



QUEIMANDO A CABEÇA! ENTENDENDO A SÍNDROME DO CROMOSSOMO X FRÁGIL.

Rafaella Maria Pessutti Nascimento, Fernando Janczur Velloso e Leonardo Pires Capelli

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - SP.

e-mail: leocapelli@hotmail.com

Palavras-chave: síndrome do X frágil; gene *FMRI*; repetições CGG

Resumo

Por meio de um modelo didático simples, que utiliza caixas e palitos de fósforos, será possível entender o que ocorre com o gene envolvido na síndrome do cromossomo X frágil, a principal causa de deficiência mental herdada. A demonstração utiliza materiais simples, pode ser facilmente repetida e aborda conceitos genéticos como transcrição gênica e herança ligada ao cromossomo X. Para facilitar a compreensão da atividade, um material em vídeo também foi preparado (acesso ao vídeo: <http://www.youtube.com/watch?v=bBxpOHrEOJ0>).

A idéia fundamental desse trabalho é que professores e pesquisadores possam utilizá-lo, respectivamente, com alunos e familiares de indivíduos com SXF (Síndrome do X Frágil), POF (Falência Ovariana Prematura, na sigla em inglês) e/ou FXTAS (Síndrome de Tremor e Ataxia associada ao X Frágil, na sigla em inglês). Pretendemos ainda que o maior número possível de pessoas tome conhecimento sobre esses quadros clínicos, permitindo um pequeno contato com o universo da pesquisa científica.

Introdução

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF) é a causa mais comum de deficiência mental herdada; a doença recebe esse nome porque indivíduos afetados e algumas mulheres heterozigotas para o gene da síndrome apresentam, na porção distal do braço longo do cromossomo X (Xq27.3) uma falha cromossômica ou sítio frágil. O gene envolvido na síndrome, chamado *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation I*), contém na sua porção inicial (região 5') um conjunto de trincas de nucleotídeos do tipo CGG (Citosina, Guanina e Guanina), que varia no número de repetições, faz parte do RNA mensageiro (mRNA), mas não está presente na proteína. A maioria das pessoas na população possui entre seis e 54 dessas trincas. Os indivíduos com mais de 200 trincas CGG – i.e., portadores da mutação completa – deixam de sintetizar a proteína codificada

por esse gene (chamada FMRP – *Fragile X Mental Retardation Protein*), uma vez que o excesso de trincas CGG leva à metilação do gene, o que impede sua transcrição e consequente tradução. A frequência de indivíduos com a mutação completa é de ~1:2500 na população (Hagerman, 2008). A proteína FMRP tem importante papel no controle de tradução de diversos mRNAs, inclusive do seu próprio transcrito, e a ausência da FMRP leva ao quadro de deficiência mental (Pierretti e col., 1991; revisão em Hagerman e Hagerman, 2004).

Entre as repetições de tamanho normal e aquelas consideradas como mutação completa, existe uma faixa denominada pré-mutação ($55 < \text{CGG} < 200$), onde, em geral, os indivíduos são fenotipicamente normais. É nessa faixa que ocorre a instabilidade que pode aumentar o número de repetições levando à mutação completa, porém, isso ocorre apenas na transmissão por via materna. A razão de esta instabilidade ser dependente da origem parental ainda é desconhecida (Nolin e col., 2003; Capelli e col., 2005).

Apenas os indivíduos com a mutação completa do gene *FMRI* tem a SXF. No entanto, duas outras entidades clínicas estão associadas aos alelos pertencentes à faixa da pré-mutação. Nas mulheres portadoras já está bem caracterizada, desde meados da década de 1980, a associação com a menopausa precoce ou POF (*Premature Ovarian Failure*, ou seja, a interrupção da menstruação antes dos 40 anos de idade), que acomete aproximadamente 20% das mulheres de famílias SXF (Vianna-Morgante, 1999; Costa e col., 2006).

A outra entidade clínica relacionada com a pré-mutação foi descrita mais recentemente (Hagerman e col., 2001), e acomete cerca de 40% dos homens portadores acima dos 50 anos de idade das famílias SXF. Trata-se de um quadro neurodegenerativo progressivo denominado FXTAS (*Fragile X-associated Tremor and Ataxia Syndrome*), que envolve tremor de intenção, ataxia de marcha, Parkinsonismo, neuropatia periférica e declínio cognitivo. Esse quadro é completamente distinto da alteração de neurodesenvolvimento presente em indivíduos com SXF (Capelli e col., 2007; Gonçalves e

col., 2007; revisão em Jacquemont e col., 2007). Como se nota, síndromes distintas ocorrem por diferentes mutações em um mesmo gene que apresenta um padrão complexo de herança.

Assim sendo, é essencial que professores, alunos e indivíduos de famílias em que o gene *FMRI* esteja segregando de maneira instável compreendam: (1) o intrincado padrão de herança desse gene e (2) como o funcionamento anormal do gene leva a padrões clínicos bastante distintos.

Atividade

No primeiro momento da atividade, o professor deve apresentar a genealogia representada na Figura 1 e abrir uma discussão com a seguinte questão: “Qual o padrão de herança dessa doença genética?”.

R: Na realidade, não esperamos que os alunos identifiquem com precisão o padrão de herança dessa doença. Ainda assim, sugerimos que o professor incentive os alunos a responderem, para que tenha início uma discussão. Após as respostas iniciais, provavelmente incompletas, o professor deve atentar os alunos para as diferentes características observáveis na genealogia:

(a) É possível perceber que existem indivíduos que são portadores de alelos alterados e que não são afetados, além dos indivíduos propriamente indicados como afetados;

(b) Não se trata de um padrão de herança tipicamente mendeliano. Caso fosse uma doença com o padrão de herança ligada ao X clássico, o indivíduo III-1, por exemplo, teria de ser afetado;

(c) A herança autossômica também não seria a explicação mais adequada, pois há um excesso de homens afetados nessa genealogia (em padrões típicos de herança autossômica, ambos os sexos são igualmente afetados);

(d) As filhas do indivíduo III-1 e a mãe de III-1 não são afetadas, mas os filhos delas (ver III-4, V-2, V-3, V-5, V-7 e V-8) podem ser afetados;

(e) O risco de afetados é maior na prole das filhas de III-1 (IV-1 e IV-2) do que na prole de sua mãe (II-2) (o professor deve mostrar aos alunos que o número de indivíduos afetados tende a se concentrar nas gerações mais recentes);

(f) O professor deve estar ciente de que, apesar de algumas mulheres representadas na genealogia estarem representadas por círculos escuros, indicando que seriam afetadas pela síndrome de deficiência mental, elas geralmente são fenotipicamente normais do ponto de vista intelectual, não impedindo as funções reprodutivas (por exemplo, indivíduo IV-5).

Essa genealogia hipotética é uma representação da segregação do gene *FMRI* alterado na síndrome do cromossomo X frágil, que, como o próprio nome diz, tem herança ligada a esse cromossomo. Como mencionado

anteriormente, o mecanismo principal envolvido na doença é o aumento do número de repetições de trincas de nucleotídeos do tipo CGG na porção 5' não traduzida do gene *FMRI*. Pela genealogia, é possível então detectar três variações gênicas distintas: os indivíduos normais, os indivíduos afetados (portadores da mutação completa) e os indivíduos portadores de uma pré-alteração, que não causa o quadro de deficiência mental – esses indivíduos são conhecidos como portadores da pré-mutação. Durante a gametogênese, por uma razão ainda desconhecida, a pré-mutação pode expandir para a mutação completa somente na linhagem materna - quanto maior a pré-mutação, maior o risco de expansão. Apesar do risco de menopausa precoce em algumas portadoras da pré-mutação, a reprodução (que em geral ocorre antes dos 40 anos de idade) não é radicalmente prejudicada. Mulheres com a mutação completa do *FMRI* são menos comumente afetadas por sintomas da SXF, pois apresentam dois cromossomos X e inativação aleatória de um deles nas células, o que possibilita, quando o cromossomo X contendo o alelo normal estiver ativo, compensar o efeito do alelo mutado.

O exemplo mostrado na Figura 2 pode ser utilizado para explicar o que ocorre em diferentes casamentos envolvendo portadores de alterações do gene *FMRI*. Após a explicação com auxílio dessa figura, torna-se mais claro o entendimento do que ocorre na genealogia mostrada no início da atividade (Figuras 1 e 3).

A expansão do número de trincas de acordo com o tamanho da repetição e a origem parental explica os tópicos apontados na questão inicial da atividade. O professor deve então repetir a questão inicial da atividade para verificar a fixação do conceito: “Qual o padrão de herança dessa doença genética?”.

*R: Espera-se que os alunos respondam que se trata de uma doença com herança ligada ao cromossomo X, mas com padrão complexo de transmissão causado pela expansão de trinucleotídeos do tipo CGG. Quanto maior o número de trincas CGG no gene *FMRI*, maior a chance de expansão em tamanho, porém apenas nas transmissões maternas.*

Com o entendimento do padrão de herança, uma ampla discussão pode ter início. Um ponto que pode ser discutido é, por exemplo, como o tamanho da pré-mutação influencia no aparecimento de afetados na geração seguinte: a mulher II-2 apresenta uma pequena pré-mutação, que cresceu um pouco em tamanho em dois de seus filhos e não causou deficiência mental; apenas um de seus filhos (III-4) apresenta a mutação completa, que impede a síntese de proteína e causa deficiência mental. O caso de II-2 pode ser comparado, por exemplo, com a portadora IV-2 e seus descendentes. Já no caso do indivíduo (III-1), este recebeu uma pré-mutação de sua mãe e a transmitiu praticamente sem alterações de tamanho para suas filhas (IV-1 e IV-2); nelas, por uma razão ainda não plenamente conhecida, o alelo expandiu para a faixa da mutação. Ou-

tro exemplo de expansão gradual também pode ser observado e discutido na descendência de III-3.

A partir do entendimento desse padrão de herança complexo, o professor deve passar para a segunda etapa, que envolve a atividade interativa com caixas de fósforos para entender o funcionamento do gene *FMRI*.

Para início dessa etapa, propomos a construção de um modelo do gene *FMRI* utilizando uma caixa de sapatos, caixas e palitos de fósforos, fita adesiva e canudos plásticos (Figura 4 - Material Suplementar). Para a realização da “transcrição” (Figura 5 – Material Suplementar), o professor deve conectar as diferentes representações dos conjuntos de trincas CGG à caixa de sapatos, que representa o gene *FMRI*. Com auxílio de um pequeno bastão (uma agulha de tricô, por exemplo), deve-se empurrar o compartimento interno contendo os fósforos em direção ao interior da caixa de sapatos, representando ludicamente a síntese de mRNA (o bastão seria uma representação da RNA polimerase). Os fósforos representam o mRNA do gene *FMRI*, sendo que as “cabeças” dos fósforos representam o conjunto (CGG)_n. Na primeira situação - portadores de alelos normais - a quantidade de mRNA (fósforo pequenos) seria aquela considerada ideal. O professor é quem deve estabelecer essa quantidade. Na situação da pré-mutação, os fósforos devem ser maiores e em maior número que na situação anterior, para que os alunos identifiquem as diferenças. O professor deve lembrar aos alunos que as repetições CGG não fazem parte da proteína FMRP, portanto, no caso de representação da síntese protéica, as “cabeças” dos fósforos devem ser removidas. Sugerimos ao professor que corte a ponta dos fósforos com uma tesoura. No entanto, essa representação não é parte fundamental dessa atividade – tal informação pode ser transmitida oralmente pelo docente (*caso o professor insista em fixar esse conceito, os alunos devem colorir as hastes de madeira dos fósforos já com suas cabeças retiradas, indicando ludicamente a tradução*).

Por fim, no caso da mutação completa, a estrutura deve ser preparada de modo que nenhum fósforo esteja presente como transcrito, refletindo a situação que ocorre nas células dos pacientes (Figura 5 – Material Suplementar). A metilação das repetições (> 200 CGGs) no DNA impede que a transcrição e tradução ocorram, e a ausência da proteína FMRP leva ao quadro da síndrome do cromossomo X frágil.

O professor deve então retornar para as situações onde a transcrição ocorreu - alelos normais e pré-mutação - e questionar a classe da seguinte maneira: “Em uma situação hipotética, onde a queima completa do fósforo representaria o ótimo da tradução gênica, em qual situação seria esperado a síntese de FMRP de maneira mais eficiente (**não é necessário realizar a queima do fósforo**)?”.

R: Como os fósforos tem tamanhos distintos (normais: fósforos pequenos; pré-mutados: fósforos grandes), os alelos normais seriam aqueles que queimariam

mais rápido, representando a tradução mais eficiente do transcrito do gene FMRI.

No caso da pré-mutação, os alunos precisam fixar o conceito que haveria um aumento tanto na quantidade de mRNA (maior número de fósforos) quanto na qualidade (mRNAs maiores, caracterizados por fósforos grandes). Esse excesso de transcrito em pré-mutados seria consequência de um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) ainda não identificado: a diminuição na eficiência da síntese da FMRP, consequência do grande conjunto de trincas CGG presente no transcrito, levaria a uma retroalimentação para síntese de mais mRNA. Esse processo não afeta de maneira relevante a quantidade celular da proteína FMRP, mas o excesso de mRNA do gene *FMRI* em células neuronais ou ovarianas alteraria o funcionamento normal de diversos genes, levando, respectivamente, à morte celular e consequente neurodegeneração (mais comum em homens), ou problemas de fertilidade em mulheres (revisão em Hagerman e Hagerman, 2004). Já no caso de afetados pela SXF, como explicado acima, a presença de mais de 200 trincas impediria funcionamento do gene, com ausência de mRNA e proteína (Figura 5 – Material Suplementar).

Ao final da atividade, os participantes entenderão como quadros clínicos distintos estão associados a diferentes alterações no gene *FMRI*: o quadro clássico da síndrome do X frágil, presente nos portadores da mutação completa, causado pela ausência da proteína FMRP desde as fases iniciais da vida do indivíduo; e a menopausa precoce (POF) e a FXTAS que afetam alguns portadores da pré-mutação do *FMRI*. Esses dois últimos quadros associados com a pré-mutação muito provavelmente são decorrentes do acúmulo de mRNA durante a vida do indivíduo, acarretando em consequências clínicas somente na fase adulta dos portadores.

Bibliografia

- Capelli LP, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM - Structure and stability upon maternal transmission of common and intermediate FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) alleles in a sample of the Brazilian population. **Genet Mol Biol** 28:10-15, 2005.
- Capelli LP, Gonçalves MR, Kok F, Leite CC, Nitrini R, Barbosa ER, Vianna-Morgante AM - Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: Intrafamilial variability and the size of the FMR1 premutation CGG repeat **Mov Disord.** 22:866-70, 2007.
- Costa SS; Fonseca AM; Bagnoli VR; Vianna-Morgante, AM - The FMR1 premutation as a cause of premature ovarian failure in Brazilian women. **Genet Mol Biol** 29: 423-428, 2006.
- Gonçalves MRR, Capelli LP, Nitrini R, Barbosa ER, Porto CS, Lucato LT, Vianna-Morgante AM - Atypical clinical course of FXTAS: rapidly progressive dementia as the major symptom. **Neurology** 68: 1864-6, 2007.
- Hagerman PJ - The fragile X prevalence paradox. **J Med Genet** 45: 498-9. 2008.
- Hagerman PJ, Hagerman RJ - The fragile-X premutation: a maturing perspective. **Am J Hum Genet** 74:805-16. 2004
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ - Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. **Neurology** 57:127-30, 2001.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA - Fragile-X

syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. **Lancet Neurology** 6:45-55, 2007

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL - Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. **Cell** 66:817-22, 1991.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brondum-Nielsen K, Hjalgrim H,

Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Vaisanen ML, von Koskull H, Sherman SL - Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. **Am J Hum Genet** 72:454-64, 2003.

Vianna-Morgante AM - Twinning and premature ovarian failure in premutation fragile X carriers. **Am J Med Genet** 83:326, 1999.

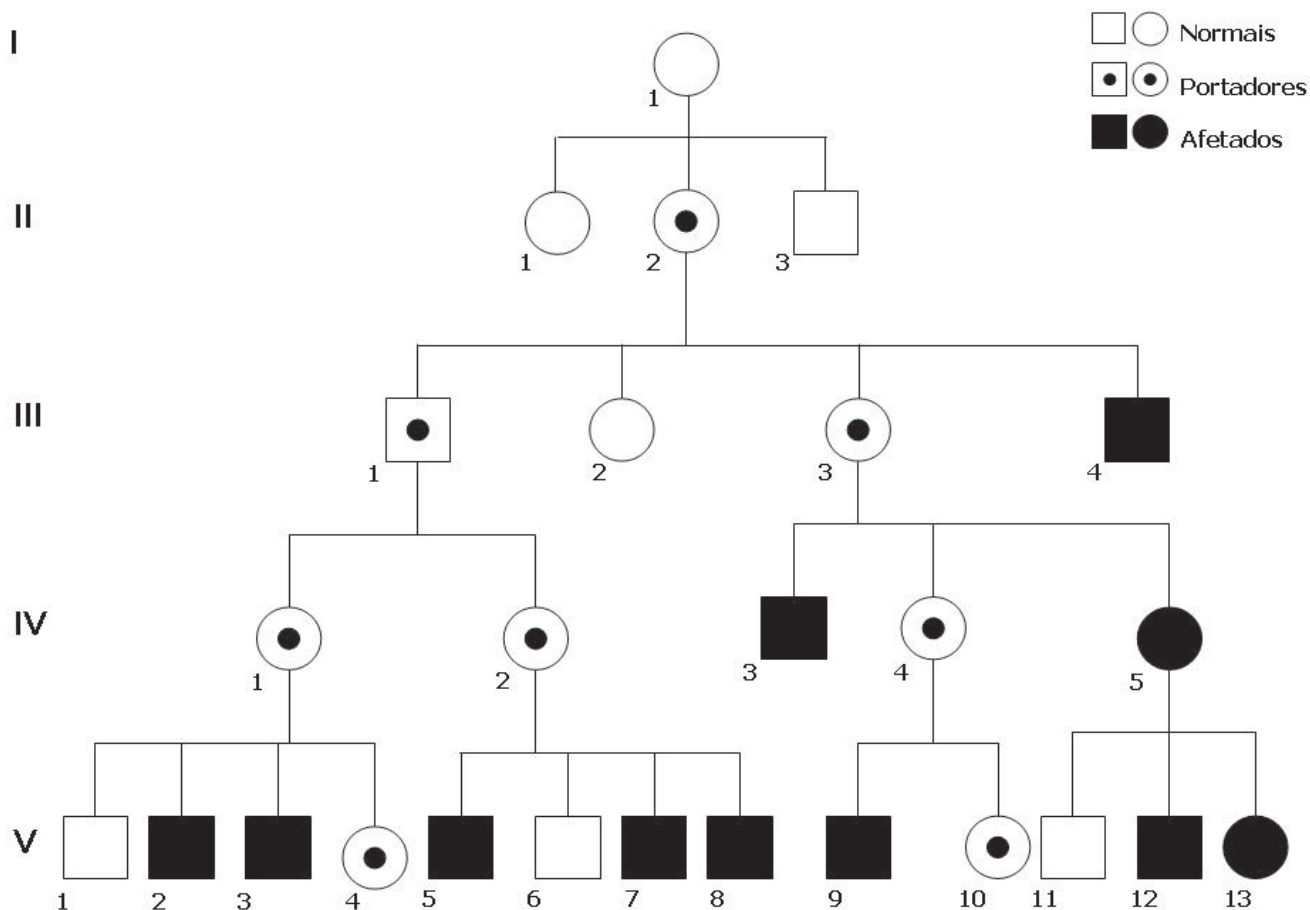


Figura 1. Genealogia proposta para entender uma síndrome de padrão de herança complexo; no caso, a síndrome do cromossomo X frágil. O sexo masculino é representado por quadrados e o sexo feminino, por círculos.

Síndrome do cromossomo X frágil

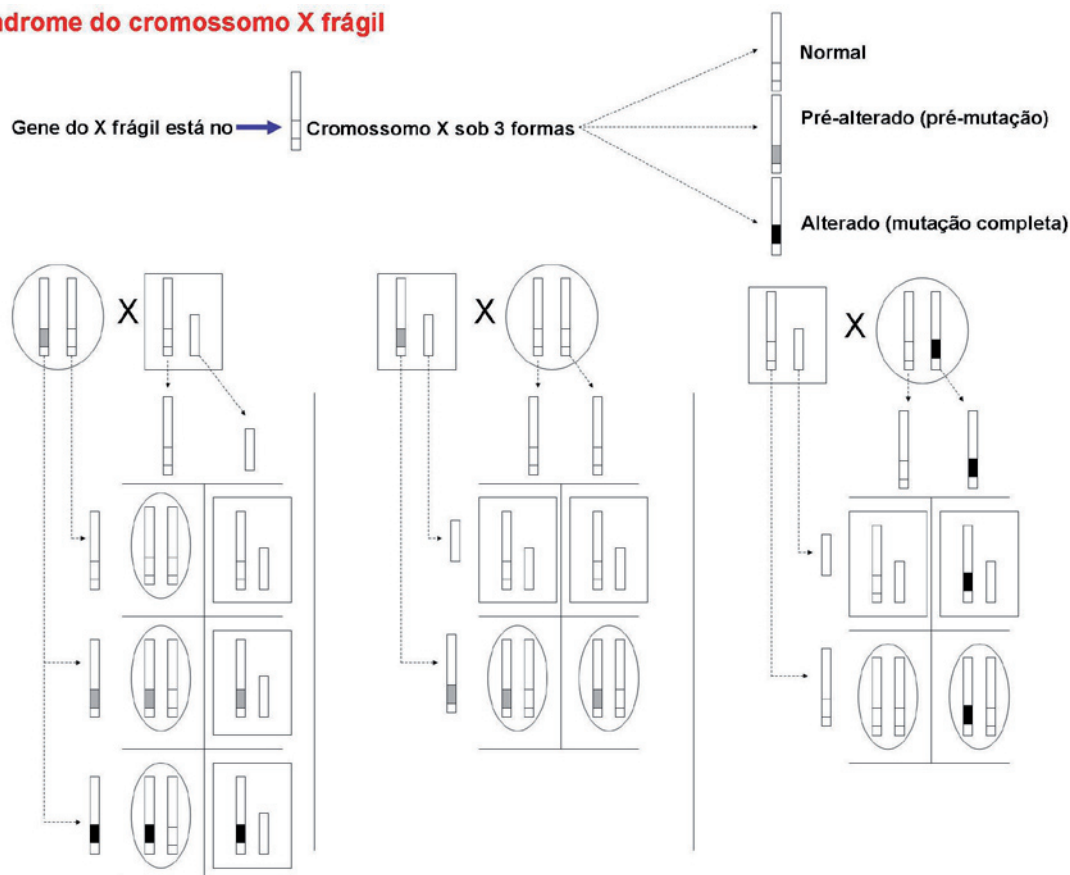


Figura 2. As possíveis transmissões envolvendo os alelos relacionados com a SXF; do lado esquerdo, o casamento entre um homem normal e uma portadora da pré-mutação, onde há possibilidade de meninas e meninos com qualquer uma das formas do gene FMR1; no meio está representado o casamento de um homem portador da pré-mutação com uma mulher normal – nesse caso, os meninos não herdam o alelo FMR1 alterado (pois recebem o Y de seus pais) e todas as meninas serão portadoras; do lado direito está representado o casamento entre uma portadora da mutação completa e um homem normal, quando há o maior risco de afetados (a inativação aleatória do X em mulheres possibilita que o cromossomo contendo o alelo normal encubra o efeito do alelo alterado nas mulheres portadoras da mutação completa). O sexo masculino é representado por quadrados e o sexo feminino, por círculos.

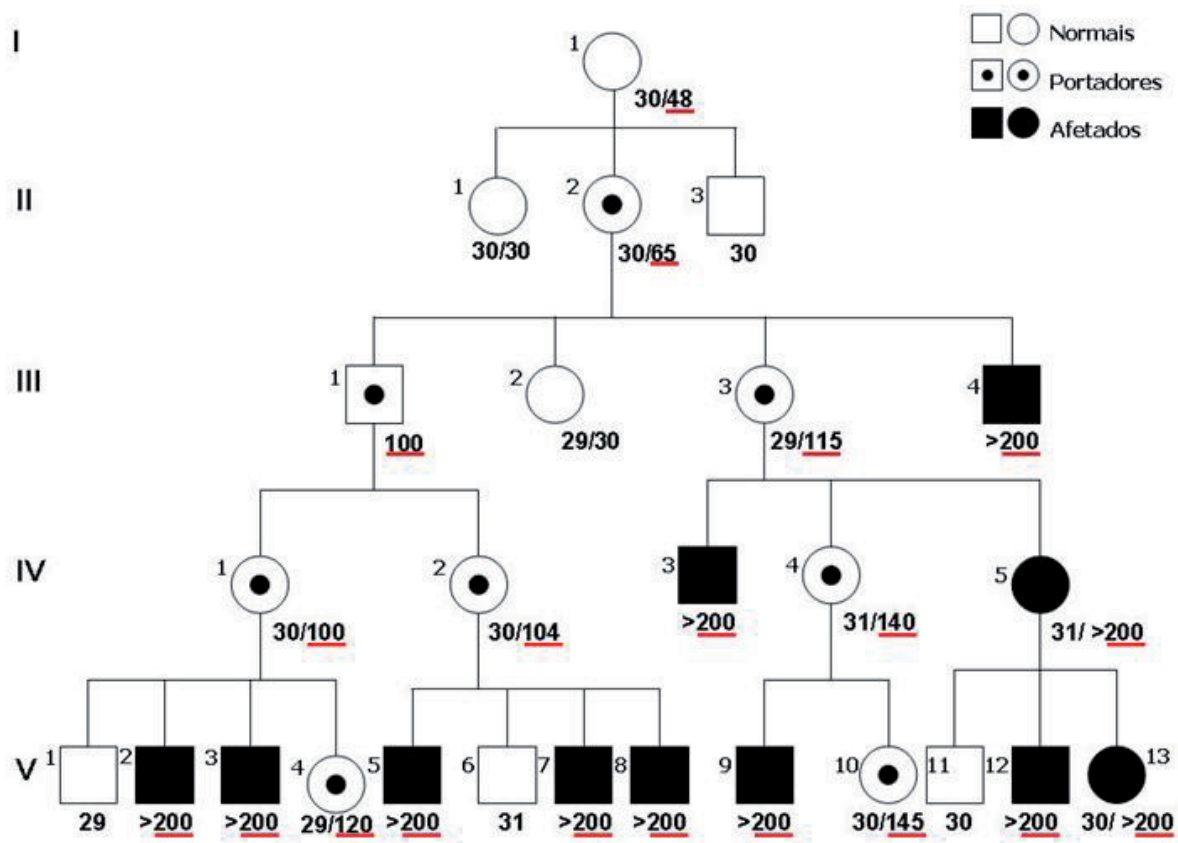


Figura 3. Genealogia proposta no início da atividade, agora exibindo os diferentes tamanhos hipotéticos de trincas (CGG)n. Os cônjuges dos indivíduos portadores de alterações do FMRI que transmitiram seus alelos não foram representados, pois são considerados normais quanto ao tamanho da trinca (CGG)n. Note o crescimento em tamanho do alelo presente em I-1 (48 trincas CGG) até atingir a faixa da mutação completa (>200 trincas CGG) após poucas gerações (alelos sublinhados em vermelho). O sexo masculino é representado por quadrados e o sexo feminino, por círculos.

Material Suplementar

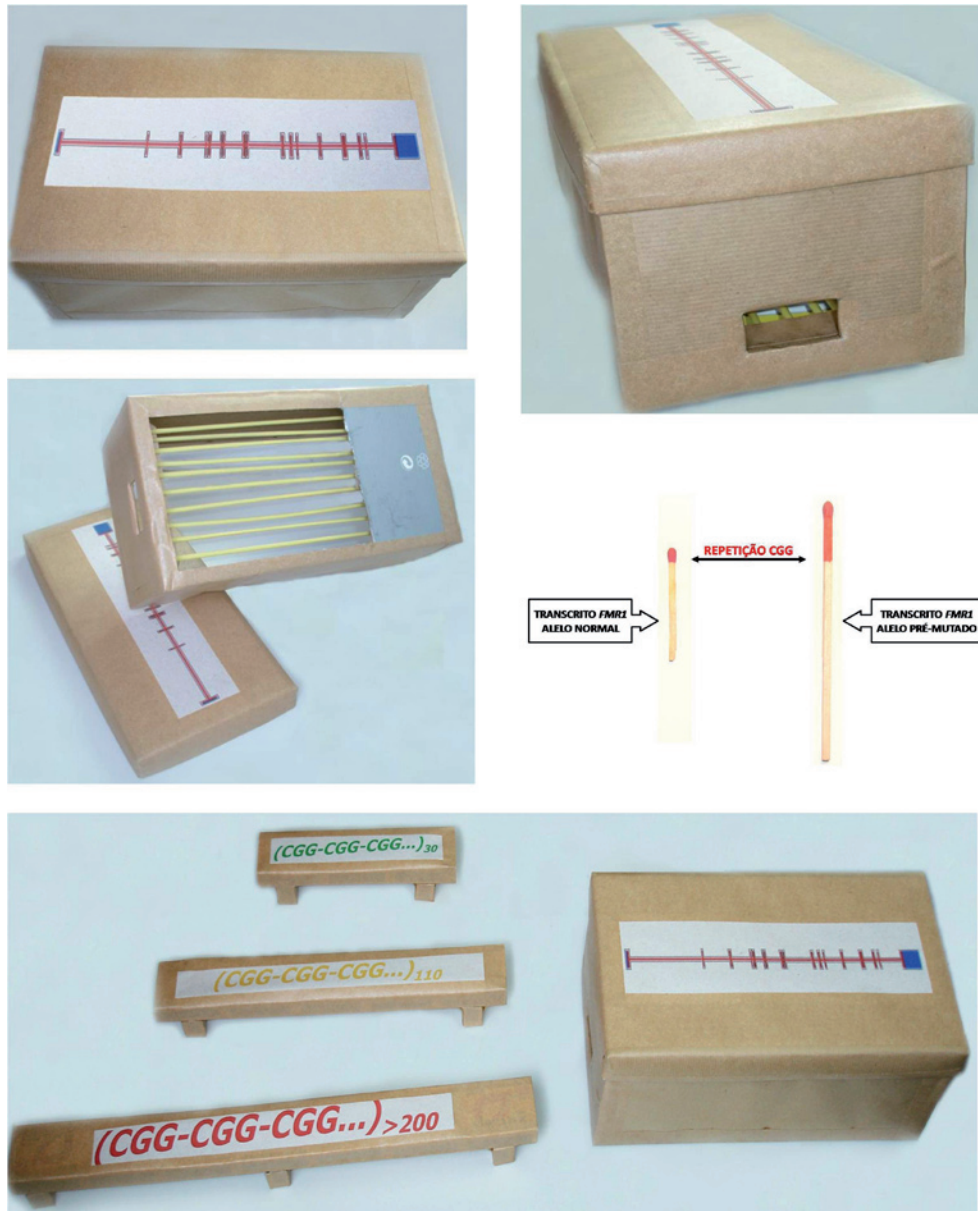


Figura 4. Etapas de construção do gene FMRI. Como fazer: em uma caixa de sapatos (imagem superior esquerda) deve ser feito um pequeno orifício em uma das laterais (imagem superior direita), que permita o encaixe de caixas de fósforo. [A figura colada na tampa da caixa representa os éxons (barras verticais) e íntrons (linhas horizontais entre os éxons); os quadrados azuis representam porções do gene que são transcritas, mas não são traduzidas]; o fundo da caixa de sapatos (imagem intermediária esquerda) deve ser removido e uma estrutura “gradeada” deve ser construída na parte interna da caixa utilizando canudos plásticos (essa estrutura é preparada de modo que apenas fósforos, que representam o transcrito do FMRI - figura intermediária direita -, passem pelo espaço entre os canudos). A região correspondente a porção 5’ do gene, que contém as repetições CGG de diferentes tamanhos, deve ser preparada com as partes externas de caixas de fósforos unidas por fita adesiva (de modo que sejam ocas e permitam o deslocamento da parte interna da caixa contendo os fósforos) e posteriormente encaixadas na caixa de sapatos, que corresponde aos íntrons e éxons do gene FMRI (imagem inferior). Sugerimos que os alelos da faixa normal tenham três caixas de fósforos unidas, os alelos pré-mutados, cinco e as mutações completas, sete. Os transcritos (fósforos) devem ser inseridos no interior dos conjuntos de caixas de modo que, quando empurrados em direção ao interior da caixa de sapatos, eles passem pelo espaço entre os canudos. Lembramos ainda que os fósforos que representam os alelos normais devem ser menores que aqueles que representam pré-mutações (mas, na realidade, os professores devem estar cientes de que apenas o conjunto de trincas CGG é diferente em tamanho, comparando alelos normais e pré-mutados; os fósforos com tamanhos distintos para essas duas categorias é apenas um recurso didático para facilitar o entendimento da atividade).

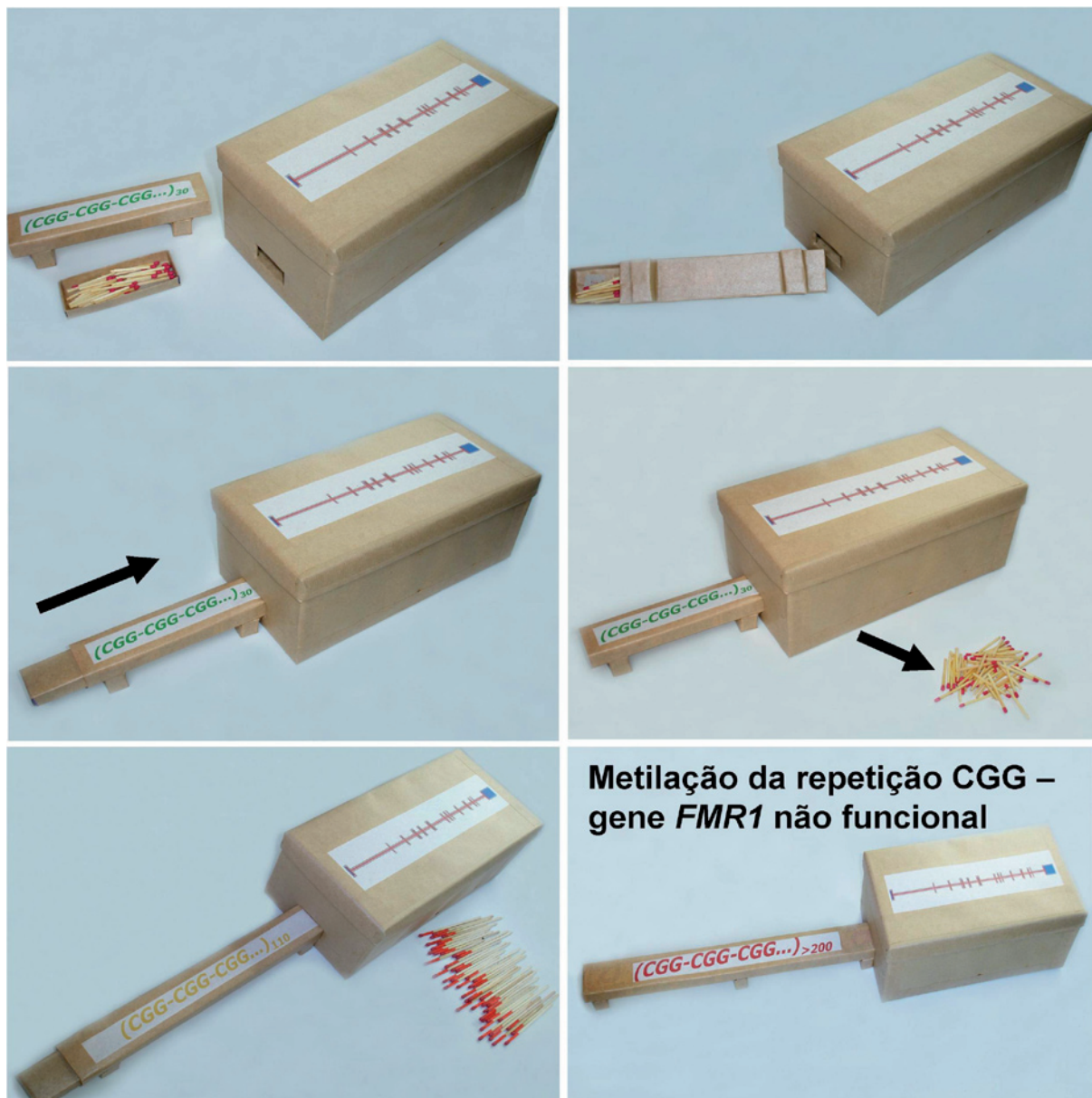


Figura 5. Representação do funcionamento do gene *FMR1*. Porção superior da figura – como encaixar de maneira correta os fósforos no conjunto que representa as repetições CGG. Imagens intermediárias: ao empurrar os fósforos em direção ao interior da caixa de sapatos a abertura presente no fundo da caixa permite a visualização do funcionamento gênico normal, com a transcrição do mRNA (representado pelos fósforos). De acordo com o número de trincas do indivíduo, uma determinada quantidade de fósforos é ou não “sintetizada”, o que tem implicação direta no funcionamento do gene (imagens inferiores). Lembramos ao professor que as representações da estrutura de trincas CGG, do gene *FMR1* e do transcrito estão fora de escala (apenas para exemplificar, o gene *FMR1* em humanos apresenta tamanho total de ~38.000 pares de base, sendo que destas, as trincas CGG em um indivíduo normal representam apenas ~100 pares de bases; o transcrito do gene contém ~4.800 nucleotídeos).