

# Análise molecular em algumas famílias com atraso mental ligado ao cromossoma X

M.C. Rosamond Pinto<sup>1,2</sup>, R. Magalhães Faria<sup>3</sup>, D.M. Pinto<sup>1</sup>, I. P. Maia<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Genética Humana. Faculdade de Medicina de Lisboa; <sup>2</sup>Departamento de Endocrinologia e Metabolismo. Divisão de Biologia Molecular. Universidade de Miami (USA); <sup>3</sup>Serviço de Endocrinologia. Hospital Curry Cabral, Lisboa; <sup>4</sup>Faculdade de Farmácia. Universidade Lusófona de Ciências e Tecnologia, Lisboa

## Correspondência:

Professora Doutora Maria Cristina Rosamond Pinto › Centro de Genética Humana  
E-mail: [genetica\\_medica@hotmail.com](mailto:genetica_medica@hotmail.com) › Telefone: 217581029

## RESUMO

O objectivo do trabalho foi o de fazer o diagnóstico directo de uma das mutações responsáveis pela síndrome Fra (X), confirmando ou infirmando o diagnóstico clínico ou citogenético nos proposita, de forma a encontrar os portadores tanto no sexo masculino como feminino nas respectivas famílias, fazendo, deste modo, a prevenção e a respectiva triagem através da avaliação genética. Com a realização de estudos moleculares, complementando a análise citogenética clássica, tanto nos proposita como nos seus familiares mais próximos, confirmou-se a presença de uma mutação completa do gene FMR1 em alguns dos indivíduos estudados. Os portadores Fra (X) demonstravam uma pré-mutação detectada com recurso às técnicas moleculares.

Os estudos desenvolvidos pelos Autores permitiram uma abordagem correcta dos doentes sob o ponto de vista psico-pedagógico. A identificação dos portadores de pré-mutações e dos indivíduos não portadores da mutação génica nos agregados familiares estudados possibilitou, igualmente, um aconselhamento genético preciso na sequência do diagnóstico molecular.

## PALAVRAS-CHAVE

Atraso mental; Síndrome do X-frágil; Análise de DNA; Pré-mutação; Metilação.

## SUMMARY

*The purpose of the present work was to carry on the direct diagnosis of one of the mutations responsible for the Fra(X) syndrome, thus confirming the clinical or cytogenetic diagnosis in the patients, also enabling the detection of the carriers both male and female in the studied families viewing the prevention and screening through genetic evaluation. With the completion of the molecular tests, furthermore to the classic cytogenetic analysis both in the affected persons and the close kinship available for studies, the Authors thus confirmed the presence of a complete mutation of the gene FMR1 in some of the patients. The Fra(X) carriers exhibited a pre-mutation with the resource of biotechnology methods.*

*The studies herein described allowed a correct approach to the clinical status of the patients from the psycho-pedagogical point of view. The identification of the carriers of pre-mutations and of the individuals non carriers of the genetic mutation in the family cohorts studied allowed a better approach regarding genetic counseling.*

## KEY-WORDS

*Mental retardation; Fragile-X Syndrome; DNA Analysis; Pre-mutation; Methylation.*

## INTRODUÇÃO

O atraso mental é uma das principais razões pela qual são referidos doentes aos serviços de pediatria, neurologia pediátrica, endocrinologia e clínicas de genéticas. Muitas vezes, não obstante a extensa investigação, não é possível um diagnóstico etiológico: desta forma as famílias permanecem sem um aconselhamento genético preciso ou com dúvidas relativamente às opções reprodutoras, nomeadamente no âmbito do diagnóstico pré-natal. Os defeitos ligados aos genes mapeados ao cromossoma X (*X-linked genes*) têm sido há muito considerados uma causa importante do atraso mental (AM), com base na observação de que o AM é significativamente mais prevalente nos indivíduos do sexo masculino do que nos indivíduos do sexo feminino<sup>1</sup>.

Estima-se que genes monogénicos para o atraso mental ligado ao cromossoma X (AMLX) sejam responsáveis por cerca de 10% do AM dos indivíduos do sexo masculino<sup>2</sup>.

O AMLX poderá ser classificado como síndrómico (AMLX-S), referindo-se a situações com anomalias neurológicas, físicas e bioquímicas, ou como não síndrómico (AMLX-NS)<sup>3</sup>. Existem mais de 30 genes associados ao AMLX-S com cerca de 20 genes identificados para o AMLX-NS<sup>4</sup>.

A patologia AMLX mais vulgar, designada de Síndrome de X-frágil (FRAXA) deve-se a uma mutação do gene FMR1<sup>5</sup>, com uma prevalência de 1 em 4000 indivíduos do sexo masculino e 1 em 6000 indivíduos do sexo feminino, nas mais variadas populações<sup>6</sup>.

O AMLX é uma doença hereditária ligada ao cromossoma X, causadora de incapacidades que variam entre diversos graus de atraso psicossomático até ao AM profundo<sup>7</sup>. Observam-se com frequência atrasos graves na linguagem, problemas de comportamento semelhantes ao autismo, macro-orquidismo, hiperactividade, atraso no desenvolvimento motor e sensorial, para além de um  *fácies* característico (macrocefalia com face alongada, fronte e queixo proeminentes, pavilhões auriculares com implantação baixa e saliente). A síndrome em questão é responsável pela maioria dos atrasos mentais hereditários com tradução no desenvolvimento psicomotor<sup>8</sup>. O defeito molecular tem a sua base em tripletos repetitivos: Citosina, Guanina,

Guanina (CGG) na região codificante do gene FMR1, mapeado à região terminal do braço longo (q) do cromossoma X<sup>9</sup>. Sob o ponto de vista mendeliano a síndrome segrega de forma dominante, com penetrância reduzida<sup>10</sup>.

Recentemente, identificaram-se mutações nos genes homeostáticos (ARX) tanto em situações síndrómicas como não síndrómicas<sup>11</sup>. A gama fenotípica do AMLX é bastante extensa.

As causas da definição precisa do tipo de AMLX são bastante heterogéneas, e, ainda que o AM seja diagnosticado em cerca de 50% dos casos, sabe-se que 50% dos restantes casos devem-se a factores ambientais e destes cerca de metade são atribuídos a factores genéticos.

Os factores ambientais poderão incluir a exposição a drogas, radiações, infecções ou doença materna (ex. exposição a rubéola, citomegalovírus).

Grande parte das pessoas afectadas não têm sido diagnosticadas, aplicando-se o mesmo às respectivas famílias em que poderá haver mais de um membro com AM de origem obscura. Caso as pessoas em questão conhecessem o diagnóstico e o carácter hereditário desta doença, uma triagem genética adequada e oportuna poderia contribuir para reduzir a ocorrência ou a recorrência da patologia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 3 agregados familiares. Um dos agregados incluía um propositus com características fenotípicas sugestivas de AMLX, hiperactividade, alterações na distensibilidade muscular, observando-se também num irmão um comportamento autista. Num outro agregado familiar para além do indivíduo do sexo masculino afectado com AM apresentando, igualmente, ginecomastia e obesidade, existia um outro ascendente (tio materno) também afectado; a mãe exprimia o local Fra (X) na qualidade de portadora.

O terceiro agregado familiar evidenciava 2 gémeos monozigóticos com AM, características dismórficas típicas do AMLX e que tinham sido diagnosticados com a síndrome autista.

O fenótipo dos proposita estudados era aparentemente normal à nascença, verificando-se todavia algum atraso no desenvolvimento motor; o atraso motor não era progressivo, sen-

do relativamente compatível com uma maior longevidade (caso do doente do grupo etário mais avançado, com 27 anos de idade; a idade dos restantes doentes oscilava entre os 9 e os 16). Das características pré-pubertárias destacavam-se: atraso no desenvolvimento psico-motor (especialmente na fala); temperamento anormal (hiperactividade, autismo, ataques súbitos); AM (IQ 30-50); anomalias crânio-faciais (*fácies* alongado, fronte proeminente, pavilhões auriculares grandes, proeminência do maxilar inferior). Como características pós-pubertárias a referir: macro-orquidismo; comportamento anormal (timidez, aversões, fixidez do olhar); alterações oftalmológicas (estrabismo); alterações ortopédicas (pé chato, hiperextensibilidade tendinosa ou muscular). Outras características revelavam alterações cardiovasculares e dermatoglifos anormais (resultados não apresentados).

Foram efectuados estudos citogenéticos clássicos nos proposita e ascendentes disponíveis. Recorreu-se à venopunção para a execução dos estudos citogenéticos em linfócitos periféricos para a análise do cariótipo. As culturas linfocíticas foram tratadas com FURD (5-Flúor-desoxiuridina) ou com 3HdTTP como já descrito previamente<sup>12</sup>.

Estes métodos permitem a distinção do cromossoma X com replicação precoce ou tardia. Os diapositivos foram inicialmente bandeados com tripsina, identificando-se os cromossomas X e as metafases X-frágil positivas. Após descoloração dos diapositivos com metanol, os que tinham sido tratados com FURD foram submetidos ao Hoechst 33258 seguindo-se o tratamento com UV e SSC<sup>13</sup>.

Os estudos moleculares efectuaram-se com ADN de alto peso molecular isolado de linfócitos do sangue periférico, recorrendo-se ao extractor ADN 340A da Applied Biosystems. O ADN purificado (2,5 µg) foi submetido a hidrólise completa com a endonuclease de restrição Hind III e dupla restrição enzimática Hind III/SacII e EcoRI + Eag. O uso de Hind III ou EcoRI fornece essencialmente resultados idênticos dado que os locais de restrição para estas enzimas são adjacentes tanto na extremidade 5' ou 3' da sonda OX1.9 (*New England Biolabs*). Seguiu-se o fraccionamento em geles de agarose 0,8% e a transferência para membranas de nylon de acordo com o método de Southern Blotting<sup>14</sup>. As sondas de ADN OX1.9 e STB12 (mapeadas ao braço longo (q)

do cromossoma X) foram radiomarcadas com P<sup>32</sup>-CTP pelo método dos *primers* oligomarcados (Amersham). Após hibridização de 12 horas, as referidas membranas foram sujeitas a lavagens adstringentes de SSC×0,1 a 60° C, seguindo-se a autoradiografia durante 72 horas a -70°C. Determinou-se, desta forma, não só a presença da mutação completa nos proposita com AM como ainda a dimensão da pré-mutação nos portadores face aos indivíduos controlo.

## RESULTADOS

A cariotipagem clássica efectuada tanto nos proposita como nos ascendentes implicou a análise de uma média de 60 a 100 placas metafásicas. Em todas as células encontravam-se presentes 46 cromossomas; em 5% das células analisadas observaram-se alterações no cromossoma X compatível com o X-frágil. As culturas tratadas com FURD exibiam o local frágil comum, Fra (X) (q.27.2) à excepção de um dos proposita (Figura 1). Os pequenos rearranjos cromossómicos (da ordem de 1-2 mbases de DNA) não são por vezes detectáveis mesmo com recurso à análise citogenética de elevado poder de resolução, sendo provável que rearranjos cromossómicos sub-microscópicos se encontrassem presentes nos portadores Fra (X) estudados.

FIGURA 1: Placa metafásica de um dos proposita estudados demonstrando o local Frágil-X (q27.2)



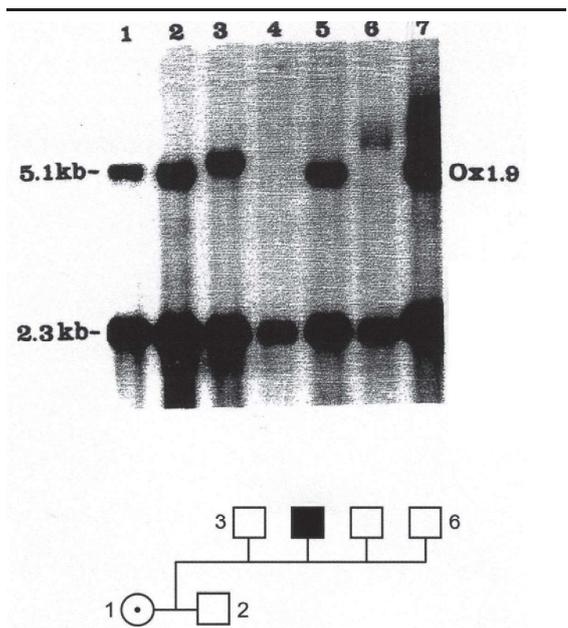
A Tabela I resume as sondas e as endonucleases de restrição usadas, bem como os respectivos pesos moleculares expressos em kilobases (Kb).

TABELA I – Enzimas utilizados e as dimensões dos fragmentos de DNA detectados pela análise Southern Blot

Endonucleases de restrição e dimensões dos fragmentos de restrição polimórfica			
Alelos	Sondas		
	OX1.9		STB12
	EcoRI	EcoRI + Eag HindIII/EcoRI+SacII	
	Indivíduos do sexo masculino		Indivíduos do sexo feminino
Normais	5,1-5,2	≈ 2,8	2,8 + 5,2
Pré-mutação	5,3-5,7	2,9-3,3	2,9-3,3
Per-mutação			5,3-5,7
Mutação	> 5,7	> 5,7	> 5,7

de múltiplas bandas ou um borrão electroforético indica heterogeneidade no DNA inserido/amplificado nas diferentes células, i.e., instabilidade somática da mutação. Em alguns indivíduos observou-se uma ligeira oscilação no tamanho da banda electroforética ou uma banda electroforética não habitual a 5Kb; estas bandas não são susceptíveis de ser distinguidas de outros aspectos técnicos inerentes à electroforese ou ao “Blotting”.

FIGURA 2 – Análise DNA do primeiro agregado familiar estudado com OX1.9 e controlos com hidrólise restritiva HindIII. O lóculo 1 refere-se ao progenitor materno com Fra (X) positivo (Xq2,7), apresentando o padrão electroforético típico de portadora da mutação; o lóculo 2 é inerente ao DNA do progenitor paterno normal; o DNA do lóculo 3 corresponde a um irmão não afectado; no lóculo 4, referente ao propositus, é nítida a ausência da banda 5,1kb; o lóculo 5 diz respeito a outro irmão não afectado do doente; o padrão electroforético no lóculo 6 é duvidoso relativamente ao estado de afectado – de evidenciar que esse irmão apresentava um comportamento autista (?); o lóculo 7 refere-se a um indivíduo do sexo feminino Fra (X) positivo usado como controlo. Os símbolos preenchidos correspondem a uma mutação completa; os símbolos pontuados ao meio correspondem a pré-mutações.



### PADRÕES DE HIBRIDIZAÇÃO

As Figuras 2, 3 e 4 demonstram os padrões de hibridização observados no controlo normal, nos indivíduos Fra (X) e portadores. Os padrões electroforéticos positivos para a mutação são designados subjacentes aos respectivos lóculos, representando quantidades variáveis do DNA amplificado detectado. A presença

FIGURA 3 – Hibridização DNA com sonda STB12 no segundo agregado familiar estudado com segregação da síndrome Fra (X). O lóculo 1 diz respeito ao DNA controlo hidrolizado por EcoRI; o lóculo 2 apresenta o padrão de DNA do tio materno do propositus afectado com AMLX (ausência das bandas 5,1- 5,2kb); o padrão electroforético do progenitor materno portador da pré-mutação é evidente no lóculo 3; o lóculo 4 refere-se ao padrão electroforético do DNA do propositus; o lóculo 5 evidencia o DNA de uma irmã não afectada do propositus.

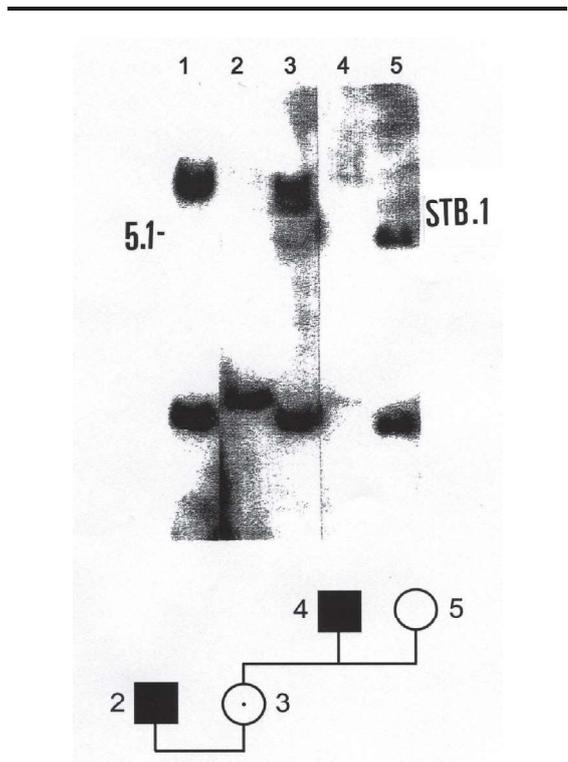
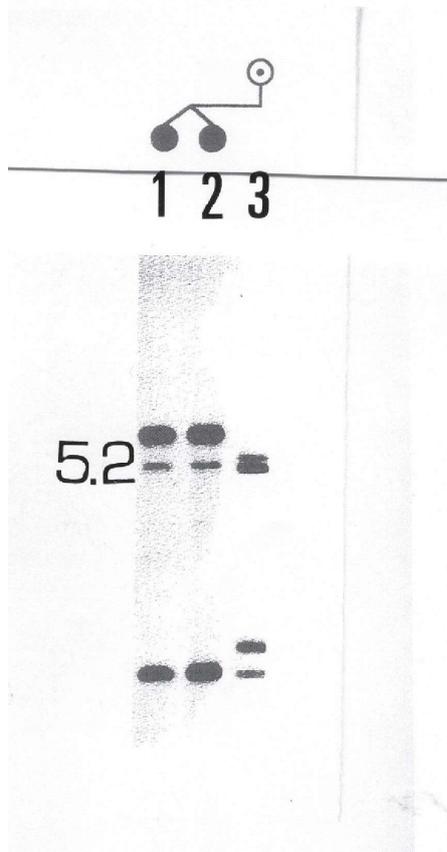


FIGURA 4 – Padrão de mutação DNA e metilação em dois gémeos monozigóticos (respectivamente lóculo 1 e 2) e no seu progenitor materno (lóculo 3) portador da respectiva pré-mutação (hidrólise por endonucleases de restrição EcoRI + Eag).



## DISCUSSÃO

Os casos de AMLX são na sua maioria não síndromicos. Todavia as possibilidades na classificação das famílias afectadas tem melhorado com o advento dos estudos moleculares, sendo natural que a proporção dos casos síndromicos diagnosticados aumente. Na realidade, o FRAXA inicialmente descrito como não síndromico é actualmente considerado o exemplo mais predominante do AMLX-S. As mutações nos diversos genes AMLX podem dar origem tanto às situações S como NS, indicando que não se dispõe ainda duma base molecular fiável para uma distinção específica entre genes AMLX-S e AMLX-NS. Existem cerca de 100 formas de AMLX-S descritas até à data. Têm sido identificados defeitos genéticos causativos em 66 destas formas AMLX-S, incluindo diversas situações descritas como geneticamente

alélicas<sup>15</sup>. A disponibilidade da sequência do genoma humano e o aumento do conhecimento relativamente à função génica tem contribuído para uma melhor clarificação do AMLX. A base molecular do AMLX-NS torna-se intrinsecamente mais difícil de se definir dado o seu elevado grau de heterogeneidade genética.

Várias estratégias têm levado à identificação de genes AMLX-NS. Por exemplo, o gene FMR2 foi descoberto pela sua associação com um local frágil (FRAXE) que é análogo à associação do FMR1 com um outro locus génico homólogo – FRAXA<sup>16,17</sup>.

Vários outros genes têm sido identificados por mapeamento e clonagem em doentes com AM demonstrando rearranjos citogenéticos equilibrados envolvendo o cromossoma X ou pela caracterização molecular de pequenas deleções cromossómicas-X. Estão descritas situações de mosaïcismo celular em cerca de 15 a 29% dos indivíduos com mutações FMR1. Esse mosaïcismo poderá ser devido a “mosaicismo dimensional repetitivo” em que estão presentes tanto as mutações completas como as pré-mutações ou “mosaicismo de metilação” em que as mutações completas têm vários graus de metilação<sup>18-20</sup>.

Dado que a maior parte dos testes laboratoriais clínicos define que as sequências repetitivas são de cerca de 2 a 3 tripletos, talvez seja de se considerarem resultados com 50 a 58 sequências repetitivas como potenciais pré-mutações. O risco da instabilidade dos alelos com 40 a 50 sequências repetitivas encontra-se minimizado quando da transmissão do progenitor para o descendente<sup>21</sup>.

As mutações encontradas no gene FMR1 resultam normalmente de uma perda de função que conduz a uma redução da expressão génica.

As expansões de ADN repetitivas de cerca de 43-200 tri-nucleótidos presentes, tanto em portadores masculinos como femininos, são em regra assintomáticos; as expansões dessa dimensão são designadas de pré-mutações. Uma outra alteração estrutural que modifica a expressão génica do FMR1 é a metilação quase sempre presente nos indivíduos afectados<sup>22,23</sup>. Um grande número de indivíduos com Frágil X apresentando a mutação completa, têm uma pré-mutação numa determinada percentagem de células (i. e., são mosaicos somáticos), em-

bora não esteja bem definido de que forma a presença deste mosaicismo nas células sanguíneas reflecte o nível de mosaicismo no Sistema Nervoso Central.

A base da variabilidade fenotípica nos indivíduos do sexo masculino afectados poderá residir na falência do mecanismo de inactivação normal do cromossoma X com o correspondente reflexo na dosagem de compensação de um gene ou vários genes mapeados ao longo do respectivo cromossoma<sup>24</sup>.

A caracterização molecular das síndromes AM é o primeiro estágio para a compreensão da lesão genética inerente. É possível categorizar as lesões genéticas em dois tipos: em primeiro lugar as mutações que inactivam ou alteram a função de um gene único; em segundo lugar uma dosagem génica anormal devido a um aumento do número de cópias génicas (à semelhança do que se passa numa trissomia) ou haploinsuficiência (ex. das deleções que reduzem o indivíduo a uma única cópia génica<sup>25</sup>. Em alguns *loci* génicos a dosagem génica correcta requer que um *locus* seja herdado do progenitor paterno sendo o outro *locus* derivado do progenitor materno. Os genes regulados desta forma traduzem uma impressão parental genómica. O melhor exemplo em genética humana deste fenómeno é a diferença entre as Síndromes Prader-Willi (PWS) e Angelman (AS). Ambas as Síndromes resultam de deleções da mesma região cromossomática: 15q11-q13. Caso a deleção ocorra no cromossoma paterno herdado, o fenótipo é PWS; se a deleção for de origem materna o fenótipo é AS.

## CONCLUSÕES

### DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO E TERAPIA

Num número significativo de casos de AM, o carácter síndrómico desta doença só é aparente na puberdade ou num grupo etário mais avançado. Deste modo, na prática clínica em que existe uma única criança ou um pequeno agregado familiar afectado, poderá não ser possível chegar a um diagnóstico clínico específico, e a maioria destes casos passaram por NS, contribuindo para um implemento da aparente heterogeneidade do AMLX-NS.

Tendo sido excluídas as alterações cromossomáticas deverá ser prática comum efectuar os testes Fra (X) em todos os indivíduos do sexo masculino não microcefálicos e com AM de causa desconhecida, ainda que as mutações FMR1 sejam só detectadas em 2-2,5%. Em agregados familiares extensos, a observação clínica poderá revelar características fenotípicas distintas e o mapeamento de ligação deverá focar a triagem das mutações no contexto dos genes AMLX conhecidos. Caso esta informação seja insuficiente, justificar-se-á a triagem das mutações ARX, que são as mais comuns no AMLX-NS. A mutação ARX que constitui um elemento comum do AMLX-S e do AMLX-NS, encontra-se mapeada a um pequeno intervalo de ligação definido a partir de um repositório de dados de ligação (*linkage*) de variadas famílias síndrómicas<sup>26</sup>. Cerca de 50% dos doentes com famílias AMLX poderão ter mutações em um dos múltiplos genes conotados ao AMLX-NS. No entanto, os métodos correntemente disponíveis são demasiado dispendiosos para justificar a triagem mutacional génica de todos os genes AMLX-NS. Esta situação encontra-se hoje modificada face à tecnologia do "DNA arrays", incluindo os chips de DNA<sup>27</sup>.

Os polimorfismos ligados ao cromossoma X que modulam o coeficiente de inteligência (IQ) de uma forma subtil poderão ser responsáveis pela variabilidade clínica observada nas famílias AMLX. Desta forma, a tipagem destes genes modificadores é susceptível de melhorar a precisão dos testes preditivos relativamente à gravidade e evolução da doença. Nos indivíduos do sexo masculino com IQ relativamente reduzido, mas ainda normal, tais mutações permitem antecipar uma labilidade mental "borderline". Assim, estas mutações podem representar importantes factores de risco para o AM na população em geral e a sua ocorrência colocará novos desafios ao aconselhamento genético<sup>28</sup>.

Dado a complexidade do cérebro humano e ocorrências precoces do AM, presume-se que a alteração no desenvolvimento nas terapias curativas para o AMLX monogénico serão reduzidas. Ainda que este seja o caso para as doenças síndrómicas inerentes aos defeitos no desenvolvimento cerebral, os doentes com AMLX-NS não demonstram alterações anatómicas tão grosseiras. A imagiologia confocal, e mais recentemente a imagiologia com fotões

duplos (PHOTON IMAGING) têm-se revelado meios complementares bastante úteis. O desenvolvimento destes exames complementares faz prever que nos doentes com defeitos genéticos responsáveis pelo AM, a intervenção terapêutica possa ser possível muito precocemente, rasgando novos horizontes para a farmacogenómica destas doenças.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lehrke RG. X-linked mental retardation and verbal disability. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1974; 10: 1-100.
2. Mandel JL, Chelly J. Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 689-693.
3. Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalsscheuer V, et al. Nonsyndromic mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* 2003; 19: 316-320.
4. Chelly J, Mandel JL. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 669-680.
5. Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics* 1998; 7: 109-113.
6. Biancalana V, Beldjord C, Tailandier A, et al. Five years of molecular diagnosis of Fragile X syndrome (1997-2001): a collaborative study reporting 95% of the activity in France. *Am J Med Genet* 2004; 129: 218-224.
7. Stromme P, Hagberg G. A etiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42: 76-86.
8. Stromme P. ARX and other single genes in X-linked mental retardation: revisiting a population-based study. *J Pediatric Neurology* 2005; 3: 121-122.
9. Eichler EE, Holden JJA, Popovich BW, Reiss AL, Snowk, Thibodeau SN. Length of uninterrupted CGG repeats determines stability in the FMR1 gene. *Nature Genet* 1994; 8: 88-94.
10. Imbert G, Feng Y, Nelson DL, Warren ST, Mandel. FMR1 and mutations in the fragile X syndrome: Molecular biology; biochemistry and genetics. En: Wells R Warren ST, Sarmiento M ed. *Genetic instabilities and hereditary neurological diseases*. New York: Academic Press 1998; 27-54.
11. Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G. ARX, a novel Proclass-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 981-991.
12. Tuckerman E, Webb T. The inactivation of the fragile X chromosome in female carriers of the Martin Bell syndrome as studied by two different methods. *Clin Genet* 1989; 35: 25-30.
13. Scempp W, Meer B. Cytologic evidence for three human X-chromosomal segments escaping inactivation. *Hum Genet* 1983; 63: 171-174.
14. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-517.
15. Hilger Ropers H, Hamel BJ. X-linked mental retardation. *Nature* 2005; 6: 46-57.
16. Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nature Genet* 1996; 13: 105-108.
17. Gu Y, Shen Y, Gibbs RA, Nelson DL. Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nature Genet* 1996; 13: 109-113.
18. Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, Carpenter I, Staley LW, O'Connor RA, Seydel C, Mazzocco MM, Snow K, Thibodeau SN. High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR1 mutation associated with protein expression. *Am J Med* 1994; 51: 298-308.
19. Rousseau F, Robb LJ, Rouillard P, Der Kaloustian VM. No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 927-930.
20. Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, Hoogeveen AT, Oosterwijk JC, Oostra BA. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2103-2108.
21. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 454-464.
22. Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. Fragile X genotype characterised by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252: 1179-1181.
23. Jacquemont S, Hageman RJ, Leehey MA, et al. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA* 2004; 291: 460-469.

24. Sherman SL, Jacobs POA, Morton NE, et al. Further segregation analysis of fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 69: 3289-3299.
25. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. 2000; 97: 189-194.
26. Stromme P. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nature Genet* 2002; 30: 441-445.
27. Rodrigues-Revena L, Montserrat M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C. Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genet Med* 2007; 9(9): 600-606.
28. Mandel JL, Chelly J. Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (*Aristaless X*) mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 689-693.

**Agradecimentos:** Os Autores agradecem a Ana Isabel Gonçalves Pedro a preparação cuidadosa do Manuscrito.