

# ALGUNS ASPECTOS GENÉTICOS DO ATRASO MENTAL LIGADO AO CROMOSSOMA X

CRISTINA PINTO, CARLOS MARQUES

Cadeira de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa.

## RESUMO

O Atraso Mental ligado ao Cromossoma 'X' constitui uma patologia importante no âmbito da Genética. Os autores revêem a evolução histórica desta entidade, com uma ênfase especial para as alterações patológicas actualmente emergentes da categoria *Atraso Mental Não-Específico*. Referem-se certos conceitos básicos para a compreensão das *Localizações Génicas*, explicitando aquelas que são mais recentes para uma melhor definição clínica dos síndromes do Atraso Mental ligado ao Cromossoma 'X'. Segue-se uma descrição clínica do Atraso Mental ligado ao Cromossoma 'X' bem como das deleções ou duplicações citogenéticas deste mesmo cromossoma. Revêem-se alguns conceitos da Tecnologia do ADN recombinante com referência à análise indirecta de doenças genéticas usando polimorfismos de restrição detectados por sondas génicas. Descrimina-se a localização génica de alguns locus pseudoautosómicos e as respectivas localizações nos cromossomas X e Y. Refere-se a utilização da informática para a descrição, definição e diagnóstico dos síndromes do Atraso Mental ligado ao Cromossoma 'X', incluindo a discussão dos dados computados e os estudos moleculares mais recentes. Conclui-se tecendo alguns considerandos acerca da metodologia adoptada num projecto de colaboração com os Estados Unidos da América visando a interacção do diagnóstico clínico e dos estudos de ligação para esclarecimento dos síndromes do Atraso Mental ligado ao Cromossoma 'X'.

## SUMMARY

### Genetics Aspects of X-Linked Mental Retardation

X-Linked Mental Retardation constitutes an important pathologic entity in genetics. The overall significance, history and background of the concept of X-Linked mental retardation is reviewed with a special mention to the cases referenced under the term *non-specific X-Linked mental retardation*. The concept of lod-score has brought some improvement in the clinical delineation of the X-Linked mental retardation syndromes with some recent reports of suggestive linkage studies. The fragile-X syndrome is discussed with a special focus on reports of X-linked mental retardation with X chromosomal deletions or duplications. Linkage and molecular studies are reported viewing genetic approaches based on restriction fragment length polymorphisms. DNA probes spanning the length of the X and Y chromosomes which may prove critical to the development of diagnostic tests are referred. Computer assistance for a compilation of clinical findings in the X-linked mental retardation syndromes is specified as a diagnostic review and assistance program to check on the various entities. A joint collaborative investigation is reported to ascertain families with X-linked mental retardation in order to develop direct and linkage studies for the diagnosis of these disorders.

## INTRODUÇÃO

O Atraso Mental (AM) tem constituído uma das mais pesadas sobrecargas debilitando as sociedades de todos os tempos.

Dada a complexidade do problema não nos devemos surpreender com as mais variadas condições genéticas e/ou ambientais susceptíveis de produzir o AM ou a ele associadas.

A prevalência do AM na população em geral é de aproximadamente 3%. Cerca de 90% destes indivíduos sofrem de um atraso mental moderado enquanto os restantes poderão apresentar-se gravemente afectados. O AM evidencia uma distribuição desigual relativamente ao sexo dos indivíduos afectados<sup>1</sup>. As estatísticas apontam para uma evidência no sexo masculino superior em 25 a 30% à que se verifica no sexo feminino. Na maior parte destes casos parece tratar-se de patologia ligada ao cromossoma X. Deste modo, cerca de 17 em mil indivíduos do sexo masculino serão afectados por algum tipo de Atraso Mental e cerca de 5% destes doentes terão uma patologia ligada ao cromossoma X.

Conforme se verá adiante um grande número de condições poderá conduzir ao AM ligado ao cromossoma X, embora o

síndrome do X frágil pareça constituir a causa mais frequente. Vários estudos<sup>2</sup> sugerem este síndrome como responsável por cerca de 5% de todos os AM ligados ao cromossoma X. Nem sempre é fácil estimar a prevalência deste síndrome. Estudos relativamente recentes<sup>3</sup> indicam que um em cerca de 1100 indivíduos do sexo masculino e um em 700 indivíduos do sexo feminino são portadores do gene para o síndrome do X frágil. Trata-se na realidade de dados estatísticos impressionantes, tornando-se progressivamente evidente que o síndrome do X frágil constitui uma das principais alterações cromossómicas conduzindo ao Atraso Mental.

## EVOLUÇÃO HISTÓRICA

O conceito do AMLC'X' (Atraso Mental ligado ao Cromossoma 'X') tem evoluído progressivamente ao longo dos últimos 30 anos. Foi Penrose<sup>4</sup> quem sugeriu em 1938 que a ocorrência do AM com maior frequência nos indivíduos do sexo masculino em comparação com os do sexo feminino, não se devia a um grupo de genes ligados ao cromossoma X, mas antes a factores sociais. Todavia em 1943 e 1944, são

referidas por Martin e Bell<sup>5</sup> famílias com AMLC'X'. Nos anos 60, Lehrke<sup>6</sup> divulgou a ideia do significado dos genes ligados ao cromossoma X no Atraso Mental. Este conceito foi mais tarde revisto e confirmado por Herbst<sup>7</sup> e por outros investigadores que sugeriram que na globalidade cerca de 17 ou 19 patologias específicas estariam na base da diferença observada em ambos os sexos.

Hoje parece ser do consenso geral que cerca de um terço do AM grave nos indivíduos do sexo masculino poderá ser explicável por genes ligados ao cromossoma X. As dificuldades na compreensão do AMLC'X' deveram-se não só às características clínicas aparentemente inespecíficas e à ausência de diagnósticos laboratoriais para estas entidades, mas também à ocorrência, em muitas famílias, de mulheres afectadas em menor grau. Este facto contribuiu para obscurecer o antecipado padrão de um heredograma de hereditariade recessiva pura ligada ao cromossoma X.

As poucas publicações nesta área eram geralmente referenciadas sob a designação *Atraso Mental Não-Específico ligado ao Cromossoma X*. Estas publicações foram divulgadas por Martin e Bell em 1943, já citados, e Renpenning et al<sup>8</sup>, não tendo nelas sido documentadas características clínicas específicas nas referidas famílias.

Em 1969, Lubs<sup>9</sup> referiu um marcador no cromossoma X, actualmente conhecido como X frágil, numa família com Atraso Mental em quatro indivíduos do sexo masculino. Outros casos clínicos foram posteriormente referidos por Giraud et al. em 1976<sup>10</sup> e por Harvey et al em 1977<sup>11</sup>. Simultaneamente, Sutherland em 1977<sup>12</sup>, demonstrava a necessidade de uma baixa concentração de ácido fólico e de timidina no meio de cultura para uma detecção consistente do X Frágil, indicando que esta situação tinha uma elevada incidência. Estavam lançadas as bases para a planificação e repetição dos estudos sobre o atraso mental ligado ao cromossoma X. A família originalmente referida por Martin e Bell<sup>5</sup>, voltou a ser estudada por Richards et al. em 1981<sup>13</sup>, os quais demonstraram nela a existência do X Frágil. Fox et al. retomaram em 1980<sup>14</sup> o estudo de nove membros da família referida por Renpenning et al. em 1962<sup>8</sup>. Esta família não evidenciava a fragilidade do cromossoma X mas demonstrava um padrão de sinais clínicos moderadamente consistentes, incluindo valores médios baixos para a altura, peso, circunferência cefálica e volume testicular. A maior parte dos estudos efectuados posteriormente demonstraram que somente 30 a 40% das famílias não seleccionadas com Atraso Mental *Não-Específico* evidenciavam a fragilidade do cromossoma X. Um grande número de síndromes começam agora a emergir desta categoria *Não-Específico*, não tendo sido descritas anomalias bioquímicas. Muito provavelmente, alguns dos quadros patológicos do AMLC'X', aparentemente semelhantes, serão delineados como entidades distintas pela combinação de estudos clínicos, de ligação e localização génica. Outros evidenciarão uma sobreposição de descrições de um síndrome descrito por vários autores sob designações diferentes.

Por exemplo, os síndromes descritos por Atkin et al.<sup>15</sup> e por Clark e Baraitser<sup>16</sup> encontram-se discriminados como entidades separadas, ainda que as suas características faciais sejam bastante semelhantes. O hipertelorismo e a baixa estatura na família Atkin (comparada com o *hipotelorismo* e a estatura normal na família Clark-Baraitser) podem atribuir-se a características familiares (dado que outros membros familiares evidenciavam características semelhantes), não se encontrando directamente relacionadas com o gene do AMLC'X'.

Cerca de 70 das 310 possíveis alterações ligadas ao cromossoma X podem incluir o AM como única manifestação<sup>17</sup>. Ainda que várias destas venham a ser incluídas nos estudos que os Autores, que subscrevem o presente artigo,

estão a realizar em colaboração com os E.U.A., uma ênfase especial irá para as alterações patológicas que estão a emergir da categoria *AM Não-Específico*.

### 3. Localizações Génicas

Para uma melhor compreensão das localizações génicas, torna-se necessário referir certos conceitos básicos.

#### a) Conceito de *Lod-Score* (Logaritmo da Probabilidade)

É fundamental que este conceito seja aqui referido na medida em que a maior parte da literatura médica valoriza a importância dos diversos marcadores genéticos a partir do *logaritmo da probabilidade*. Em genética entende-se por **Associação**, a ocorrência conjunta de duas características com uma probabilidade maior do que a frequência, atribuível ao acaso, que seria de esperar num determinado grupo populacional.

É claro que para dois alelos, ou seja, genes alternativos que poderão ocupar um determinado locus, a probabilidade de **Associação** será o resultado dos vários graus de ligação possíveis, — sendo *alelos ligados aqueles que se encontram no mesmo cromossoma*, a uma maior ou menor distância um do outro. Se estiverem mais distanciados serão menos ligados e vice-versa. Esta **Associação** a que nos referimos poderá ser comparada à *probabilidade de associação* no caso dos alelos não estarem em *Ligação* e a associação ocorrer ao acaso através do fenómeno da *Recombinação*.

O logaritmo da relação destas probabilidades é designado em nomenclatura anglo-saxónica de *Lod-score* e vai fornecer evidência a favor ou contra a **ligação de dois genes** ou marcadores génicos.

O logaritmo das probabilidades constitui assim uma relação da probabilidade de dois locos estarem ligados versus não estarem ligados. Estas probabilidades são derivadas de **Tabelas** estatísticas divulgadas na maior parte dos livros da Especialidade. Em Genética, por convenção, probabilidades superiores a 1000 por 1 são consideradas prova de *Ligação*, sendo obtidas por combinação de dados a partir de vários heredogramas. Para este efeito, vão-se adicionando os diversos logaritmos de probabilidade até resultar o valor "3".

#### b) Ligações Génicas Recentes

Ainda que nos últimos anos tenha havido uma melhoria na definição clínica dos síndromes do AMLC'X', poucos foram os estudos de ligação referidos até 1988<sup>18</sup>.

Embora um número sugestivo de ligações génicas tenha sido referido (ver Quadro 1) só um estudo é que referiu um logaritmo de probabilidade superior a 3. É importante chamar a atenção para o facto de que todos estes estudos foram efectuados numa única família numerosa (dispondo de muitos membros familiares) e de que estes logaritmos de probabilidade sugestivos (com um valor numérico de cerca de 2) foram geralmente obtidos de estudos incidindo em famílias numerosas oriundas da Europa ou Austrália/Nova Zelândia em resultado de programas a longo prazo estabelecidos para o estudo do AMLC'X'.

Famílias numerosas, seleccionadas ao fim de muitos anos de estudos e referidos a Centros de Genética credenciados contribuíram para os progressos observados nesta área.

É importante chamar a atenção para o facto de que somente famílias englobando um número elevado de indivíduos é que poderão fornecer dados estatísticos significativos, ou seja, as famílias em que se venha a evidenciar um *Lod-Score* superior a 3 (valor normalmente aceite como válido para uma ligação genética significativa, como já foi referido).

QUADRO 1 — Possíveis localizações do AMLC“X” referidas em 1988. (Adoptado de Am J Med Genet 30, Maio/Junho 1988)

Autor	Sonda(s) mais informativas	Banda/comentário	LOD score máximo	Descrição clínica
Partington et. al	DXS41	XpterXp21	2.11 (0=0)	Distonia
Partington DXS43 et. al	(DXS28) (DXS84)	Xp22.222.1 (Distal ao locus Duchenne)	2.71 (0=.001)	Síndrome Coffin-Lowry (McK. 30360)
Manauer et. al	DXS28 (DXS41)	Xp22.122.2 (entre DXS43 e DXS41)	2.00 (0=0.05) (valor multipontual = 3.341)	Síndrome Coffin-Lowry (McK. 30360)
Arveiler et al. — família 1	DXS85	Xp22.222.3	2.62	Estatura baixa; macrocefalia; palato alto e arqueado; facies quadrado; testículos grandes.
— família 2	DXS164 (também Duchenne)	Xp21.2	1.59 (0=0)	Ausência de dados concretos. Referência à hipoplasia do braço esquerdo; criptorquidismo; facies comprido; mandíbula saliente; pavilhões auriculares grandes.
— família 3	DXS159	Xq12-13	2.53 (0=0)	Normal
Suthers et al.	DXS14	Xp11.3q21.1	2.08 (0=0)	Normal
Sutherland	DXYS1	Xq1321.1 (próx. do centrómero)	2.10 (0=0)	(Síndrome novo) Baixo peso ao nascimento; microbraquicefalia; diplegia espástica; testículos pequenos; anomalias anais; baixa estatura; aparência anormal.
Wieacker*	DXYS1	Xq13.21.1	3.22 (0=0)	Contracturas congénitas e atrofia muscular progressiva.

\* Am J Med Genet 1987; 28: 245

Neste aspecto Portugal detém uma posição privilegiada relativamente aos E.U.A., dada a existência de famílias numerosas particularmente fora da área da grande Lisboa.

### Descrições do Atraso Mental Ligado ao Cromossoma X com Deleções ou Duplicações do Cromossoma X

Têm sido referidas ultimamente deleções e duplicações do cromossoma X segregando com um tipo de transmissão genética ligado ao cromossoma X.

Estas famílias têm-se revestido de especial importância tanto para a localização de certa patologia como para a definição de novos síndromes que imitam a transmissão mendeliana característica de genes únicos.

Neste âmbito, é particularmente notável a recente definição por Thode e col.<sup>19</sup> de novo síndrome com atraso mental, baixa estatura e duplicação em *Tandem* Xq. Têm sido já referidas cinco famílias com estas características.

Além das descrições atribuídas a Franke et al.<sup>20</sup> que utilizaram uma pequena deleção cromossômica para a localização do gene da Distrofia Duchenne, tentando clarificar a existência de Atraso Mental em indivíduos com patologia, Curry et al.<sup>21</sup> referiram uma família com uma pequena deleção e características clínicas de vários síndromes (condrodysplasia puntata e ictiose). Na descrição destes autores foi igualmente documentada a redução da actividade **esteróide sulfatase** associada à ictiose ligada ao cromossoma X, bem como a perda do locus Xq. Nesta família, o atraso mental encontrava-se associado com a *condrodysplasia punctata*, mas não com a condrodysplasia ligada ao cromossoma X devido a uma mutação genética única. Nurmi et al.<sup>22</sup> referiram uma deleção Xp11-p22 numa mulher com atraso mental bem como na sua mãe e irmã, todas elas evidenciando

uma deleção do segmento Xp11-p22. A doente em questão apresentava uma imunodeficiência tipo célula T clinicamente significativa, com níveis baixos de imunoglobulinas na mãe.

Wyss et al.<sup>23</sup> e Trunca et al.<sup>24</sup> procederam a uma revisão das deleções referidas em estudos anteriores de anomalias estruturais do cromossoma X. A maior parte das deleções revistas nestas publicações foram aferidas na base de anomalias reprodutoras ou características modernas do fenotipo Turner, não sendo aqui discutidas por estarem fora do âmbito desta exposição.

É no entanto de evidenciar que estes estudos chamavam a atenção para a necessidade de se proceder a estudos cromossómicos de elevado poder de resolução na avaliação de famílias com AMLC“X”. Esta metodologia permite não só uma melhor definição de síndromes como também a obtenção de localizações génicas significativas.

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A descrição clínica das várias entidades com Atraso Mental ligado ao Cromossoma X seria exaustiva. É no entanto relevante referir certas características do síndrome de Martin Bell, vulgarmente designado como o *X frágil*.

Os indivíduos do sexo masculino com o síndrome do X Frágil exibem uma grande variabilidade na função intelectual. O grau de deficiência cognitiva pode variar entre dificuldades na aprendizagem ao atraso mental profundo, com a maior parte dos doentes apresentando um atraso mental moderado. A literatura descreve-nos indivíduos pacíficos e bem humorados, podendo igualmente deparar-se-nos um comportamento agressivo. As características faciais típicas incluem uma frente alta e proeminente, prognatismo e orelhas salientes. O macro-orquidismo, uma das características

marcantes do síndrome do X Frágil, é detectado em aproximadamente 80% dos doentes, sendo mais evidente durante e após a puberdade.

Outras características comuns a este síndrome incluem hiperactividade; automutilação; autismo; hiperextensibilidade articular e prolapso de válvula mitral<sup>2</sup>.

As mulheres portadoras do síndrome do X Frágil não têm sido estudadas tão exaustivamente como os indivíduos afectados. Em geral os indivíduos do sexo feminino apresentam um intelecto normal, podendo também evidenciar uma certa diminuição da capacidade intelectual e em geral carecem dos sinais físicos que caracterizam o indivíduo afectado. Existem no entanto relatórios esporádicos de mulheres afectadas com pavilhões auriculares compridos e salientes, bossa frontal e maxilares proeminentes. Ainda que a maior parte das mulheres portadoras do gene para o síndrome do X Frágil sejam consideradas normais, muitas evidenciam dificuldades na aprendizagem que até muito recentemente passavam despercebidas<sup>25,26</sup>.

Tem sido demonstrado que o grau em que a mulher se encontra clinicamente afectada se relaciona até certo ponto com a percentagem dos linfócitos que exprimem o local frágil no cromossoma X: quanto maior for essa percentagem, mais grave serão as implicações clínicas<sup>27</sup>.

## ASPECTOS CITOGENÉTICOS

De acordo com o que se referiu acima, um marcador identificado o cromossoma X foi inicialmente descrito por Lubs em 1969. Este marcador, um local frágil no braço longo do cromossoma X (q 27.3) é visualizado com uma lacuna ou ponto de clivagem na estrutura cromatínica que não se evidencia pela coloração. Conforme foi demonstrado inicialmente por Sutherland<sup>12</sup>, um controlo crítico e das condições das culturas celulares é essencial para evidenciar a expressão do local frágil.

As experiências iniciais de Sutherland demonstraram que a fragilidade era dependente da concentração de ácido fólico no meio de cultura, estando as concentrações baixas relacionadas com um aumento na expressão da fragilidade. Na prática corrente utilizam-se meios especiais e condições — incluindo tempos de cultura prolongados, pH elevado, concentrações baixas de ácido fólico e a incorporação de fluorodesoxiuridina — para evidenciar a expressão do marcador.

Ainda que se utilizem condições óptimas, a fragilidade não é expressa em todas as células derivadas dos indivíduos afectados. Na realidade, a frequência da expressão poderá ser muito baixa. Nos indivíduos do sexo masculino com o síndrome do X Frágil, examinam-se habitualmente 100 metafases de linfócitos em cultura, ocorrendo a fragilidade tipicamente em 10 a 40% dos indivíduos afectados. Em aproximadamente 5% dos indivíduos só 1 a 4% das células em cultura é que exprimem a fragilidade. Além da reduzida expressão do marcador X Frágil em alguns indivíduos afectados, a prática corrente sugere que a não penetrância (ou ausência de características clínicas) da doença (incluindo a fragilidade cromossómica) pode atingir os 20%.

A análise da mulher heterozigótica (portador obrigatório) tem revelado pelo menos dois grupos. O primeiro inclui os indivíduos que estão clinicamente afectados e em que o local Frágil é expresso numa elevada percentagem das suas células em cultura. O segundo grupo inclui indivíduos pouco afectados, com raras ou praticamente nenhuma células exprimindo a fragilidade. Sherman et al<sup>28</sup> referiram que aproximadamente 50% dos portadores obrigatórios com um Coeficiente de inteligência normal irão exprimir a fragilidade em menos de 4% das suas células. Estes e outros têm demonstrado que infelizmente quase 50% dos portadores

obrigatórios não poderão ser identificados com base quer nas anomalias cromossómicas quer no estado mental.

A luz da elevada prevalência do síndrome do X Frágil e de outros AMLC'X', torna-se extraordinariamente importante a detecção precisa de mulheres portadoras e indivíduos do sexo masculino com falta de penetrância. Até há pouco tempo, a história clínica, a história familiar e a análise cromossómica constituíam os meios disponíveis para confirmar o diagnóstico do síndrome do X Frágil. Todavia a caracterização cromossómica não permite identificar de uma forma segura homens não afectados e mulheres portadoras; cerca de 20% dos homens e 50% das mulheres que transportam o gene para este síndrome são citogeneticamente negativos para o marcador X Frágil. Para esta patologia e outras tornaram-se necessários métodos de triagem que ofereçam uma maior sensibilidade para um aconselhamento genético mais fidedigno.

## TECNOLOGIA DO ADN RECOMBINANTE

As técnicas do ADN recombinante, resultantes dos métodos de triagem com elevada sensibilidade e especificidade, tornam-se disponíveis para a manipulação genética de uma grande variedade de doenças. Estas técnicas constituem um instrumento poderoso para a definição de métodos experimentais clinicamente úteis para um grande número de doenças de difícil diagnóstico, nela se incluindo o AMLC'X'.

Foi enorme o impacto desta tecnologia em doenças com mutações conhecidas de proteínas. Contudo, quando a mutação é desconhecida, como é o caso na maior parte das vezes, tem-se recorrido a estratégias alternativas para a criação de sondas capazes de serem utilizadas para o diagnóstico e identificação da mutação génica.

Quando se conhece a proteína anormal implicada numa determinada patologia, caso das hemoglobinopatias, as técnicas bioquímicas correntes permitem o estudo directo da mutação génica e dos seus mecanismos de regulação.

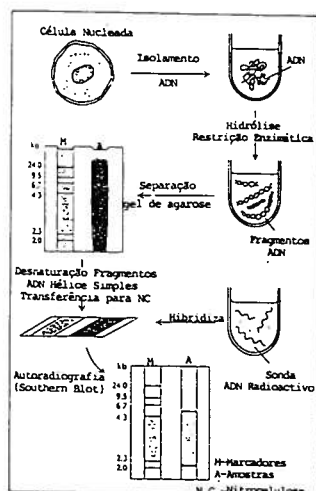
Nestes casos, é possível identificar directamente a localização do gene, recorrendo a técnicas bioquímicas que nos permitem a obtenção de ARN mensageiro (mARN) e a criação da sonda de ADN complementar que permita essa identificação. Tem-se verificado um progresso espectacular na compreensão e diagnóstico pré-natal das hemoglobinopatias em resultado de capacidade de identificação directa da localização apropriada do ADN cromossómico.

Exemplificando, as mutações que originam a talassémia têm sido identificadas nos genes globina em quase todos os estágios da expressão génica.

A técnica designada por impressão *Southern* é particularmente útil para a detecção de deleções de material génico que constitui a base em alguns síndromes talassémicos, Fig. 1.

Dispõem-se actualmente de sondas para todos os genes da globina humana, para fracções desses genes e para as áreas génicas circulantes. Com este tipo de metodologia e ainda de um outro, que não será aqui focado, dispõem-se actualmente de mapas de restrição descrevendo a organização dos agregados alfa e beta do gene normal da globina humana.

O tipo de estratégia descrito não é aplicável a doenças genéticas em que a proteína anormal é desconhecida. Nalgumas doenças é actualmente possível a análise directa do defeito usando sondas génicas clonizadas. Este tipo de análise directa constitui o meio de detecção mais desejável pela segurança e informação fornecidos. Uma metodologia alternativa e indirecta recorre à utilização dos polimorfismos de restrição (em nomenclatura anglo-saxónica Restriction Length Fragments Polymorphisms), quer no próprio locus patológico, quer ligados a esse mesmos locus.



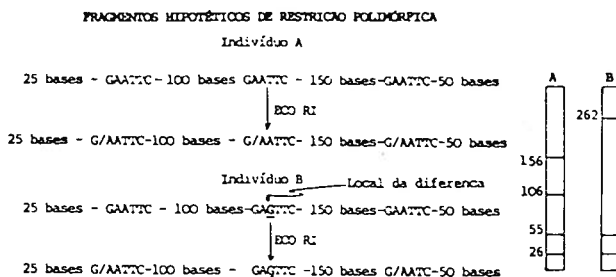
**Fig. 1** — Análise pela impressão *Southern*. Recorre-se a uma pequena amostra de sangue do doente. O ADN de elevado peso molecular é extraído dos leucócitos e hidrolisado por uma endonuclease de restrição. Cada endonuclease de restrição reconhece uma sequência nucleotídica específica e cliva o ADN nos locais em que tal sequência esteja presente. Dado que o ADN representa a totalidade do genoma individual, a hidrólise com uma determinada endonuclease produz uma multiplicidade de fragmentos. Os fragmentos de hélice dupla do ADN são colocados em gel de agarose, separados e dimensionados por electroforese, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e hibridizados a uma sonda radioactiva de ADN complementar ao gene em questão. O excedente da sonda é eliminado por lavagens, procedendo-se à autoradiografia da preparação para revelar o fragmento de ADN homólogo à sonda.

### ANÁLISE INDIRECTA DA DOENÇA GENÉTICA USANDO POLIMORFISMOS DE RESTRIÇÃO DETECTADOS POR SONDAS GÉNICAS

Um defeito genético que não se manifeste por uma deleção grosseira pode não ser detectado pela falta da endonuclease de restrição apropriada.

Constitui alternativa o recurso a polimorfismos do ADN como marcadores genéticos flanqueando o locus em causa. Os polimorfismos de restrição são alterações ou mutações de pares nucleotídicos ou pares de bases neutras que introduzem ou removem um local de restrição, conduzindo a deleções ou rearranjos da sequência de ADN que afectam o comprimento de ADN entre os locais de restrição.

Os polimorfismos de restrição são bastante frequentes, ocorrendo no genoma humano com intervalos de 200 a 300 nucleótidos, demonstrando esta frequência a extensa variação do ADN que está por ser explorada em medicina clínica. Têm sido já demonstradas variações polimórficas de muitas sequências isoladas do genoma humano. A hereditariedade de um alelo patológico pode assim ser monitorizado ao longo de gerações, acompanhando-se a hereditariedade dos polimorfismos de restrição detectáveis pela *ligação* ao gene em questão. A associação de um alelo específico com uma doença genética pode também ser excluída pela análise da hereditariedade dos polimorfismos de restrição ligados a esse mesmo alelo (entendendo-se por alelos diferentes os tipos do mesmo gene resultantes de uma mutação). Na ausência de uma ligação estreita entre os polimorfismos de restrição à volta do locus génico candidato e o fenotipo patológico é possível concluir que esse locus não está implicado na etiologia da doença, Fig. 2.



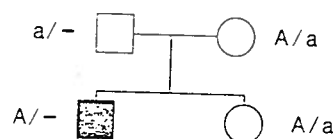
**Fig. 2** — Representação de um fragmento de restrição polimórfica. Neste exemplo hipotético existe a diferença de uma única base entre os indivíduos A e B que afecta o local *Eco RI*. Recorrendo-se a esta enzima de restrição para fragmentar o ADN, resultam fragmentos de extensão diferente. No caso destas diferenças ocorrem em conjunto numa população, os fragmentos de restrição podem ser usados como polimorfismos. Estes polimorfismos do ADN podem ser utilizados em estudos familiares de *ligação*, à semelhança da utilização de traços fenotípicos. Produzem-se em geral fragmentos de sequência de ADN com extensões de milhares de nucleótidos. Estes fragmentos são separados em gels, detectados com uma sonda radioactiva e autoradiografados para demonstrar os polimorfismos de restrição evidenciados na figura.

São necessárias pelo menos duas condições para que uma deleção ou mutação nucleotídica, responsável pelo fenotipo patológico, seja detectada recorrendo-se às endonucleases de restrição, a saber:

a) Uma compreensão bem clara da natureza do tipo de patologia para que o locus responsável seja identificado e isolado para uso posterior como sonda de hibridização para examinar o alelo associado à doença.

b) Para a detecção de uma aberração, é necessário que o local de restrição seja introduzido ou removido no caso de uma mutação pontual, ou que a extensão do ADN (ácido desoxiribonucleico) entre os locais seja alterado por adições, deleções ou rearranjos da sequência nucleotídica.

A Figura 3 ilustra de uma forma simplificada o estudo de ligação de uma alteração ligada ao cromossoma X com a utilização de um marcador com os alelos A e a. Para uma análise de ligação eficaz tornam-se necessários os seguintes componentes: a) Deve existir um membro afectado de uma família (neste caso um indivíduo do sexo masculino com um fenotipo não ambíguo); b) Uma mulher obrigatoriamente portadora heterozigótica para a sequência variante (isto é, no exemplo considerado A/a) de forma a que os dois cromossomas possam ser distinguidos um do outro; e c) a frequência de recombinação entre o marcador e o locus patológico deve ser bastante baixo (idealmente zero). Um estudo do ADN do indivíduo afectado revela que o alelo A está associado com o cromossoma portador do locus defeituoso. Desta forma, qualquer descendente do portador obrigatório (neste caso a mãe) que herde o alelo A também irá herdar o gene mutante. A irmã do propositus (doente) seria identificada como portadora da doença, mesmo na ausência



**Fig. 3** — Exemplo de herodograma com uma alteração ligada ao cromossoma X.

de qualquer sinal clínico evidente, dado que ela herdou o alelo A da sua mãe. Nunca é demais chamar a atenção para o facto de o marcador e o locus patológico cosegregarem somente na ausência de quaisquer fenómenos de recombinação.

**INVESTIGAÇÃO EM CURSO**

Os autores que subscrevem o presente artigo, em colaboração com outros autores dos E.U.A., (Project X-linked Mental Retardation Linkage and Clinical Studies; Investigador principal: Lubs, H.), estão empenhados em estudos para a detecção do *Atraso Mental Ligado ao Cromossoma 'X'*.

Alguns marcadores têm sido localizados à porção distal do cromossoma X, constituindo marcadores válidos para o síndrome do *x frágil*. Estes marcadores incluem os genes da glucose-6-fosfatato desidrogenase (GGPD); hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), dos factores de coagulação: Factor IX e VIII (F9,F8) e ainda fragmentos arbitrários de ADN (52A, DX13, ST14, 4D-8, e CX55.7), Fig.4.

Inicialmente, um dos marcadores mais promissores parecia ser o polimorfismo da endonuclease de restrição Taq I

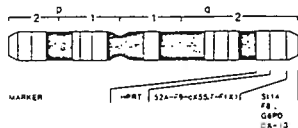


Fig. 4 – Mapa genético da região distal do cromossoma X.

identificado no gene do factor F9. Dados posteriores<sup>29</sup> sugeriram que a frequência da recombinação entre o Factor IX e o locus *X Frágil* era provavelmente cerca de 10%. Vários estudos vieram no entanto a sugerir um grande número de recombinantes, indicando que estes dois locus estão mais distanciados do que se pensava, tendo sido demonstrada uma grande heterogeneidade na região centromérica do locus do *X Frágil*<sup>30</sup>.

Estudos mais recentes<sup>31</sup> sugerem que a ligação entre F9 ou ST14 e o locus do *X Frágil* não é tão estreita como se pensava, tendo sido demonstradas frequências de recombinação génica de 15 a 20%. Além disso, a ligação entre F9 e F(x) demonstra conforme já acima referido uma grande heterogeneidade genética, com algumas famílias exibindo uma ligação muito estreita, o que não se verifica com outras famílias.

Conforme já acima referido, para além do síndrome do *X frágil* há que definir melhor pelo menos 20 entidades em que

existe atraso mental ligado ao cromossoma X e nas quais não se observa o *X Frágil*.

Os principais objectivos visados serão os de uma melhor definição do mapa de ligação dos locus implicados nestas entidades, examinando-se com mais pormenor a questão da heterogeneidade genética.

O Quadro 2 indica as localizações génicas de alguns locus pseudo autossómico e as respectivas localizações nos cromossomas X e Y.

As frequências de recombinação destes vários marcadores deverão ser definidos com um elevado limite de confiança, de forma a que possam ser utilizados como marcadores diagnósticos na hereditariiedade. Novos marcadores devem ser explorados na tentativa de se obterem ensaios válidos para a identificação dos portadores dos síndromes com *AMLC 'X'*. A tecnologia do ADN recombinante constitui indiscutivelmente uma metodologia que está a revolucionar o estudo da patologia humana.

**USO DA INFORMÁTICA PARA DESCRIÇÃO, DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO DOS SÍNDROMES DO AMLC'X'**

Conforme acima referido, entre as 345 patologias ligadas ao cromossoma X e discriminados no catálogo Mcksick<sup>17</sup>, aproximadamente 80 evidenciam um Atraso Mental como um manifestação clara.

No decurso das duas últimas décadas, tem vindo a emergir um grande número de entidades da categoria *Atraso Mental não específico ligado ao cromossoma X*. Destes síndromes muito poucos têm localizações génicas tentativas.

Os autores que subscrevem o presente artigo encontram-se empenhados em estudos colaborativos<sup>32</sup> visando uma abordagem programada para melhor definição e localização génica destas doenças.

O programa recorre a um sofisticado sistema Mac Intosh II para computo dos heredogramas, dados fotográficos e dados clínicos relevantes a cada um dos síndromes para investigar manifestações comuns bem como semelhanças ou diferenças no facies e outros achados clínicos. Dado que novos dados fotográficos e clínicos podem ser computados através da anexação de um equipamento de rastreio, tipo *scanner*, e/ou de outras vias, o referido sistema irá fornecer um número crescente de dados para conduzir a uma informação de acesso fácil para os síndromes em questão.

**Discussão dos dados computados.** Uma vez processada a informação clínica, os dados base são utilizados para integrar informação respeitante aos síndromes com característi-

QUADRO 2 Localização génica de alguns locus pseudoautossómicos e as respectivas localizações nos Cromossomas X e Y

Locus pseudo-autossómico	Sonda	RFLP'S	Localização no Cromossoma X	Localização no Cromossoma Y
DXYS 14	29Ci	ECOR I PST I HIND III	p 22.3	p. Terminal
DXYS 15	113 B 113 D	PSt I TAQ I	p 22.3	p
DXYS 17	601	TAQ I	p 22.3	p
DXYS 20	pDP 230	ECO RI VÁRIOS	p	p
MIC 2	pSG 1	TAQ I MSp I	22.3	p

Os locus génicos são em geral designados por letras maiúsculas e números, mais frequentemente em grupo de 3 ou 4 símbolos. Os locus polimórficos detectados por sondas anónimas são designados pela letra D (para o segmento de ADN) seguida pelo número do cromossoma (ou N ou outras localizações), seguidas de S, F ou Z (respectivamente cópia única, família de genes ou sequência repetitiva para uma região cromossómica única). O número seguinte indica o segmento do referido cromossoma em relação ao Repositório do Mapeamento Génico (Gene Mapping Library).

cas comuns como por exemplo a estatura baixa ou testículos grandes.

O computo destes dados é utilizado para desenvolver diagramas ramificados do tipo evidenciado na Fig. 5. Segundo Lubs e Arena, comunicação pessoal<sup>12</sup>, estes diagramas são esquematizados de forma a conduzir ao diagnóstico apropriado ou diagnóstico diferencial. Embora não englobando todos os sinais clínicos, os esquemas procuram valorizar características pouco habituais ou uma constelação de anomalias.

Uma vez determinado este aspecto, conforme evidenciado na Fig. 5, a estatura baixa, um facies distinto, manifestações neuromusculares, e hipogonadismo ocorrem em quatro síndromes, sendo possível rever as descrições completas de cada um destes quatro síndromes recorrendo ao ecran para triagem do síndrome.

O formato sumarizando as entradas foi desenvolvido para permitir um acesso fácil a vários tipos de dados descritivos para cada síndrome.

**Estudos Moleculares.** A título de conclusão referimos que os estudos moleculares são críticos para o desenvolvimento de testes diagnósticos e para a identificação precisa de famílias e síndromes.

Famílias com características clínicas comparáveis e relações de ligação génica terão presumivelmente o mesmo síndrome levando a uma compilação de dados. As famílias com características clínicas semelhantes mas com relações de ligação distintas serão consideradas entidades separadas. O corolário destes estudos será o isolamento e a sequência de genes específicos. A longo prazo poder-se-á antever o desenvolvimento de estudos directos com a aplicação de sondas

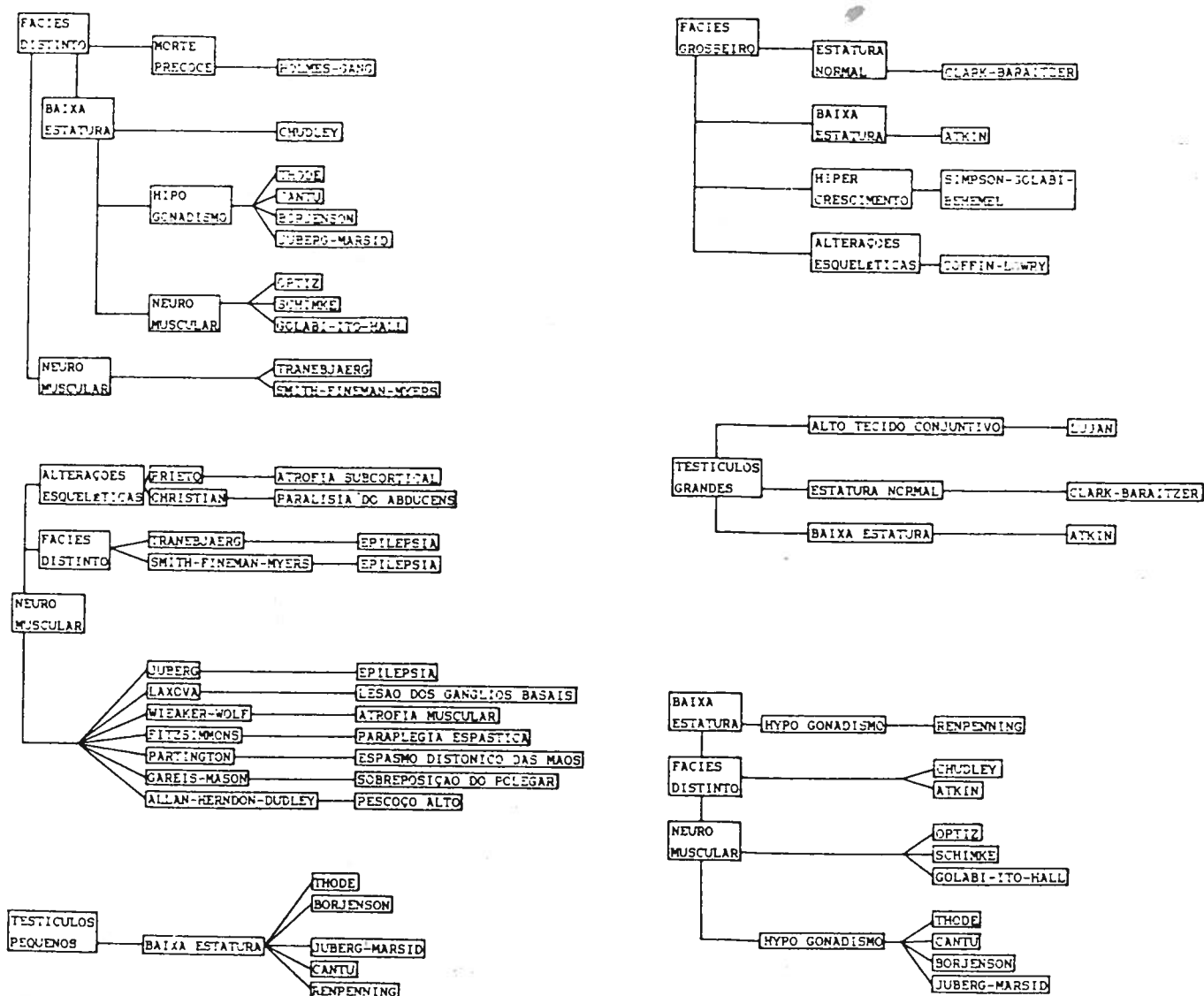


Fig. 5 — Fluxograma sugerindo diagnósticos possíveis. As entidades são referenciadas em ecrans distintos e a título de guia a fim de se obter rapidamente mais dados informativos. Seleccionando o nome de um determinado autor, é patenteado o síndrome correspondente. (Lubs, H. e Arena, F. — Comunicação Científica subordinada ao tema: *X-Linked Mental-Retardation: Linkage and Clinica Studies*, Lisboa, 1989.07.27).



gênicas e não estudos de ligação para o diagnóstico destas doenças.

A médio prazo, os nossos estudos recorrerão à análise de ligação dos dados gerados pelo uso de numerosos marcadores de ADN nas famílias seleccionadas. Recorrer-se-á ao programa *Linkage* e equipamento informático compatível. Este conjunto inclui uma série de programas que executam a estimativa da probabilidade máxima das taxas de recombinação e calculam os logaritmos das probabilidades (Lod Score). Os programas permitem a análise de ligação recorrendo a um número arbitrário de locus e aos locus patológicos. Podem ser computados numerosos parâmetros como a penetrância incompleta, taxas de mutação e frequências gênicas no locus patogénico permitindo o desequilíbrio génico entre locus diferentes.

### INTERACÇÃO DO DIAGNÓSTICO CLÍNICO E ESTUDOS DE LIGAÇÃO

Esta interacção revela-se crítica para os estudos que se propõem. A delineação destes estudos (no que diz respeito à colecção dos dados informativos da ligação génica para mais de uma família) terá a maior importância no equacionamento dos dados computados conduzindo a uma maior probabilidade na obtenção de *Lod Scores* significativos. Encontra-se perspectivado o recurso à complexidade da análise de ligação multipontual.

**Recorrer-se-á à seguinte metodologia:** a) Serão utilizadas as famílias mais numerosas em todos os casos. **Caso haja só uma família disponível, com uma entidade específica,** será necessária a avaliação de pelo menos dez acasalamentos potencialmente informativos para que tal estudo seja considerado válido. b) Após a elaboração de diagnósticos clínicos específicos a partir dos dados analíticos e numa base consensual dos diversos analistas e investigadores clínicos, serão computados os dados de ligação a partir de famílias com o mesmo diagnóstico. Desta forma poderão ser utilizadas famílias mais pequenas com diagnósticos específicos. c) **Famílias com tipos não-específicos ou não diagnosticados de Atraso Mental ligado ao cromossoma X.** Somente famílias muito extensas é que serão incluídas nesta categoria. Ou seja, as famílias com 10 ou mais acasalamentos informativos.

No primeiro estágio deste estudo cada família será equacionada como uma entidade com um logaritmo de probabilidade específico. O diagnóstico clínico será revisto à luz de uma definição posterior de síndromes, novos conhecimentos científicos, etc. As famílias com dados específicos serão computadas à parte e os seus logaritmos de probabilidade considerados em bloco. Os *Lod Scores* das restantes famílias serão sempre computados em separado caso os dados clínicos sugiram um diagnóstico clínico, conhecido ou desconhecido mas potencialmente específico.

### Em Resumo os Objectivos a Longo Prazo Visam:

1. Mapear os síndromes ligados ao cromossoma X responsáveis pelo atraso Mental.
2. Desenvolver relações funcionais de ligação para o diagnóstico incluindo o diagnóstico pré-natal.
3. Caracterizar em termos moleculares todos os locus génicos possíveis que possam ser responsabilizados pelo Atraso Mental tornando acessível um teste directo para cada síndrome.

### BIBLIOGRAFIA

1. TURNER G., TURNER B.: X-linked mental retardation. *J. Med Genet* 1974; 11: pp. 109-113.

2. HAGERMAN R.J., MCBOGG P.M., eds.: The fragile X syndrome: diagnosis, biochemistry, intervention. Dillon C.O.: Spectra Publ. C.O., 1984.

3. International workshop on fragile X and X-linked mental retardation. *Am J. Med Genet* 1984; 17: pp. 1-345

4. PENROSE L.S.: A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. *Special Rep. Ser. n.º 229, Med Res Council* 1938.

5. MARTIN J.P., BELL J.: A pedigree of mental defect showing sex linkage. *J. Neurol Psychiatry* 1943; 6: PP. 154-157.

6. LEHRKE R.G.: X-linked mental retardation and verbal disability. New-York, intercontinental Medical Book corporation, 1974.

7. HERBST D.S., MILLER J.R.: Nonspecific x-linked mental retardation. The frequency in British Columbia. *Am J. Med Genet* 1980; 7: pp. 461-469.

8. Renpenning H. GERRARD J.W., ZALESKI W.A., TABATA T.: Familial sex-linked mental retardation. *Can Med Ass J.* 1968; 87: pp. 954-956.

9. LUBUS H.A.: A marker x chromosome. *Am J. Hum Genet* 1969; 21: pp. 231-244.

10. GIRAUD F. AYME S., MATTEI J.F.: Constitutional chromosomal breakage. *Hum Genet* 1976; 34: pp. 125-136.

11. HARVEY J., JUDGE C., WIENER S.: Familial x-linked mental retardation with an x chromosome abnormality. *J. Med Genet* 1977; 14: pp. 46-50.

12. SUTHERLAND G.R.: Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence of the type of tissue culture medium. *Science* 1977; 197: pp. 255-256.

13. RICHARDS B.W., SYLVESTER P.E., BROOKER C.: Fragile x linked mental retardation: the martin-Bell syndrome. *J. Ment Defic Res* 1981; 25: pp. 253-256.

14. FOX P., FOX D., GERARD J.W.: X-linked mental retardation: renpenning revised. *Am J. Med Genet* 1980; 7: pp. 491-495.

15. ATKIN J.F., FLAITS K., PATIL S., SAMITH W.: A new x-linked mental retardation syndrome. *Am J. Med Genet* 1985; 21: pp. 697-705.

16. CLARK R.D., BARAITSER M.: Letter to the editor: A new x-linked mental retardation syndrome. *Am J. Med Genet* 1987; 26: pp. 13-15.

17. MCKUSICK V.A.: "Mendelian inheritance in man", Catalog of autosomal dominant, autosomal recessive, and x-linked phenotypes. 7<sup>th</sup> ed. the Johns Hopkins University Press.

18. x-linked mental retardation 3. Opitz J.M. (eds). *Am J. Med Genet* 1988; 30 (1 2): pp. 1-702.

19. THODE A., PARTINGTON M.W., YIP M.Y., CHAPMAN C., RICHARDSON V.F., TURNER G.: New syndrome with mental retardation, short stature and an Xq duplication. *Am J. Med Genet* 1988; 30: pp. 239-250.

20. FRANCKE V., OCHS H.D., MARTINVILLE B., GIACALONE J., LINDGREN V., DISTECHE C., PAGON R.A., HOFKER M.H., B. VAN OMMEN G.J., PEARSON P.L., WEDGWOOD R.J.: Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa and McLeod syndrome. *Am J. Med Genet* 1985; 37: pp. 250-267.

21. CURRY C.J.R., MAGENIS E., BROWN M., LANMAN J.M., TAI J., LAGUE P.O., GOODFELLOW P., MOHANDAS T., BERGNER E.A., SHAPIRO I.J.: Inherited chondrodysplasia punctata due to a deletion of the terminal short arm of an X chromosome. *N.E. J. Med* 1984; 311 (16): pp. 1010-1014.

22. NURMI T., UHARI M., SIRKKA-IHSA L., HERVA R., THLIKAINEN A., KOUVALAINEN K.: Immunodeficiency associated with a deletion in the short arm of the X-chromosome. *Clin Exp Immunol* 1981; 45: pp. 107-112.

23. WYSS D., DELOGIER C.D., DANNIEL J., ENGEL E.: Structural anomalies of the X chromosome: personal observation and review of non-mosaic cases. *Clin Genet* 1982; 21: pp. 145-159.

24. TRUNCA C., THERMAN E., ROSENWAKS Z.: The phenotypic effects of small, distal Xq deletions. *Hum Genet* 1984; 68: pp. 87-89.

25. KEMPER M.B., HAGERMAN R.J., AHMAD R.S., MARINER R.: Cognitive profiles and the spectrum of clinical manifestations in heterozygous fragile (x) females. *Am J. Med Genet* 1986; 23: pp. 139-156.

26. LOESCH D.Z., HAY D.A., SUTHERLAND G.R., HOLLIDAY J., JUDGE C., WEBB G.C.: Phenotypic variation in



- male-transmitted fragile X: genetic inferences. *Am J. Med genet* 1987; 27: pp. 401-417.
27. CHUDDLEY A.E., KNOLL J., GERARD J.W., SHAFI I., MCGAHEY E., ANDERSON J.: Fragil (X) X-linked mental retardation. I: Relationship between age intelligence and the frequency of expression of fragil (X) (q28). *Am J. Med Genet* 1983; 14: pp. 699-712.
28. SHERMAN S.L., MORTON N.E., JACOBS P.A., TURNER G.: The marker (X) syndrome: A cytogenetic and genetic analysis. *Am Hum Genet* 1984; 48 (pt1): pp. 21-37.
29. CAMERINO G., MATTEI M.G., MATTEI J.F., JAYF M., MANDEI J.L.: Close linkage of fragil X-mental retardation syndrome to haemophilia B and transmission thoutg a normal male. *nature* 1983; 306: pp. 701-704.
30. BROWN W.T., JENKINS E.C., GROSS A.C.: Further evidence for genetic heterogeneity in the fragile X syndrome. *Hum Genet* 1987; 75: pp. 311-321.
31. THIBODEAU S.N.: Use of restriction fragment lenght polymorphism analysis for detection carriers of *fragile X* syndrome. *Clin Chem* 1987; 33 10: pp. 1726-1730.
32. LUBS H.A., ARENA J.F.: X-Linked mental retardation syndromes: Use of Macintosh II computer for syndrome description, delineation and diagnosis. Em publicação 1989.
33. ARENA J.F., LUBS H.A.: Birth defects encyclopedia. M. I... Buyse (ed.). Third edition. Dover Center for Birth Defects Information Services, Inc. (in press)

Pedido de Separatas:  
Cristina Pinto  
Cadeira de Genética  
Faculdade de Medicina de Lisboa  
1600 Lisboa



Prof. Egas Moniz.  
Prémio Nobel de Medicina Portuguesa.