de PCR convencional realizado no período de 2012 a 2015. Essas amostras foram recuperadas do biorrepositório do Laboratório de Genética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), registrado sob o nº 17-0489. Por se tratar de um estudo retrospectivo, foi solicitado dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), junto ao CEP.

PCR metilação-específica (MSP)

As amostras analisadas por MSP podem resultar em três possíveis padrões: i) MP: quando apenas o alelo metilado apresenta amplificação; ii) mosaïcismo: ambos alelos, metilado e não metilado, apresentam amplificação; iii) padrão de metilação normal: apenas o alelo não metilado apresenta amplificação (figura 2). Não é possível distinguir, através desses padrões, indivíduos N de PM, pois em ambos os casos o resultado de MSP indica metilação normal. Por este motivo, para interpretação correta dos resultados, se faz necessário associar esta técnica ao PCR convencional, no qual espera-se presença de amplificação para os alelos N e ausência para os alelos PM. Neste trabalho, todas as amostras submetidas a MSP apresentaram ausência de amplificação no PCR convencional. As amostras de DNA de 28 pacientes com diagnóstico positivo para SXF foram submetidas a tratamento com bissulfito de sódio utilizando o kit comercial *MethylEdge® Bissulfite Conversion System*, conforme instruções do fabricante. Este tratamento tem a função de converter as citosinas não metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. Após este procedimento, as amostras foram então utilizadas como template para reação de PCR metilação específica, empregando dois pares de primers específicos para o alelo metilado e não metilado, respectivamente, conforme protocolo baseado no método descrito por Das *et al.*⁽⁶⁾. Os produtos da reação de MSP foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corado com *GelRed™*, e visualizados em transluminador.

PCR convencional

Amostras de DNA de 14 indivíduos com resultado negativo para SXF foram submetidas à PCR convencional para sequenciamento de Sanger e análise pelo sistema *Tapestation*. Essas amostras foram selecionadas com base nos padrões de corrida do produto do PCR em gel de agarose, uma vez que se espera que esses padrões reflitam o comprimento do fragmento amplificado. O critério para a escolha foi comprimentos distintos de produtos do PCR convencional, com o propósito de obter amostras com diferentes números de repetições CGG.

O protocolo empregado foi baseado no método descrito por Tassone *et al.*⁽⁵⁾, com par de primers que flanqueiam a região das repetições CGG, utilizando 60ng de DNA como template para a

reação. Os produtos de PCR, juntamente com marcador de 100pb, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio, e visualizados em transluminador.

Sequenciamento

Após reação de PCR convencional, as amostras destinadas a sequenciamento de Sanger foram purificadas com Polietileno glicol 8000 (PEG 8000), conforme protocolo descrito em openwetware.org⁽⁷⁾. A 5µL de cada uma dessas amostras foi adicionado 5pmol do primer 5'-3' *forward* utilizado no PCR convencional (sequência do primer descrita em Tassone et al, 2008⁽⁵⁾). Essas amostras foram enviadas para sequenciamento na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do HCPA (Porto Alegre, RS).

Sistema TapeStation

Os produtos de PCR convencional de 9 amostras foram analisados no equipamento *Agilent TapeStation* 4200, conforme instruções do fabricante. O *ScreenTape* D1000, o *ladder* D1000 e o *buffer* D1000 utilizados nessa reação foram cortesia da *Agilent*.

O sistema *TapeStation* foi utilizado para quantificação do comprimento dos produtos de PCR convencional para estimar o número de repetições CGG presente nas amostras. Do comprimento em pares de base (pb) atribuído à cada amostra, subtrai-se 221 pb, pois este é o comprimento esperado para o fragmento amplificado, sem contabilizar as repetições CGG. Portanto, o número restante desta subtração, dividido por 3, corresponde ao número de repetições CGG no fragmento amplificado.

RESULTADOS

Das 28 amostras com resultado positivo para SXF, 14 (50%) apresentaram padrão de metilação compatível com MP, corroborando o resultado obtido em PCR convencional. Treze amostras (46,4%) apresentaram resultado indicativo de mosaicismos, e uma (3,6%) amostra foi reclassificada como PM (figura 3).

Das 14 amostras analisadas através de sequenciamento de Sanger, 13 delas apresentaram resultados ilegíveis, com presença de *background* sugestivo de ampliações inespecíficas/contaminação. Por este motivo, esses resultados não serão apresentados. Apenas a amostra 6 (tabela 1) apresentou resultado viável no sequenciamento. Para esta amostra foram detectadas 44 repetições CGG e 2 trincas AGG, resultado compatível com os dados disponíveis de TP-PCR realizado anteriormente para esta amostra, que indica 46 repetições, porém sem distinção entre CGG e AGG.

Os resultados do sistema *TapeStation* para comprimento dos produtos de PCR foram compatíveis com os padrões observados no gel de agarose. Os comprimentos atribuídos à cada amostra, bem como o número de repetições CGG estimado a partir desses dados são apresentados na

tabela 1. Para a amostra 8, não foi possível detectar resultado pelo *Tapestation*. Houve detecção de bandas inespecíficas nas amostras 4, 8 e 9 (figura 4). Para as amostras 2, 3, 6 e 9, resultados obtidos previamente através de TP-PCR utilizando kit comercial *Amplidex*TM da *Asuragen* estavam disponíveis. Na comparação entre esses dados houve diferença média de 9,25 repetições entre ambas técnicas, sendo de 4 e 14 repetições a menos, respectivamente, nas amostras 2 e 3, e de 9 e 10 repetições a mais, detectadas nas amostras 6 e 9 pelo *Tapestation* em relação ao TP-PCR.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Considerando que o status de metilação tem importante efeito sobre o fenótipo da SXF, trata-se de um aspecto importante a ser considerado no diagnóstico da doença⁽⁶⁾. Enquanto a PCR convencional limita-se a identificar presença ou ausência de expansão, a associação da MSP à PCR convencional apresenta a vantagem adicional de identificar indivíduos mosaico e ainda distinguir entre MP e PM, pois embora a MSP não se destine a determinar o comprimento dos alelos, a presença da hipermetilação está associada a MP, enquanto alelos normais e PM não apresentam essa característica^(8,9). A correta caracterização dos pacientes mosaicos tem impacto no tratamento, uma vez que implicam em envolvimento cognitivo atenuado devido a presença de níveis de 2 a 10 vezes maiores de *FMRI* mRNA do que os indivíduos MP não-mosaicos⁽³⁾. Estima-se que de 12% a 41% dos indivíduos SXF MP são mosaicos^(3,10,11), semelhante aos resultados aqui apresentados, muito embora o tamanho amostral seja pequeno. Para alguns dos pacientes SXF mosaicos analisados neste estudo, observou-se banda referente ao alelo NM mais fraca (figura 2). Esta mesma característica foi observada por Das *et al.*⁽⁶⁾, e reflete graus variados de mosaicismos e/ou de metilação. Adicionalmente, a identificação correta de portadores de PM deverá ter impacto no aconselhamento genético, considerando que filhas destes indivíduos serão portadoras da PM, com risco de transmitir alelos MP para a próxima geração^(1,4,12).

Os resultados do sequenciamento de Sanger de 13 amostras foram considerados inviáveis devido à presença de *background*. Segundo Kieleczawa⁽¹³⁾, regiões ricas em CG, bem como regiões contendo várias repetições são, de difícil análise por sequenciamento e podem exigir tratamentos específicos prévios, tais como adição de DMSO ou ainda a inclusão de uma etapa prévia de exposição à temperatura desnaturante por 5 minutos. O resultado de apenas uma amostra foi viável no sequenciamento, nesta houve concordância com o resultado previamente obtido através de TP-PCR.

A metodologia de TP-PCR vem ganhando cada vez mais espaço no diagnóstico de SXF por ser uma técnica robusta e com alta sensibilidade e especificidade para detecção de alelos expandidos, em indivíduos de ambos sexos^(14,15), porém com a desvantagem do custo mais elevado, o que, até o presente momento, tem inviabilizado seu uso como método de triagem. Cabe também ressaltar que a técnica de TP-PCR não dispensa o emprego de SB na confirmação do diagnóstico de SXF^(15,16).

O sistema *Tapestation* mostrou-se uma ferramenta útil na quantificação do comprimento de fragmentos amplificados por PCR. Apresentou padrão de corrida semelhante ao observado em gel de agarose, porém com maior precisão. Na comparação dos resultados do *Tapestation* com os resultados do TP-PCR, houve discrepância de 4 a 14 repetições. É possível que isso ocorra devido à detecção de heterodúplexes ou amplificações inespecíficas geradas na reação de PCR convencional, ou ainda devido à limitações na sensibilidade do método. De qualquer forma, o *Tapestation* pode ser utilizado para analisar amostras em relação a seus comprimentos, porém não se aplica para a quantificação de repetições CGG, pois a possibilidade de medir o comprimento de um produto de PCR com uma imprecisão de 12 a 42 pb pode ser muito útil em algumas análises, porém na quantificação de repetições CGG da região 5' UTR do gene *FMRI* poderia implicar em classificação equivocada de alelos N, ZC ou PM. Porém cabe também ressaltar que determinar a real sensibilidade desta metodologia não está entre os objetivos do trabalho aqui apresentado, sendo necessário para isso realizar maiores estudos destinados especificamente a esse propósito.

A caracterização precisa e acurada de alelos *FMRI* expandidos permanece sendo um desafio. Segundo Macpherson⁽⁴⁾, “ a procura pelo método de única etapa capaz de detectar todos os comprimentos de repetições, status de metilação e padrões de interrupções AGG, e então eliminar a necessidade de segundo teste confirmatório, continua sendo o ‘Santo Graal’ do diagnóstico da síndrome de X frágil.” Porém, ao analisar dois aspectos importantes, como comprimento da expansão e metilação, aliando duas técnicas acessíveis na triagem, é possível sobrepujar algumas das limitações intrínsecas a cada uma dessas técnicas, e obter informações úteis sobre o genótipo desses pacientes, possibilitando melhorar o aconselhamento genético e o tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Universidad del Valle. Facultad de Salud W, Tassone F, González-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, Hagerman R. Colombia médica. [Internet]. Vol. 45, Colombia Médica. 2014 [cited 2017 Jul 20]. 190-198 p. Available from:
<http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/1810>
2. Teo CRL, Law H-Y, Lee CG, Chong SS. Screening for CGG repeat expansion in the FMR1 gene by melting curve analysis of combined 5' and 3' direct triplet-primed PCRs. Clin Chem [Internet]. Clinical Chemistry; 2012 Mar 1 [cited 2017 Nov 24];58(3):568–79. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223546>
3. Rajan-Babu I-S, Chong SS. Molecular Correlates and Recent Advancements in the Diagnosis and Screening of FMR1-Related Disorders. Genes (Basel) [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016 Oct 14 [cited 2017 Nov 24];7(10). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27754417>
4. Macpherson J, Murray A. Development of Genetic Testing for Fragile X Syndrome and Associated Disorders, and Estimates of the Prevalence of FMR1 Expansion Mutations. Genes (Basel) [Internet]. 2016 Nov 30 [cited 2017 Jul 20];7(12):110. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27916885>
5. Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. J Mol Diagn [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2008 Jan [cited 2017 Nov 24];10(1):43–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165273>
6. Das S, Kubota T, Song M, Daniel R, Berry-Kravis EM, Prior TW, et al. Methylation Analysis of the Fragile X Syndrome by PCR. Genet Test [Internet]. 1997 Jan 31 [cited 2017 Nov 24];1(3):151–5. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/gte.1997.1.151>
7. PEG purification of PCR products - OpenWetWare [Internet]. [cited 2017 Nov 22]. Available from: https://openwetware.org/wiki/PEG_purification_of_PCR_products
8. Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen S-H, xLaird CM. Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human *FMR1* gene. Hum Mol Genet [Internet]. Oxford University Press; 1992 Oct 1 [cited 2017 Nov 29];1(8):571–8. Available from:
<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/1.8.571>
9. Hornstra IK, Nelson DL, Warren ST, Yang TP. High resolution methylation analysis of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome. Hum Mol Genet [Internet]. 1993 Oct [cited 2017 Nov 29];2(10):1659–65. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8268919>
10. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boué J, et al. Direct Diagnosis by

- DNA Analysis of the Fragile X Syndrome of Mental Retardation. *N Engl J Med* [Internet]. 1991 Dec 12 [cited 2017 Nov 29];325(24):1673–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1944467>
11. Nolin SL, Glicksman A, Houck GE, Brown WT, Dobkin CS. Mosaicism in fragile X affected males. *Am J Med Genet* [Internet]. 1994 Jul 15 [cited 2017 Nov 29];51(4):509–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943031>
 12. Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med*. 2015;
 13. Kieleczawa J. Fundamentals of sequencing of difficult templates--an overview. *J Biomol Tech* [Internet]. The Association of Biomolecular Resource Facilities; 2006 Jul [cited 2017 Nov 29];17(3):207–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870712>
 14. Lyon E, Laver T, Yu P, Jama M, Young K, Zoccoli M, et al. A simple, high-throughput assay for Fragile X expanded alleles using triple repeat primed PCR and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2010 Jul [cited 2017 Nov 29];12(4):505–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431035>
 15. Chen L, Hadd A, Sah S, Filipovic-Sadic S, Krosting J, Sekinger E, et al. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. *J Mol Diagn* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2010 Sep [cited 2017 Nov 29];12(5):589–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616364>
 16. Monaghan KG, Lyon E, Spector EB. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Jul 13 [cited 2017 Nov 25];15(7):575–86. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gim.2013.61>



Figura 1: Fluxograma das amostras utilizadas neste estudo: análises realizadas em amostras com resultado positivo e negativo, respectivamente, para SXF por PCR convencional

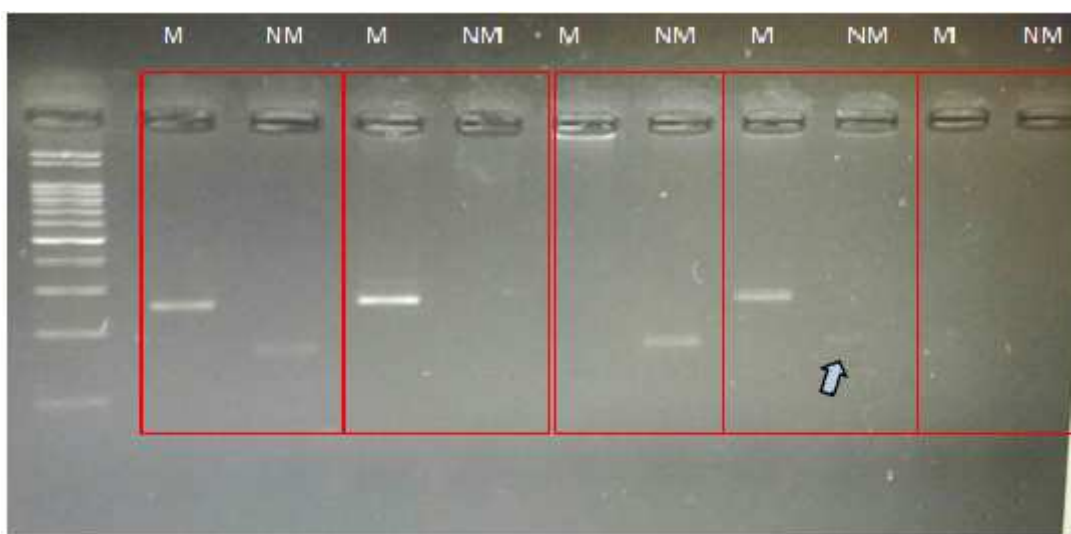


Figura 2 : Produtos da PCR metilação específica: alelo metilado (M) e não metilado(NM), respectivamente. Da esquerda para a direita: mosaico- amplificação nos dois alelos; MP- apenas o alelo metilado amplifica; PM- padrão de metilação normal, com amplificação apenas do alelo não- metilado; mosaico- ambos alelos amplificam; sinal fraco no alelo não metilado (seta); e branco.

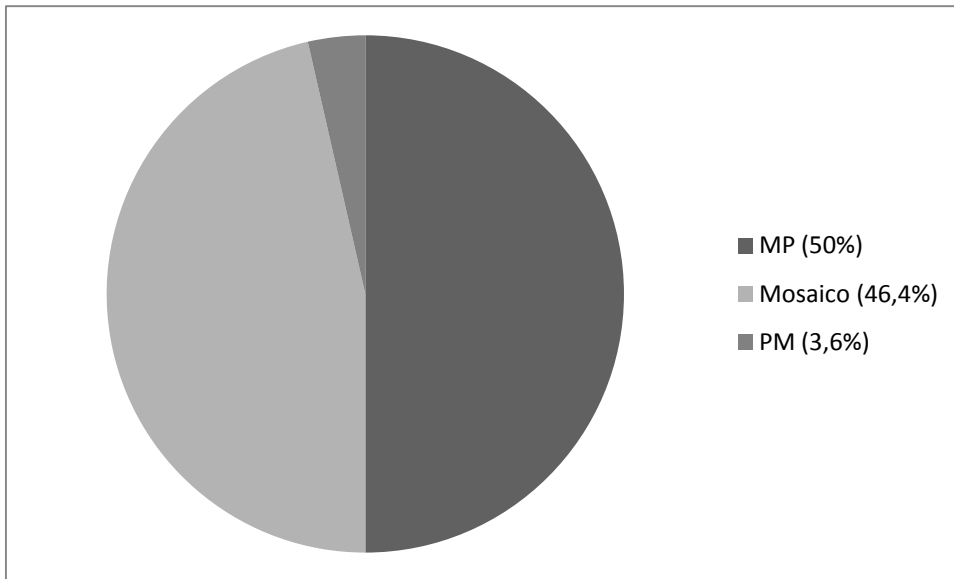


Figura 3: Resultados das análises por PCR metilação específica (MSP) de pacientes diagnosticados com X frágil através da metodologia de PCR convencional

Amostra n ^o	Comprimento (pb) Tapestation	N ^o de repetições estimado (Tapestation)	No de repetições (TP-PCR)	No de repetições estimado (sequenciamento)
1	419	66 repetições	n/a	n/a
2	377	52 repetições	56 repetições	n/a
3	370	50 repetições	64 repetições	n/a
4	382	54 repetições	n/a	n/a
5	335	38 repetições	n/a	n/a
6	386	55 repetições	46 repetições	44 CGG / 2 AGG
7	380	53 repetições	n/a	n/a
8	não detectado#	não detectado#	n/a	n/a
9	414	64 repetições	54 repetições	n/a

Tabela 1: Resultados do sistema *Tapestation*. Pelo comprimento do fragmento amplificado no PCR convencional, segundo dados do sistema *Tapestation*, foi possível estimar o número de repetições CGG presentes. Dados obtidos previamente por TP-PCR estavam disponíveis. O número de repetições CGG estimado a partir do sequenciamento foi apresentado apenas para a amostra 6.

n/a: dados não apresentados

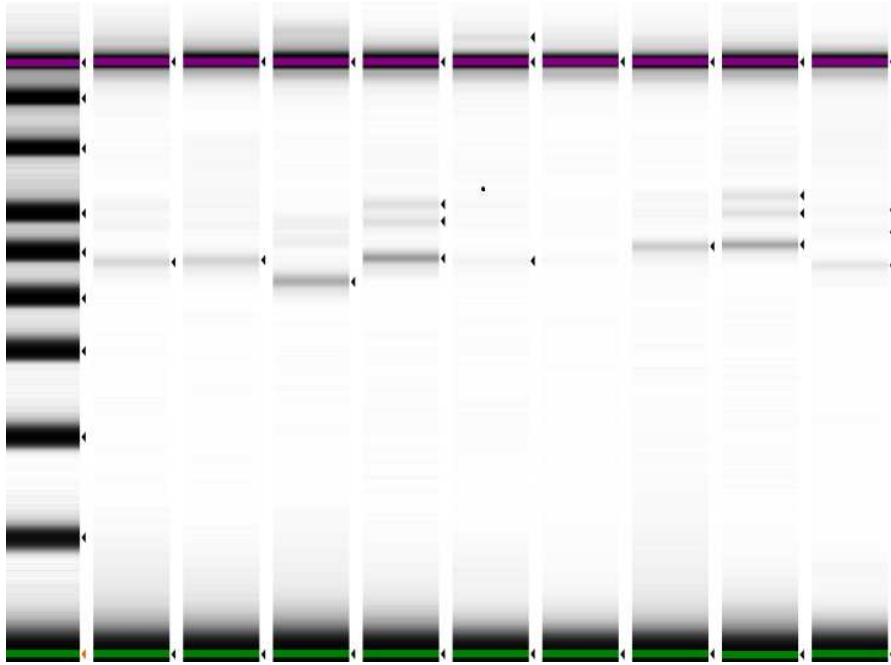


Figura 4: Imagem da corrida eletroforética gerada pelo sistema *Tapestation*. Da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular, amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A associação da técnica MSP à PCR convencional contribuiu para melhor caracterização dos alelos *FMRI* de pacientes diagnosticados com SXF pela PCR convencional. Essa abordagem também pode fornecer maiores informações sobre o genótipo de pacientes com resultado negativo para a síndrome, uma vez que alelos N também podem ser encontrados em mosaicismo (Rajan-Babu & Chong,2016). Esses pacientes podem apresentar resultado negativo para SXF devido à amplificação do alelo normal na PCR convencional (Tassone *et al.*,2008; Das *et al.* 1998). Sendo assim, a técnica de MSP poderia identificar esses pacientes como mosaico MP/N, caso haja amplificação na PCR convencional e também nos alelos metilado e não metilado. Os casos de mosaicismo N/PM, porém, não seriam detectados através dessas análises, uma vez que os resultados de ambas técnicas indicariam padrão normal, sendo então necessário o emprego de TP-PCR e/ou SB para diagnóstico correto nesses casos. A análise retrospectiva de pacientes com resultado negativo para SXF em PCR convencional estava previsto neste projeto, e foi condicionada pelo Comitê de Ética do HCPA à assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Até a data de encerramento deste trabalho não houve tempo hábil para inclusão desses casos nas análises, ficando então, para a próxima etapa do projeto. Os pacientes que foram reclassificados como mosaicos e portador de pré-mutação após as análises realizadas neste estudo serão informados sobre essa alteração de status quando de suas consultas médicas de acompanhamento no HCPA.

A padronização de protocolos de PCR quantitativos em tempo real (qPCR) é um importante passo para otimizar as análises moleculares e é um dos objetivos futuros deste projeto. A combinação de excelente sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, baixo risco de contaminação e maior rapidez nas análises faz da tecnologia do PCR em tempo real uma interessante alternativa aos protocolos de PCR tradicionais (Navarro *et al.*, 2014). Ao aliar a tecnologia do PCR em tempo real com a análise da curva de *melting*, é possível aumentar a especificidade e obter resultados quantitativos. Em vistas disso, será implementado protocolo de análise da curva de *melting* metilação-específica (MS-MCA), baseado em método descrito por Dahl *et al.*, 2007 que permitirá quantificar o status de metilação do gene *FMRI*.

Muito embora as técnicas aqui propostas ainda apresentem algumas limitações, as melhorias implementadas no diagnóstico e caracterização dos pacientes com suspeita de SXF atendidos no HCPA terão impacto no aconselhamento genético e no tratamento desses pacientes.

REFERÊNCIAS

- BELL, M.V. et al. Physical mapping across the Fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. **Cell**, Cambridge, v.64, p. 861-866, feb. 1991.
- DAHL, C et al. A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome. **Clinical Chemistry**, Washington D.C., v.53, n. 4, p.790-793, apr. 2007.
- DAS, S et al. Methylation analysis of the fragile X syndrome by PCR. **Genetic Testing**, San Francisco, v.1, n. 3, p. 151-155, jan. 1997.
- LATHAM, G. et al. The role of AGG interruptions in fragile X repeat expansion: a twenty year perspective. **Frontiers in Genetics**, New York City, v. 5, n.244, p. 1-6, jul. 2014
- MACPHERSON, James N.; MURRAY, Anna. Development of genetic testing for fragile x syndrome and associated disorders, and estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations. **Genes**, Basel, v. 7, n.12, p. 1-15, nov. 2016
- MONAGHAN, Kristin G.; LYON, E.; SPECTOR, Elaine B. ACMG Standards and guidelines for fragile x testing: a revision to the disease- specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in Medicine**, Bethesda, v.15,n. 7, p. 575-586, jul 2013
- NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, n. 2015, p. 231-250, Oct 2014
- NOLIN, S et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in permutation carriers. **Genetics in medicine**, Bethesda, v.17, n.5, p. 358-364, may. 2015
- RAJAN-BABU, Indhu-Shree; CHONG, Samuel S. Molecular correlates and recent advancements in the diagnosis and screening of FMR1-related disorders. **Genes**, Basel, v.7, n. 10, p. 87, oct. 2016.
- SALDARRIAGA, Wilmar et al. Fragile X syndrome. **Colombia Médica**, Santiago de Cali, v. 45, n.4, p. 190-197, dec. 2014.
- TAPESTATION SYSTEMS: Manuals and Protocols. Disponível em <<https://www.genomics.agilent.com/literature.jsp?crumbAction=push&tabId=prod2420037&contentType=User+Manual>> em 25/11/17, às 17:51 hs.

TASSONE, Flora et al. A rapid polymerase chain reaction –based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile x (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. **Journal of molecular diagnosis**, Bethesda,v.10, n. 1,p.43-49, jan. 2008.

TEO, Clara R. L.et al. Screening for CGG repeat expansion in the FMR1 gene by melting curve analysis of combined 5' and 3' direct triplet-primed PCRs. **Clinical Chemistry**, Washington D. C., v. 3, n. 58, p. 568-579, mar. 2012.

VERHOEVEN, Willem; EGGER, Jos; FEENSTRA, Ilse. **Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment**, InTechOpen. London, 2011.

VINCENT, A. et al. Abnormal pattern detected in fragile X patients by pulse-field gel electrophoresis. **Nature**, London, v. 349, p. 624-626, feb. 1991.

VRIES, Bert B. A. et al. Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. **Journal of Medical Genetics**, Ontario, v. 33, p. 1007-1010, dec. 1996.

ZHANG, Y et al. DNA methylation analysis on a droplet-in-oil PCR array. **Lab on a chip**, London, v.9, p. 1059-1064, mar. 2009

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND POLICY

Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms.

CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials.

All published articles are reviewed by peers in a double-blind fashion. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors. The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

FORM AND PREPARATION OF ARTICLES

The following categories of contributions will be considered for publication:

Editorial

Critical and thorough review, prepared at the invitation of the editors, and submitted by an author with renowned knowledge on the subject. Editorials can have up to 1,000 words. This section may include the Journal's editorial of presentation, signed by the editor, besides special editorials that comprise requested collaborations about current themes or about articles published on the Journal.

Review Articles

Articles that aim to synthesize and critically evaluate the present knowledge on a particular theme. They should contain no more than 6,000 words. These articles should present an unstructured abstract, with no more than 200 words (except for systematic reviews – see abstract structure in 'Original Articles') and a comprehensive list, but preferably with no more than 80 references. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and the figures should be submitted as additional documents in individual files.

Special Articles

Manuscripts exclusively requested by the editors, on a subject of scientific relevance, to authors with recognized expertise in the area, and that do not meet the criteria for Editorials.

Original Articles

Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics: Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words. Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

Case Reports (Submissions in this section are restricted until October 2017)

Articles based on peculiar cases and brief comments on the importance of the case in relation to the existing knowledge in the field. They should contain up to 1,000 words, with a total of no more than two tables or figures and 15 references, once presenting a literature review is not the purpose of the reports. Their structure should present the following topics: Introduction, explaining the relevance of the case; Presentation of the case (Case Report), and Discussion. Case reports should describe novel or unusual findings, or offer new insights into a given problem. The content should be limited to facts relevant to the case. The confidentiality regarding patient identification is critical, so authors should not report any precise dates, initials, or any other information irrelevant to the case, but that may possibly identify the patient. Case reports should have an unstructured abstract with no more than 150 words. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and figures should be sent as additional documents in individual files.

Case Reports: Images in Medicine

Section devoted to the publication of informative images, which are unusual and/or of broad interest in clinical situations. It should contain no more than 500 words and a total of 5 references. Two to three images (at a resolution of at least 300 dpi).

Letters

Opinions and comments on an article published in the Journal, on subjects of scientific relevance, and/or preliminary clinical observations. The text should be concise, with no more than 500 words. Only one table and one figure are allowed, and a maximum of five references. They should not have an abstract.

Brief Communication

Brief Communications are original but preliminary or more specific research results that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. The structure is similar to original articles; however, the Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 150 words and the text should not exceed 1,200 words. A maximum of two Tables/Figures are accepted.

Supplements

In addition to regular issues, CBR publishes the supplement of the HCPA Science Week.

CONFLICTS OF INTEREST

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest. This extends to editorials and review articles, and should be done at the time of submission of the manuscript.

It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

PRIVACY AND CONFIDENCIALITY

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification, authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 196/96 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the

project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable.

PREPARATION OF THE ARTICLE

The registration on the system and subsequent access or login are mandatory to submit and verify the status of submissions.

Identification: must include: a) Title of the article, which should be clear and concise. Do not use abbreviations. There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) authors' full names; c) institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) name of the institution where the study was performed; e) indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; and f) if it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

ALL NAMES OF ALL AUTHORS INCLUDED IN THE MANUSCRIPT SHOULD BE REGISTERED IN THE SYSTEM.

Abstract and Keywords: The articles should have an abstract in Portuguese and English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author, based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>. The keywords should be presented in Portuguese and English.

Manuscript: it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference ¹.

Tables: they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical

indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript.

Figures and charts: Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the other they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both must precede the figure itself.

Abbreviations: abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name. Name of medications: the generic name should be used. In case of citing appliances/equipment: all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

Acknowledgements: should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

Conflicts of interest: If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: “The authors declare no conflicts of interest” or “None to declare.”

References: should be numbered consecutively, in the other in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called “Vancouver Style”, as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at:

<ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors' names correctly spelt. The accuracy of references is the authors' responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editors.

Examples of citing references:

Journal articles (from one to six authors)

Almeida OP. A autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? *Rev Bras Psiquiatr.* 1998;20:113-6.

Journal articles (more than six authors)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 1986;315:157-61.

Articles without the author's name

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J.* 1994;84:15.

Books

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses.* 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Chapters from a book

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Books in which editors (organizers) are authors

Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people.* New York: Churchill Livingstone; 1996.

Theses

Kaplan SJ. *Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization* [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Papers presented at conferences

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics;* 1992 Sep 6-10;

Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Electronic Journal Articles

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from:
URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Other types of reference should follow the document

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References
(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Technical requirements: Microsoft Word document (.doc or .rtf), singled space, font size 11, 2-cm margins in each side, title page, abstract and descriptors, text, acknowledgements, references, tables and legends, and the figures should be sent in jpg or tiff at a resolution of at least 300 dpi.