

Avaliação de estratégia combinada de eletroforese capilar e PCR triplo metilação-específica para diagnóstico molecular da Síndrome do X Frágil

Assessment of a combined strategy of capillary electrophoresis and methylation-specific triple polymerase chain reaction for molecular diagnosis of the Fragile X Syndrome

Marcos José Burle de Aguiar¹, Melissa Machado Viana², Letícia Lima Leão³, Amanda Silva Matos⁴, Dora Méndez del Castillo⁵, José Nélio Januário⁶

RESUMO

Introdução: a síndrome do X frágil é a principal causa de retardo mental de natureza familiar. Suas características clínicas pouco marcantes fazem com que um diagnóstico de certeza a partir de testes moleculares seja imprescindível. **Objetivo:** descrever e avaliar as vantagens e desvantagens de uma estratégia combinada de PCR triplo metilação-específica e eletroforese capilar para o diagnóstico molecular da síndrome do X frágil, visando baixo custo, exequibilidade, reprodutibilidade e sensibilidade. **Métodos:** foram coletadas 43 amostras de sangue de pacientes com déficit cognitivo e de suas mães, quando indicado. Tais indivíduos possuíam exame citogenético positivo, fenótipo e/ou história familiar sugestivas de síndrome do X frágil. Após extração de DNA, foi realizada eletroforese capilar com marcadores fluorescentes, tratamento com bissulfito de sódio e três reações de PCR metilação-específicas em cada amostra. **Resultados:** foi possível determinar o genótipo em 29 pacientes: 23 (14 homens e nove mulheres) apresentavam alelos com tamanho normal e seis (todos do sexo masculino) possuíam alelos na faixa de mutação completa. Em outras seis amostras, todas do sexo feminino, foi possível determinar um alelo na faixa normal e outro alelo alterado, entretanto, sem diferenciação entre faixa de pré-mutação ou de mutação completa. Nas demais oito amostras (cinco homens e três mulheres), não se pôde determinar o genótipo. **Conclusões:** a técnica proposta faz uma triagem de pacientes, mas apresenta desvantagens, como não terem sido obtidos resultados satisfatórios com as reações para alelos metilados e a análise dos rastros das PCRs com três *primers* ter se mostrado difícil e dependente de observador.

Palavras-chave: Síndrome do Cromossomo X Frágil; Patologia Molecular; Eletroforese Capilar; Bissulfito de Sódio, Reação em Cadeia da Polimerase; Metilação.

ABSTRACT

Introduction: The fragile X syndrome is the main cause of inherited mental retardation. Its very small remarkable clinical characteristics make that a surely diagnosis from molecular tests be indispensable. **Objective:** To describe and assess the advantages and disadvantages of a combined strategy of methylation-specific triple polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis for the molecular diagnosis of the fragile X syndrome, seeking low cost, feasibility, reproducibility, and sensibility. **Methods:** 43 blood samples were collected from patients with cognitive deficit and their mothers, when indicated. Such subjects presented a positive cytogenetic exam, phenotype and/or familiar history suggestive of the fragile X syndrome. After DNA extraction, capillary electrophoresis with fluorescent markers, treatment with sodium bisulfite, and three methylation-specific PCR reactions were performed in each sample. **Results:** It was possible to determine the genotype in 29 patients: 23 (14 men and 9 women) presented alleles with normal size and six (all male) had them in the complete mutation range. In other six female samples, it was possible to determine an allele in the

¹ Médico geneticista. Professor Associado do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais-FM/ UFMG. Vice-Diretor do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico-NUPAD/ FM/ UFMG. Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas da – UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

² Médica geneticista. Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas da UFMG. Doutoranda em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, FM/ UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

³ Médica Geneticista. Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas da – UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

⁴ Biomédica, Técnica em Biologia Molecular do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD/FM/UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

⁵ Médica geneticista. Coordenadora do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD/FM/UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

⁶ Médico. Professor do Departamento de Clínica Médica da FM/UFMG. Diretor geral do NUPAD/FM/UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

Recebido em: 17/08/2011
Aprovado em: 29/09/2012

Instituição
Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte, MG – Brasil

Endereço para correspondência:
Prof. Dr. Marcos José Burle de Aguiar
Av. Alfredo Balena, 198, 10º andar, sala 1006
Bairro: Santa Efigênia
CEP: 30130-100
Belo Horizonte, MG – Brasil
E-mail: aguiarmr@terra.com.br

normal range and another altered; nevertheless, without differentiation between the pre-mutation or complete mutation ranges. In the other eight samples (five men and three women), it was not possible to establish the genotype.

Conclusions: The suggested technique does a patient's screening, but it has some disadvantages such as non-satisfying results been seen with the reactions for methylated alleles and analysis of the PCRs tracks with three primers being difficult and dependent on the observer.

Key words: Fragile X Syndrome; Pathology, Molecular; Electrophoresis, Capillary; Sodium Bisulfate; Polymerase Chain Reaction; Methylation.

INTRODUÇÃO

A síndrome do X frágil é a principal causa de retardo mental de natureza familiar. Calcula-se sua prevalência em 1:4.000 no sexo masculino e 1:6.000 no sexo feminino.¹ Em Belo Horizonte, estudando alunos com retardo mental leve e grave matriculados em escolas públicas de ensino especial, foi encontrada prevalência próxima de 2%.^{2,3} Clinicamente não existem características físicas singulares e marcantes que diferenciem um paciente com retardo mental como parte da síndrome do X frágil e outro com retardo mental sem tal diagnóstico etiológico.⁴

Em 1991, foi identificado o gene envolvido na síndrome do X frágil, denominado *FMR1*⁵, localizado em Xq27.3 (sítio FRAXA), com extensão de 38 kb e 17 éxons.⁶ Em sua região 5'-UTR (5' – *untranslated region*) há uma repetição polimórfica CGG não transcrita que, quando expandida, causa a síndrome do X frágil.

De acordo com o número de repetições CGG, seus efeitos sobre a proteína produzida e, conseqüentemente, sobre o fenótipo dos indivíduos, dois tipos de mutações são identificados: as pré-mutações e as mutações completas. As mutações completas, com mais de 200 repetições, são completamente metiladas, o que inativa o gene *FMR1*. As mutações completas se associam à deficiência mental em todos os homens e em 50 a 70% das mulheres.⁷ Já portadores de pré-mutações, com 55 a 200 repetições, podem apresentar pelo menos uma de três alterações clínicas: déficit cognitivo e/ou comportamental leve, insuficiência ovariana prematura associada ao X frágil (*Fragile-X Associated Premature Ovarian Insufficiency-FXPOI*) em mulheres e distúrbio neurodegenerativo em portadores adultos do sexo masculino, conhecido como síndrome de tremor /ataxia associada ao X frágil (*Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome-FXTAS*).^{8,9}

Até a clonagem do gene *FMR1*, o único método disponível para o diagnóstico da síndrome do X frágil era

a detecção do sítio frágil na região q27.3 do cromossomo X por técnicas citogenéticas. O resultado é dado a partir do percentual de células encontradas com o sítio frágil. Trata-se de método caro, demorado e dependente do observador, uma vez que exige a análise de elevado número de metáfases. É também pouco acurado, com resultados falso-positivos e falso-negativos.

Atualmente, o padrão-ouro para diagnóstico molecular da síndrome do X frágil é uma combinação entre *Southern blot* e técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) metilação-específica. A combinação de ambos faz com que o diagnóstico seja bastante confiável, uma vez que a maior desvantagem do método de *Southern blot* é distinguir com dificuldade alelos normais grandes e pré-mutações pequenas, enquanto as técnicas de PCR metilação-específica apresentam baixa sensibilidade para detecção de pré-mutações grandes e alelos com mutações completas, especialmente em mulheres. Apesar da confiabilidade, todo o processo diagnóstico é lento e tedioso.¹⁰ Por isso, vários métodos diagnósticos são desenvolvidos na comunidade científica com o objetivo de substituir a técnica padrão-ouro.¹¹⁻¹³

Em 2004, Zhou *et al.*¹⁰ descreveram um teste de diagnóstico molecular alternativo que envolvia modificação do DNA com bissulfato e três reações em seqüência de PCR-metilação específica, as quais, sendo analisadas em conjunto, forneciam a categoria dos alelos estudados (normais, pré-mutados e mutação completa). Esse método mostrou-se eficaz, confiável e mais rápido em relação à associação *Southern blot* e PCR-metilação específica.

Os exames moleculares não são realizados no Sistema Único de Saúde (SUS), fazendo com que o diagnóstico dessa doença em nosso país seja ainda dependente dos exames citogenéticos, o que traz conseqüências negativas nos dois sentidos. De um lado, deixa-se de firmar o diagnóstico de muitos afetados e de fazer o aconselhamento genético dessas famílias. Por outro lado, firma-se o diagnóstico e faz-se aconselhamento genético de famílias em que não há algum indivíduo afetado.

Desenvolveu-se uma estratégia combinada da técnica descrita por Zhou *et al.*¹⁰ de PCR triplo metilação-específica acrescida de eletroforese capilar para o diagnóstico molecular da síndrome do X frágil, visando baixo custo, exequibilidade, reprodutibilidade e sensibilidade, o que tornaria possível a sua implementação em laboratórios que prestam serviços para a rede pública de saúde. O objetivo do presente artigo é descrever e avaliar as vantagens e desvantagens dessa metodologia.

METODOLOGIA

Pacientes

Foram coletadas 43 amostras de sangue de pacientes e de suas mães, quando indicado. Participaram do estudo indivíduos com déficit cognitivo e/ou fenótipo sugestivo de síndrome do X frágil e/ou pesquisa citogenética de X frágil positiva e/ou história familiar compatível com a doença. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado em todos os casos. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ETIC 124/00) e financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Métodos

O sangue coletado (amostras de aproximadamente 5 mL de sangue total colhidas em EDTA como anticoagulante) foi submetido à extração de DNA Chelex 100¹⁴, diluído em 50 µL de água e conservado a -20°C até a sua utilização.

As amostras de DNA foram usadas para padronização das reações de PCR com marcadores fluorescentes seguida de eletroforese capilar e PCR metilação-específica, objetivando detectar alelos normais, pré-mutados ou com a mutação completa no gene *FMR1*.

PCR e marcadores fluorescentes

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo 5 µL da solução de DNA e *buffer*, 200 µM de dATP, dTTP, dCTP e 7-deaza-dGTP em substituição ao dGTP, 1 mM de MgSO₄, 5 mL de *GC Rich Solution* e 0,5 U de *pwo* DNA polimerase (*Boehringer Mannheim*) com base em metodologia previamente descrita.¹⁵ Para a marcação fluorescente foram utilizados os seguintes *primers*: 25 pmoles do *primer A* e 25 pmoles do *primer 517R*¹⁶ marcado com 6-FAM. A amplificação foi realizada utilizando-se o termo-cicildor *GeneAmp™ PCR System 9700* (*Applied Biosystems*). Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese capilar (empregando-se capilar de 36 cm de comprimento e poliacrilamida a 4%) no Analisador Automático de DNA *ABI3130XL™* (*Applied Biosystems*). Os resultados obtidos foram analisados com o *software Genescan™*, do mesmo fabricante, por

comparação com um padrão de peso molecular injetado com as amostras (*GS500LIZ™*, *Applied Biosystems*). Com tal metodologia, foi possível detectar e quantificar com precisão os alelos normais do *locus FRAXA* e os alelos pré-mutados até um tamanho de aproximadamente 120 repetições. O fator de correção para os valores dos tamanhos dos alelos obtidos por eletroforese capilar com 7-deaza-dGTP foi igual a 1,07.¹⁷

Modificação do DNA a partir do tratamento com bissulfito de sódio

Para a análise do estado de metilação de citosinas, o DNA foi tratado com bissulfito de sódio, que converte os resíduos de citosina em uracila por deaminação e posterior dessulfonação alcalina, o que afeta a forma metilada da citosina (5-metilcitosina).¹⁸ Quando o DNA tratado por bissulfito é amplificado via reação em cadeia da polimerase, a uracila é amplificada como timina e as citosinas metiladas são amplificadas como citosina. Essa técnica permite, portanto, diferenciar citosinas metiladas de citosinas não metiladas no DNA genômico.

PCR metilação-específica

Foram realizadas três reações de PCR metilação-específica:

- **PCR para alelos não metilados:** com o uso de *primers* específicos para a sequência-alvo não metilada (alelos normais e pré-mutados não metilados) nas condições de reação previamente descritas,¹⁰
- **PCR para alelos metilados:** com *primers* específicos para a sequência-alvo metilada (alelos normais, pré-mutados e com mutação completa até aproximadamente 350 pares de bases – pb, metilados), nas condições de reação previamente descritas,¹⁰
- **PCR específica tipo três *primers*:** com dois *primers* específicos para amplificar internamente a região de repetições CGG e mais um terceiro *primer* complementar à sequência do *primer* reverso (esse sistema amplifica todos os alelos normais, pré-mutados e com mutação completa, metilados) nas condições de reação previamente descritas.¹⁰

Depois de feitas as reações de amplificação dos três sistemas descritos anteriormente, alíquotas de 20 µL dos produtos obtidos foram analisadas por eletro-

forese em gel de agarose a 1,5% e visibilizadas por *SyberGreen* (*Promega*).

Após a eletroforese, os três sistemas foram interpretados como se segue: no sistema 1, visibilização de bandas correspondentes aos alelos não metilados (normais ou pré-mutados); no sistema 2, bandas correspondentes aos alelos metilados (normais, pré-mutados ou mutados com tamanho de até 300 pb, aproximadamente – Figura 1); no sistema 3, visibilização de um “rastros” cuja extensão depende do tamanho da região de repetições CGG, sendo possível, nesse sistema, diferenciar o rastros produzido por um alelo mutado ou pré-mutado do correspondente a um alelo normal (Figura 2).

RESULTADOS

Foram coletadas 43 amostras de pacientes e de suas mães, quando indicado. Todos os indivíduos apresentavam déficit cognitivo e/ou fenótipo sugestivo de síndrome do X frágil e/ou pesquisa citogenética de X frágil positiva e/ou história familiar compatível com a doença. Na Tabela 1 estão descritos os pacientes (individuais ou agregados com seus respectivos familiares, quando a família foi estudada) e os resultados dos exames citogenético e molecular de acordo com o protocolo de eletroforese capilar e PCR triplo metilação-específica.

Das 43 amostras analisadas, foi possível determinar o genótipo em 29. Destes, em 23 (14 homens e nove mulheres) os alelos tinham tamanho normal e seis (todos do sexo masculino) possuíam alelos na faixa de mutação completa. Em outras seis amostras, todas de pacientes do sexo feminino, foi possível determinar um alelo na faixa normal e outro alelo alterado, entretanto, não foi possível saber ao certo se os alelos se encontravam na faixa de pré-mutação ou de mutação completa. Nas demais oito amostras (cinco homens e três mulheres), não foi possível determinar o genótipo.

A família 8 foi usada como controle positivo, uma vez que possuía exame molecular prévio, confirmando o genótipo de cada um de seus membros. Segundo tal diagnóstico prévio, a mãe apresentava um alelo na faixa de pré-mutação e um alelo normal, dois filhos possuíam mutação completa e o terceiro filho apresentava alelo na faixa normal. De acordo com o método proposto no projeto, foi possível determinar que: a) a mãe possuía um alelo na faixa normal e outro alelo alterado, não foi possível determinar se pré-mutação ou mutação completa; b) um filho com exame prévio mostrando mutação completa exibiu exame compatível com mutação completa em nosso estudo; c) no outro filho com mutação completa, não foi possível determinar o genótipo e, finalmente, no terceiro filho, foi encontrado exame compatível com alelo normal.

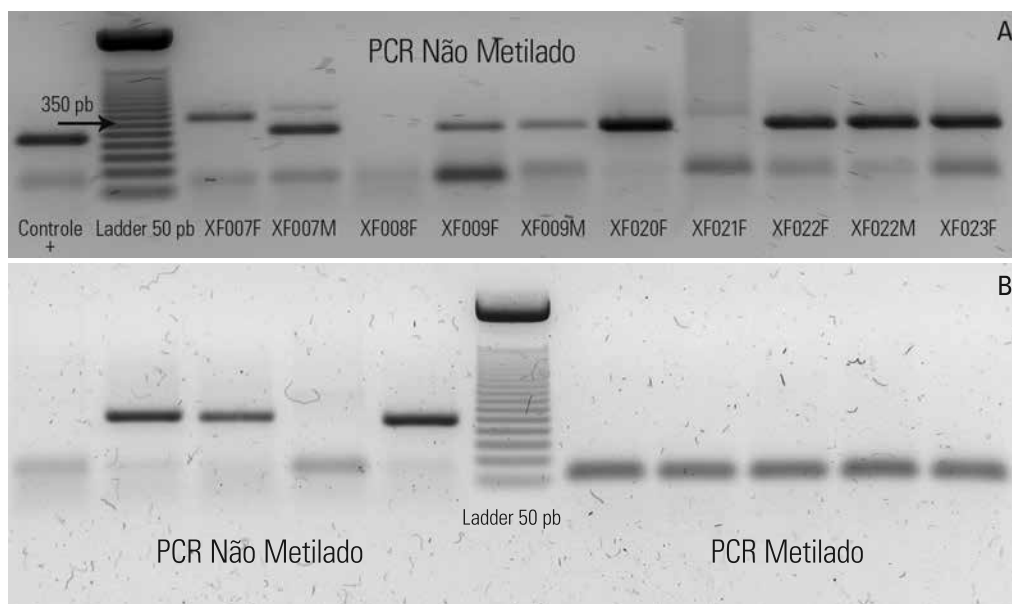


Figura 1 - Géis de agarose a 1,5% com produtos das PCRs para alelos não metilados e metilados.

A – Produtos de PCRs para alelos não metilados mostrando bandas facilmente visíveis. B – Comparação entre produtos de PCRs para alelos não metilados (à esquerda) e para alelos metilados (à direita). As PCRs para alelos metilados não foram confiáveis e reprodutíveis neste estudo.

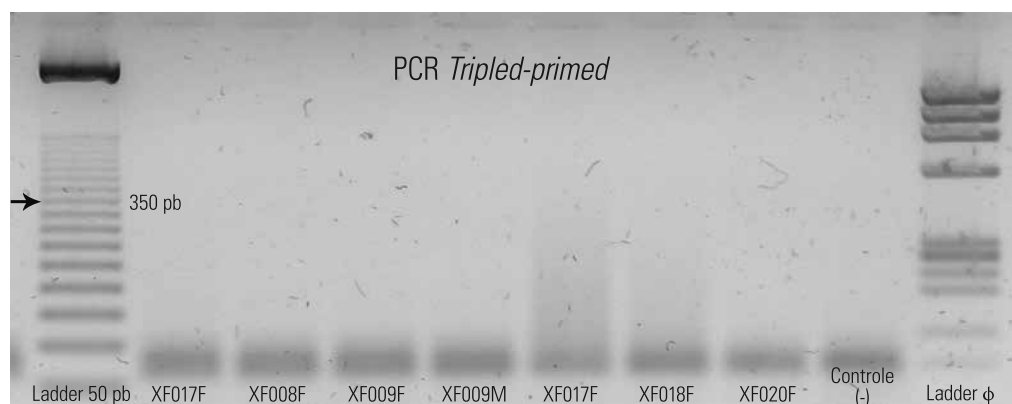


Figura 2 - Géis de agarose a 1,5% com produtos de PCR com três primers.

Imagem obtida após visibilização com SyberGreen. Dois produtos de PCR apresentaram rastro longo (acima de 350 pares de base – pb), XF017F e XF018F. As demais canaletas continham produtos de PCR de outras amostras, porém com difícil visibilização de rastro. Controle (-): amostra de homem normal.

Tabela 1 - Pacientes avaliados no estudo, com os respectivos resultados de exames citogenético e molecular

Famílias/ Pacientes	Sexo	Parentesco	Cariótipo com pesquisa de X Frágil	Exame molecular compatível com mutação completa (FM)	Exame molecular com alelos normais	Genótipo não determinado	Mulheres com um alelo normal e outro sem diferenciação entre FM e PM
Família 1	M	filho	+	√			
	F	filha	+	√			
	F	mãe	NR				√
Família 2	M	filho	+	√			
	M	filho	+	√			
	F	mãe	NR				√
Família 3	M	filho	+			√	
	F	filha	+		√		
	F	mãe	NR		√		
Família 4	M	filho	+			√	
	F	filha	+	√			
	F	mãe	NR				√
Família 5	M	filho, gêmeo dizigótico	NR		√		
	F	filha, gêmeo dizigótico	-		√		
	F	mãe, com FOP	NR		√		
Família 6	M	filho	+		√		
	F	filha	NR		√		
	F	filha	NR		√		
	F	filha	NR			√	
Família 7	F	mãe	NR		√		
	M	filho	-		√		
Família 8	M	Filho	+	√			
	M	Filho	+			√	
	M	Filho	-		√		
	F	Mãe, com FOP	NR				√

Continua...

... continuação

Tabela 1 - Pacientes avaliados no estudo, com os respectivos resultados de exames citogenético e molecular

Famílias/ Pacientes	Sexo	Parentesco	Cariótipo com pesquisa de X Frágil	Exame molecular compatível com mutação completa (FM)	Exame molecular com alelos normais	Genótipo não determinado	Mulheres com um alelo normal e outro sem diferenciação entre FM e PM
Família 9	M	Filho	-		√		
	M	Filho	-		√		
	M	Filho	-		√		
	F	Mãe	NR		√		
Família 10	M	Filho	NR			√	
	F	Filha	NR				√
Família 11	M	Filho, gêmeo monozigótico	-		√		
	M	Filho, gêmeo monozigótico	-		√		
Família 12	M	Filho	+			√	
	F	Mãe	NR				√
Família 13	M	Filho	+			√	
	F	Mãe	NR		√		
Paciente 1	M	Amostra única	-		√		
Paciente 2	M	Amostra única	+			√	
Paciente 3	M	Amostra única	-		√		
Paciente 4	M	Amostra única	-		√		
Paciente 5	M	Amostra única	-		√		

NR: Não realizado. (+): positivo. (-): negativo. FOP: falência ovariana prematura. FM: mutação completa. PM: pré-mutação. √: resultado obtido com a técnica proposta.

Nos seis pacientes com exame compatível com mutação completa em nosso estudo, o exame citogenético foi positivo para a síndrome do X frágil. Dos pacientes que apresentaram alelo com tamanho normal, dois apresentavam citogenética positiva, 11 possuíam citogenética negativa e 10 não haviam feito exame citogenético (sete mulheres, sendo cinco mães de pacientes; e três homens). Entre os pacientes em que não foi possível determinar o genótipo, cinco possuíam citogenética positiva e três não haviam feito exame citogenético.

DISCUSSÃO

A demanda por métodos laboratoriais para o diagnóstico da síndrome do X frágil que sejam mais baratos, mais rápidos e mais sensíveis que o padrão-ouro tem aumentado nos últimos anos. O método considerado padrão para o diagnóstico da doença permanece lento e trabalhoso, uma vez que combina técnicas de *Southern blot* e PCR. Diante disso, os autores desenvolveram uma estratégia combinada de

eletroforese capilar e PCR triplo metilação-específica para diagnóstico molecular da síndrome do X frágil.

Foram obtidos ótimos resultados com a metodologia de eletroforese capilar. O método padronizado permite detectar e medir os alelos normais e, provavelmente, pré-mutados até 120 repetições, ou seja, 360 pares de bases (pb). Não foi possível estabelecer o limite exato de detecção em relação ao tamanho de alelo por essa metodologia, uma vez que seria necessária uma amostra com número maior de pacientes do que o selecionado para o estudo. Em pacientes masculinos com mutação completa, é possível inferir o diagnóstico pela ausência de picos característicos no eletroferograma, pois pacientes do sexo masculino possuem apenas um cromossomo X. Já em pacientes do sexo feminino, a existência de apenas um pico mostra que, em um dos cromossomos X, existe um alelo normal ou pré-mutado até 360 pb, mas não é possível inferir sobre o segundo alelo presente no outro cromossomo X (se se trata de mutação completa ou pré-mutação acima de 120 repetições). Portanto, o método padronizado de eletroforese capilar é útil como uma triagem das amostras

que serão submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio e posterior PCRs para alelos metilados, não metilados e com três *primers*. De fato, Bosserhoff *et al.*¹⁹ consideraram a eletroforese capilar como método robusto, de fácil execução, boa reprodutibilidade e baixo custo, útil para triagem de alto número de amostras de forma automatizada.

Foram obtidos ótimos resultados para o tratamento com bissulfito de sódio sem a utilização de colunas de purificação. Tal tratamento mostrou ótimos resultados e reduziu o custo das reações. É um protocolo facilmente reproduzível, porém que necessita de tempo para a realização (somente uma das incubações dura cinco horas) e o produto final obtido é de apenas 20 µL de DNA modificado. Para se conseguir quantidade significativa de amostra é necessário que as reações sejam feitas em duplicatas ou até triplicatas, o que torna o processo ainda mais lento.

O tratamento com bissulfito de sódio, quando associado a sequenciamento de DNA, tem se tornado o método padrão-ouro para estudos de epigenômica que avaliam a influência do processo de metilação no genoma humano.²⁰ No que diz respeito à síndrome do X frágil, o bissulfito tem sido utilizado em associação a uma variedade de técnicas.²⁰⁻²² Na maioria dos estudos, são empregadas colunas de purificação após o tratamento com bissulfito, o que aumenta o custo da reação. No presente trabalho, foi possível desenvolver uma técnica sem a utilização de colunas de purificação e com obtenção de DNA modificado de qualidade comparável.

Foram obtidos bons resultados para a PCR específica para detecção de alelos não metilados e para a PCR específica com três *primers*. As PCRs para alelos não metilados produziram amplicons de fácil visualização pela técnica proposta. Já as PCRs com três *primers* forneceram resultados satisfatórios quando os alelos mostravam rastro acima de 350 pb, facilmente visualizados, entretanto, rastros abaixo de 350 pb não foram visualizados de forma satisfatória, dificultando a diferenciação entre ausência de amplificação e rastro normal.

Os resultados obtidos para a PCR específica para alelos metilados foram variáveis. Não foram apurados resultados reproduzíveis nas condições de amplificação testadas. É sabido que fragmentos de DNA com alta concentração de citosinas e guaninas são dificilmente amplificados devido à estrutura secundária formada por tais bases, que dificultam a amplificação do segmento desejado durante a PCR. O acréscimo do nucleotídeo 7-deaza-GTP ajuda a evitar a forma-

ção das estruturas secundárias e melhora a reação de PCR, mas não foi suficiente para atingir a reprodutibilidade adequada. Mesmo após a diferenciação entre citosinas metiladas e não metiladas em consequência ao tratamento com bissulfito de sódio, as reações não foram confiáveis, o que dificulta a inserção dessa PCR como rotina na prática laboratorial para diagnóstico molecular da síndrome do X frágil. Sofocleous *et al.*¹³ deixam evidente em sua revisão os inúmeros protocolos de PCR já relatados, diferentes entre si pela introdução de diversos reagentes suplementares, a fim de reduzir os problemas do alto conteúdo de bases C e G.

O problema encontrado em pacientes do sexo feminino em que não era possível diferenciar entre alelos pré-mutados e alelos com mutação completa deve-se ao fato de a PCR para alelos metilados não ter sido confiável. Entretanto, a inativação do X e mosaicos (por exemplo, mulheres com pré-mutação e mutação completa) no sexo feminino podem complicar a interpretação de resultados de PCRs metilação-específica.^{23,24}

Já nos pacientes em que não foi possível determinar o genótipo, encontrou-se uma combinação de resultados na eletroforese capilar, PCR para alelos não metilados e PCR com três *primers* que não era compatível com algum genótipo, segundo as especificações de Zhou *et al.*¹⁰ Não nos foi possível determinar o motivo de tal ocorrência.

A estratégia combinada de eletroforese capilar e PCR tripla metilação-específica para diagnóstico molecular da síndrome do X frágil é teoricamente muito interessante, pois utiliza a eletroforese capilar como método de triagem dos pacientes, afastando, entre os suspeitos, aqueles que não têm a síndrome do X frágil. Os autores acreditam que a eliminação por eletroforese capilar de dois grupos de pacientes (homens normais e mulheres normais) das demais etapas propostas seja importante na prática laboratorial, pois permite diagnóstico mais rápido dos casos negativos e evita gasto desnecessário de tempo e recursos.

No geral, a estratégia proposta não obteve resultados satisfatórios. A determinação dos genótipos não foi confiável, não foi possível diferenciar entre mulheres pré-mutadas e com mutação completa e, em alguns pacientes com alta suspeição clínica de síndrome do X frágil, não se pôde inferir um diagnóstico molecular. Além disso, todo o processo requer considerável gasto de tempo e de recursos financeiros. Os autores acreditam que a publicação de pesquisas com resultado negativo deve ser encorajada, pois também contribuem para o conhecimento científico.

Protocolos mais avançados, como análise de curvas de fusão metilação-específicas e amplificação por meio de PCR multiplex em tempo real metilação-específica²⁴⁻²⁶, têm sido descritos, mas ainda não há validação de qualquer dos métodos, já que não foram aplicados em grandes grupos populacionais para análise sistemática de pacientes.¹³

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização do projeto “Avaliação de estratégia de diagnóstico molecular da síndrome do X frágil para aplicação na rede pública de saúde”.

REFERÊNCIAS

- Turner AM, Robinson H, Laing S, Purvis-Smith S. Preventive screening for the fragile X syndrome. *N Engl J Med.* 1996; 315:607-9.
- Haddad LA, Aguiar MJB, Costa SS, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet A.* 1999; 94:198-201.
- Aguiar MJB. Estudos clínico-moleculares em alunos com retardo mental leve e grave matriculados nas escolas de ensino especial da Secretaria de Estado da Educação de Minas Gerais [Tesis]. Belo Horizonte (MG): UFMG; 2001.
- Hagerman RJ, Staley LW, O'connor R, *et al.* Learning-disabled males with a fragile X CGG expansion in the upper premutation size range. *Pediatrics.* 1996; 97:122-3.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cen.* 1991; 65:905-14.
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson OL. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 1993; 2:1147-53.
- Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, *et al.* A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe Stb 12.3: the first 2.253 cases. *Am J Hum Genet.* 1994; 55:225-37.
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, *et al.* Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 2001; 57:127.
- Bretherick K, Fluker M, Robinson W. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet.* 2005; 117: 376-82.
- Zhou Y, Law HY, Boelund CD, *et al.* Robust fragile X (CGG)n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet.* 2004 Apr; 41(4):e45.
- Oostra BA, Willemsen R. Diagnostic tests for fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001; 1(2):226-32.
- Oostra BA, Willemsen R. The X chromosome and fragile X mental retardation. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 99(1-4):257-64.
- Sofocleous C, Kolialexi A, Mavrou A. Molecular diagnosis of fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009; 9.1: 23-30.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1994; 10(4):506-13.
- Larsen LA, Gronskov K, Norgaard-Pedersen B, Brøndum-Nielsen K, Hasholt L, Vuust J. High-throughput analysis of fragile X (CGG) n alleles in the normal and premutation range by PCR amplification and automated capillary electrophoresis. *Hum Genet.* 1997; 100(5-6):564-8.
- Chong SS, Eichler EE, Nelson DL, Hughes MR. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am J Med Genet.* 1994; 51(4):522-6.
- Satow T, Akiyama T, Machida A, Utagawa Y, Kobayashi H. Simultaneous determination of the migration coefficient of each base in heterologous oligo-DNA by gell-filled capillary electrophoresis. *J Chromatogr.* 1993; 652: 23-30.
- Boyd VL, Zon G. Bisulfite conversion of genomic DNA for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increased throughput. *Anal Biochem.* 2004; 326: 278-280.
- Bosserhoff AK, Buettner R, Hellerbrand C. Use of capillary electrophoresis for high throughput screening in biomedical applications. A minireview. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2000; 3(6):455-66.
- Boyd VL, Moody KI, Karger AE, Livak KJ, Zon G, Burns JW. Methylation-dependent fragment separation: direct detection of DNA methylation by capillary electrophoresis of PCR products from bisulfite-converted genomic DNA. *Anal Biochem.* 2006; 354, 266-73.
- Hayatsu H. Bisulfite modification of cytosine and 5-methylcytosine as used in epigenetic studies. *Genes Environ.* 2006; 28(1):1-8.
- Boyd VL, Moody KI, Karger AE, Livak KJ, Zon G, Burns JW. Methylation-dependent fragment separation: novel analysis of 5-methylcytosine by capillary electrophoresis of amplified DNA using PCR incorporation of chemically modified dCTP. *Nucleos, Nucleot and Nucl Acid.* 2007; 26: 629-34.
- Zhou Y, Lum JM, Yeo GH, Kiing J, Tay SK, Chong SS. Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. *Clin Chem.* 2006; 52: 1492-500.
- Dahl C, Grønskov K, Larsen LA, Guldberg P, Brøndum-Nielsen K. A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome. *Clin Chem.* 2007; 53: 790-3.
- Nygren AO, Lens SI, Carvalho R. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification enables a rapid and reliable distinction between male FMR1 premutation and full-mutation alleles. *J Mol Diagn.* 2008; 10(6): 496-501.
- Elias MH, Ankathil R, Salmi AR, Sudhikaran W, Limprasert P, Zilfali BA. A new method for FMR1 gene methylation screening by multiple methylation-specific real-time polymerase chain reaction. *Gen Test Mol Bio.* 2011; 15(6): 387-93.