

TESTES GENÉTICOS NO DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL.

Laryssa R. Bueno¹, Juliana S. Schauben²

Resumo

A síndrome do X-frágil (SXF) é uma doença genética que caracteriza-se por distúrbios do desenvolvimento neurológico, dificuldade de aprendizagem, problemas comportamentais, distúrbios invasivos do desenvolvimento e autismo. Estima-se que o sexo masculino é o mais afetado com uma incidência de 1:4.000 enquanto que para o sexo feminino é de 1:6.000. É uma síndrome monogênica de herança recessiva ligada ao X, com alteração no gene *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*). A causa da doença é uma expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene *FMR1*. Os pacientes apresentam mais de 200 repetições CGG, o que leva a ausência da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), essa proteína é o produto final do gene e os sintomas são característicos da síndrome estão associados à deficiência desta proteína. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre a síndrome do X-frágil e seu diagnóstico genético. Para isso foram discutidos as vantagens e desvantagens das várias técnicas de acordo com as características clínicas de cada paciente. Os testes atualmente utilizados para o diagnóstico da SXF são: a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o Cariótipo, o *Southern Blotting*, o Sequenciamento do DNA e o MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*). A técnica padrão-ouro para o diagnóstico da SXF é a PCR, pois é um método que permite, a partir de uma pequena quantidade de DNA, a amplificação de sequências específicas de modo simples, sensível e rápido.

Palavras-chave: Síndrome X-frágil. Diagnóstico para Síndrome X-frágil. Gene *FMR1*.

Abstract

Fragile X syndrome (FXS) is a genetic disease characterized by neurodevelopmental disorders, learning disabilities, behavioral problems, invasive developmental disorders, and autism. It is estimated that males are the most affected with an incidence of 1: 4,000 while for females it is 1: 6,000. It is a monogenic syndrome of X-linked recessive inheritance, with alteration in the *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*) gene. The cause of the disease is an expansion of the repetition of a CGG trinucleotide sequence in the promoter region of the *FMR1* gene. Patients present more than 200 CGG repeats, which leads to the absence of Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), which is the end product of the gene and the symptoms are characteristic of the syndrome are associated with the deficiency of this protein. The objective of this study was to perform a literature review on the X-fragile syndrome and its genetic diagnosis. For this, the advantages and disadvantages of the various techniques were discussed according to the clinical characteristics of each patient. The tests currently used for the diagnosis of SXF are: PCR (Polymerase Chain Reaction), Karyotype, Southern Blotting, DNA Sequencing and MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*). The standard gold technique for the diagnosis of SXF is PCR, since it is a method that allows, from a small amount of DNA, the amplification of specific sequences in a simple, sensitive and fast way.

Keywords: X-Fragile Syndrome. Diagnosis for X-Fragile Syndrome. *FMR1* Gene.

Introdução

A síndrome do X-frágil (SXF) é uma síndrome monogênica de herança recessiva ligada ao X que caracteriza-se pelos distúrbios do desenvolvimento neurológico, dificuldade

¹ Acadêmico do curso de Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba PR.

² Biomédica, Profª Dra da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba PR.

de aprendizagem, problemas comportamentais, distúrbios invasivos do desenvolvimento e autismo (HALL *et al.*, 2009). Sua incidência para o sexo masculino é de 1: 4.000 e de 1: 6.000 para o sexo feminino apresenta penetrância de 80% nos homens e 30% nas mulheres. Os homens que são portadores passam para suas filhas que herdam a pré-mutação e não são afetadas (RUIZ *et al.*, 2009). Os homens são mais afetados do que as mulheres porque possuem apenas um cromossomo X e não apresentam o efeito da compensação de dose. As mulheres possuem a compensação do outro cromossomo X, dessa forma as portadoras do gene mutado irão apresentar sinais e sintomas mais leves que vão variar de acordo com o grau de mutação ou pré-mutação em que se encontra o gene *FMR1* (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2009).

Além do histórico familiar de deficiência mental, os pacientes com SXF apresentam características clínicas como face alongada, orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações, macroorquidia e prega palmar transversa e alguns sinais comportamentais como morder as mãos, movimentos repetitivos com as mãos, aversão ao contato físico e pouco contato visual, esses pacientes possuem ansiedade, variação de humor, hiperatividade e agressividade. Esses sinais e sintomas estão presentes em 90% dos casos mas não confirmam o diagnóstico, dessa forma é necessária a confirmação através do exame genético com técnicas específicas para a síndrome estudada (KUMARI & USDIN, 2010). Outros problemas de comportamento observado é a hiperatividade com ou sem déficit de atenção, irritabilidade, agressividade, resposta anormal aos estímulos, principalmente hipersensibilidade aos sons (RUIZ *et al.*, 2009).

A SXF é causada por uma expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*). Os pacientes apresentam mais de 200 repetições de CGG constituindo a mutação completa, o que leva a ausência da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), e aos sintomas característicos da síndrome (STOGER *et al.*, 2011).

Alguns testes genéticos são utilizados para o diagnóstico da síndrome do X-frágil como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Cariótipo, *Southern Blotting*, Sequenciamento do DNA e MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*). Como existem várias técnicas e todas apresentam vantagens e desvantagens, elas serão escolhidas de acordo com as características clínicas de cada paciente (STEGANI, 2011).

O Biomédico tem grande importância no diagnóstico da síndrome do X-frágil, pois é um profissional altamente capacitado para atuar diretamente no laboratório com testes genéticos, moleculares e pesquisa de genes, dessa forma o diagnóstico será mais rápido para que o médico neurologista, psiquiatras e toda a equipe multidisciplinar possa orientar a família e iniciar um tratamento adequado a esse paciente.

Este trabalho tem como objetivo descrever as características genéticas da síndrome do X-frágil e os testes genéticos utilizados em seu diagnóstico.

2 Metodologia

Este estudo caracteriza-se por uma revisão bibliográfica, onde foram pesquisados artigos sobre a síndrome do X-frágil e testes genéticos para diagnóstico. Esta pesquisa foi baseada em busca de artigos nas bases de dados “google acadêmico”, *Pubmed* e *Scielo* onde foram utilizados os termos de busca: “Síndrome X-frágil”, “Diagnóstico para Síndrome X-frágil”, “Testes genéticos para Síndrome X-frágil”, “gene *FMR1*” O período da pesquisa bibliográfica foi realizado entre julho de 2018 a novembro de 2018.

3 Discussão

A expressividade na SXF é variável. Mulheres portadoras por possuírem dois cromossomos X, podem produzir FMRP, a partir do cromossomo X normal, dessa forma quando apresentarem comprometimento intelectual, os sintomas serão brandos e a deficiência mental leve. Já os homens que apresentarem a mutação completa podem possuir alguns alelos desmetilados, conhecidos como mosaicismo para metilação. Alguns homens também podem apresentar mosaicos para pré-mutação, seus sintomas serão menos severos que aqueles pacientes com mutação completa (HAGERMAN & HAGERMAN, 2010).

Na SXF o cromossomo X afetado contém uma região denominada FRAXA conhecida como sítio frágil folato-sensível, onde a cromatina não se condensa. Essa região, localizada no Xq27.3, está sujeita a quebras frequentes. O gene *FMR1* representado na figura 1, contém 38 quilobases, 17 éxons e 16 introns, apresenta em sua região 5' não traduzida um microssatélite de trinucleotídeos CGG e é transcrito em um mRNA de 4,8 quilobases que serve de molde para sintetizar a proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). O sequenciamento deste gene em humanos revelou um total de 185.775 pares de bases em sua constituição (KHALIL *et al.*, 2008).

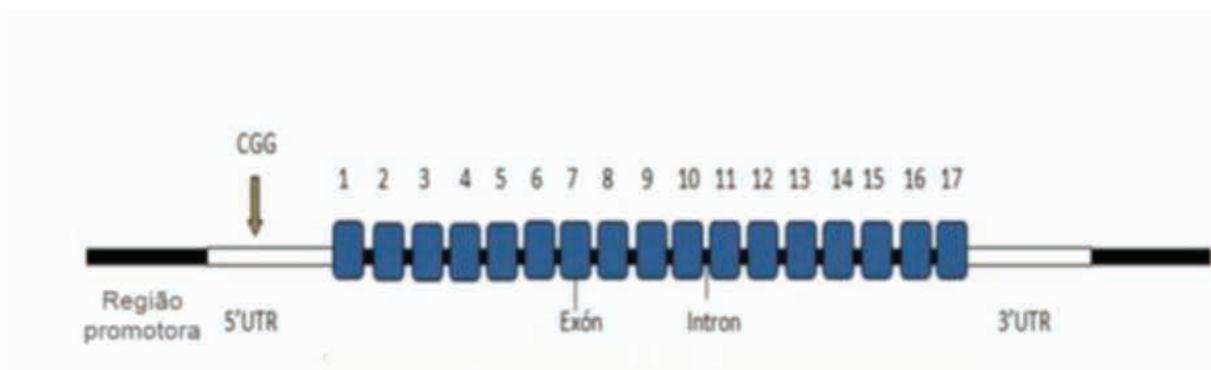


Figura 1. Representação esquemática do gene *FMR1*
Fonte: Gomez, 2011.

A causa da doença é a expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene *FMR1*, os pacientes que apresentam acima de 200 repetições da sequência CGG possuem a mutação completa. O número de repetições considerado normal varia de 6 a 55 enquanto o estágio de pré-mutação apresenta entre 55 a 200 repetições (BECHARA *et al.*, 2009).

As repetições CGG que variam entre 45 e 55 podem apresentar-se estáveis em algumas pessoas, mas em outras tendem a se expandir quando o gene é transmitido para a próxima geração. Esse número de repetições faz parte de uma zona cinzenta ou intermediária, na qual esses pacientes podem desenvolver deficiências como distúrbio do aprendizado e comportamento, mesmo a mutação sendo muito próxima do esperado em indivíduos não afetados. A Figura 2 representa o número de repetições no promotor do gene, de acordo com as categorias relatadas (BECHARA *et al.*, 2009).

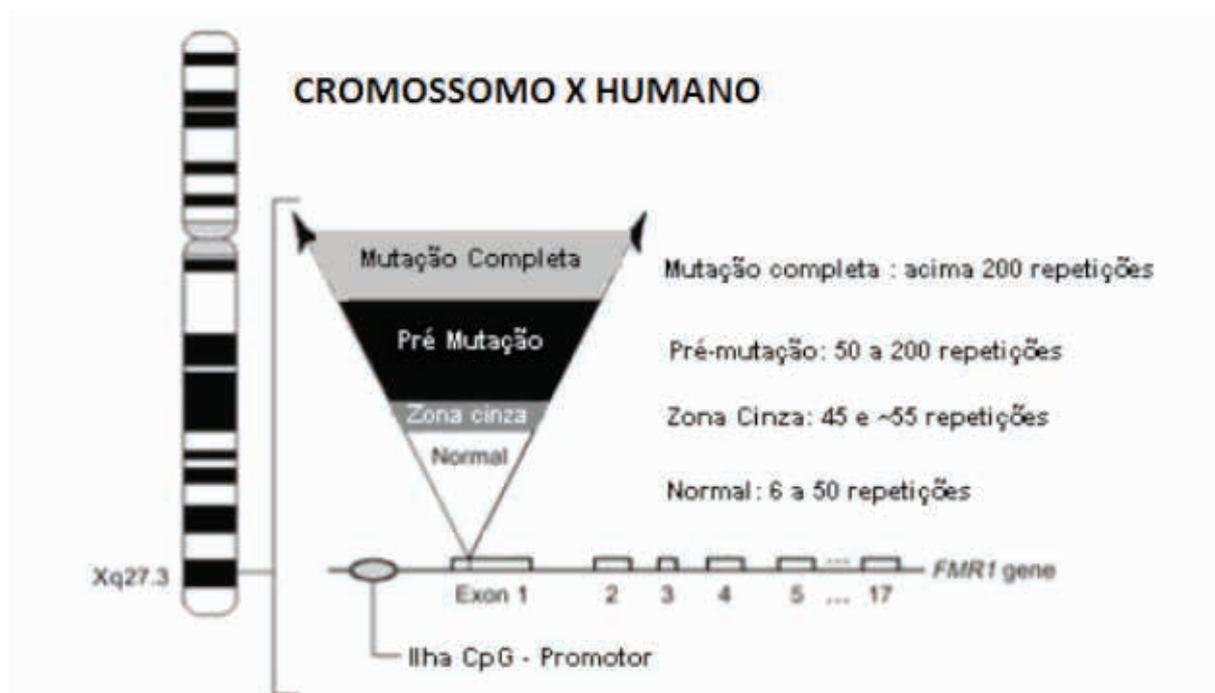


Figura 2. Ideograma do cromossomo X indicando categorias normais, zona-cinza, pré-mutação e mutação completa. Fonte: BECHARA *et al.*, 2009.

Além do sítio FRAXA, já foram descritos outros sítios frágeis no cromossomo X como o FRAXD, FRAXE e FRAXF. O FRAXE está relacionado a mutação no gene *FMR2* e contém repetição de CGG instáveis que também tem relação com retardo mental. Os sítios FRAXF e FRAXD aparentemente não causam alterações fenóticas e são localizados em regiões muito próximas ao sítio FRAXA como demonstrado na figura 3. A localização desses sítios em regiões próximas do cromossomo X pode dificultar a interpretação e a análise citogenética dos pacientes da SXF (BIACSI, 2008).

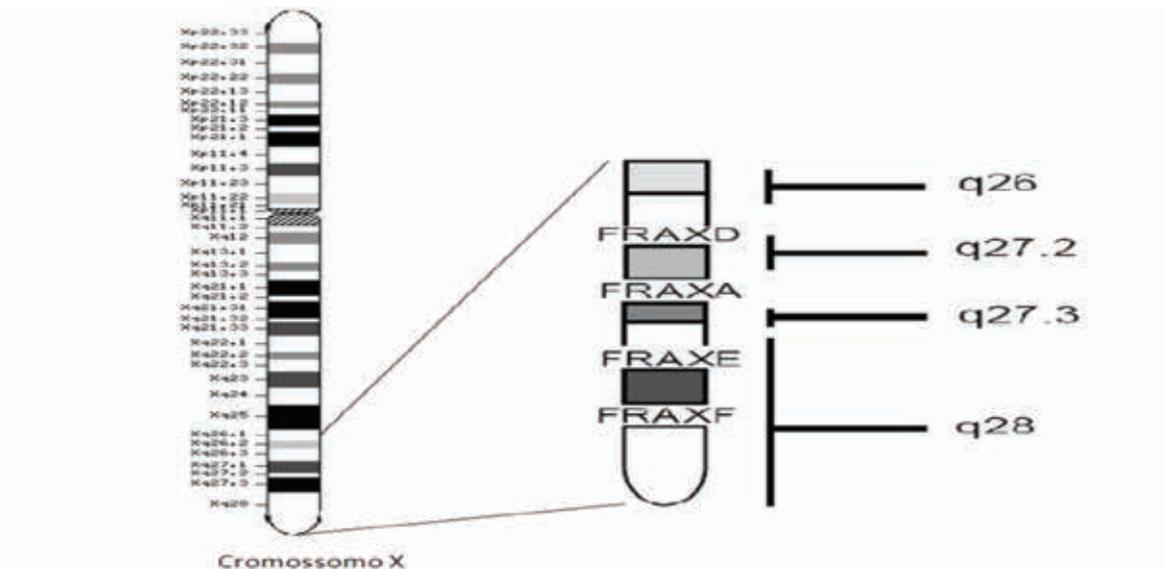


Figura 3. Ideograma do cromossomo X indicando as regiões de sítios frágeis.
 Fonte: Gomez, 2011.

Testes genéticos da SXF

Antes de identificarem o gene *FMR1* como responsável pela síndrome da X-frágil o diagnóstico era feito por meio de cariótipo, que por se tratar de uma técnica com baixa sensibilidade, baixa especificidade e um risco relativamente alto para diagnóstico falso-negativo (SHNTORCH *et al.*, 2012).

A genética molecular deixou mais compreensível à variabilidade do sítio frágil. A identificação molecular do gene *FMR1*, tornou-se o padrão ouro para o diagnóstico confiável da SXF. Dessa forma, é recomendável que indivíduos que possuem deficiência intelectual como o autismo ou que tenham sinais sugestivos do quadro clínico da doença, sejam submetidos ao teste genético molecular para definir o número de cópias CGG que está no gene *FMR1*. Os diagnósticos realizados para a SXF envolvem a análise cromossômica ou cariótipo, diagnósticos moleculares por Southern Blotting, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sequenciamento de DNA e MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) (YIM *et al.*, 2008).

3.1 Análise citogenética

A análise citogenética foi a primeira descrita dentre os métodos laboratoriais para diagnóstico para a SXF. Esta técnica, também é conhecida como cariótipo para a síndrome do X-frágil que consiste no estudo numérico e morfológico de cromossomos metafásicos. Para realizar essa técnica, as células são incubadas em meios de cultura com baixa concentração de ácido fólico para induzir a fragilidade na região Xq27.3 do cromossomo. Após a incubação, é realizado

o bandeamento G, que permite a visualização das bandas e classificação dos cromossomos (SHNTORCH *et al.*, 2012).

Devido a sua baixa especificidade e sensibilidade, a análise citogenética pode falhar na detecção da fragilidade em mulheres e homens afetados pela síndrome, conseqüentemente, esse método não é muito utilizado para o diagnóstico da SXF. A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de identificar outras alterações cromossômicas em indivíduos com outros distúrbios (SHNTORCH *et al.*, 2012).

3.2 Southern Blotting (SB)

É o método utilizado para identificar a mutação completa e a pré-mutação, com o qual é possível revelar o estado de metilação do gene. É uma técnica confiável para pacientes do sexo feminino e masculino e permite visualizar de uma forma direta o tamanho das sequências repetitivas, tanto os indivíduos que são normais quanto nos indivíduos que apresentam a mutação. Contudo o SB não permite determinar de forma precisa a ocorrência de sequências repetitivas de tamanho pequeno, mas que são importantes para diferenciar as sequências normais das pré-mutadas (SHNTORCH *et al.*, 2012).

A técnica utiliza uma combinação de enzimas de restrição para que seja possível detectar a expansão e uma sonda específica para o gene *FMR1*. Quando existe DNA metilado tem falha no corte da enzima que diferencia alelos metilados de não metilados. Os fragmentos de DNA que resultam da digestão enzimática serão submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose juntamente com um marcador molecular conhecido. O DNA será transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com a sonda marcada com material quimioluminescente ou isótopos radioativos. A membrana é colocada em contato com filmes de raios X, mostrando a posição dos fragmentos do DNA da membrana hibridados com a sonda radioativa (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2009).

A técnica de SB como diagnóstico de rotina tem algumas desvantagens pois apresenta alto custo, é trabalhosa e requer uma grande quantidade de DNA de alta qualidade (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2009).

3.4 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

É um método *in vitro* que permite, a partir de uma pequena quantidade de DNA, a amplificação de sequências específicas. Para o diagnóstico da SXF já foram feitos vários iniciadores e métodos de separação e detecção dos alelos. Não há qualquer polimorfismo conhecido que afete os iniciadores comumente utilizados no diagnóstico da SXF, diferente do que ocorre em outras síndromes nas quais pode ocorrer falha na detecção de um alelo se existir algum polimorfismo no local de anelamento do iniciador (HALLAHAN *et al.*, 2012).

Para analisar o gene FMR1 pela PCR, é realizada a amplificação de milhares de cópias de pedaços do gene na região que contém as repetições CGG. A precisão da PCR possibilita identificar as repetições que já estão expandidas e que descrevem a pré-mutação. Estas possuem um risco de aumentar nas gerações futuras e expandir-se em mutações completas (HALLAHAN *et al.*, 2012).

A primeira etapa da técnica de PCR é realizar a mistura de DNA genômico, Dntps, íons, um par de iniciadores (primers), tampão e taq polimerase. Depois a mistura passa por ciclos de desnaturação, anelamento e extensão que ocorrem em diferentes temperaturas. As sequências de DNA de interesse serão produzidas exponencialmente, pois a cada ciclo de produtos formados, os mesmos são utilizados pelos iniciadores na produção de novas sequências do DNA alvo no ciclo seguinte. Para diagnóstico específico da SXF, o DNA amplificado é separado por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelado por um intercalante de DNA como o brometo de etídio que permite a visualização e a análise dos tamanhos dos fragmentos gerados (HALLAHAN *et al.*, 2012).

Em homens a ausência de amplificação sugere mutação completa, diferente de indivíduos normais que tem a presença de amplificação. Mulheres normais podem apresentar um ou dois pedaços amplificados, dependendo se os dois cromossomos X apresentarem tamanhos próximos ou não, em mulheres com a suspeita de mutação completa é necessário que se faça outra técnica como a de sequenciamento, pois na PCR elas terão um único fragmento amplificado podendo confundir com o resultado obtido em pessoas sem mutação (HALLAHAN *et al.*, 2012).

É um método simples, específico e bastante sensível, porém é necessária a atenção na realização dos trabalhos para evitar contaminações cruzadas que podem inviabilizar os resultados (SHNTORCH *et al.*, 2012).

3.5 Sequenciamento

A técnica consiste em uma molécula de DNA que será alvo do sequenciamento e hibridado um único primer. Semelhante ao que ocorre na replicação do DNA, a enzima Taq DNA polimerase adiciona trinucleotídeos trifosfatados á extremidade 3' livre do primer e promove o alongamento do segmento, obedecendo ás regras de complementaridade de bases em relação á cadeia molde. Parte dos nucleotídeos utilizados na reação de polimerização são nucleotídeos que possuem a pentose com a extremidade 3' modificada e que não possui hidroxila, que bloqueiam a adição de um novo nucleotídeo na extremidade 3' após sua incorporação. Os nucleotídeos são marcados com substância fluorescentes de cores diferentes. As cadeias sintetizadas são separadas por eletroforese em gel de acrilamida ou em capilares de um analisador genético contendo um polímero especial submetido a campo elétrico. A cor dos fragmentos que migram no gel ou no polímero é identificado por um detector a laser presente no analisador genético que transforma os sinais em gráfico, sendo possível identificar a sequência de cores, ou seja, das bases nitrogenadas da cadeia complementar que foi utilizada como molde da reação de sequenciamento (SHNTORCH *et al.*, 2012).

A técnica de sequenciamento do DNA permite estudar de modo mais específico a estrutura de um determinado gene, identifica mutações de ponto e é confiável para homens e mulheres (SHNTORCH *et al.*, 2012).

Apesar de ser uma técnica específica e sensível é mais utilizada em pesquisas de genes devido seu alto custo de equipamento e material de consumo (SHNTORCH *et al.*, 2012).

3.6 MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*)

É uma técnica sensível, rápida e simples, capaz de quantificar relativamente o número de cópias, (mais de 50 sequências de ácidos nucleicos podem ser analisadas em uma mesma reação). Capaz de detectar deleções e duplicações de genes, além de mutações de ponto (SHNTORCH *et al.*, 2012).

O princípio da técnica é simples, uma amostra de DNA genômico é hibridizada com uma mistura de sondas, posteriormente é feita amplificação dos produtos de ligação por PCR, utilizando um par de primers universal. Os fragmentos finais são então separados e analisados em aparelho de eletroforese capilar, possibilitando a quantificação relativa de cópias gênicas (SHNTORCH *et al.*, 2012).

A análise pela técnica de MLPA é utilizada quando existem ocasiões em que o gene ou parte dele se encontra deletado ou duplicado. As técnicas de PCR e sequenciamento apresentam limitações na detecção da amplificação exclusiva do alelo normal ou na amplificação de vários alelos, um problema que o MLPA não possui, entretanto o MLPA é uma técnica de difícil padronização por possuir sondas muito sensíveis e exigir uma grande quantidade de DNA íntegro que requer um alto investimento em equipamentos e kits utilizados (SHEN & WU, 2009).

3.7 Vantagens e Desvantagens

Na tabela 1 são apresentadas as vantagens e desvantagens de cada técnica.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de métodos diagnóstico laboratoriais da SXF.

Método	Vantagens	Desvantagens
Cariótipo	Analisa os cromossomos, permitindo a identificação das estruturas, anormalidades estruturais e o sítio frágil.	Risco de resultado falso-negativo, não diferencia FRAXA de FRAXE, não detecta portadores, não identifica mutação pontual.
Southern Blotting	Permite o diagnóstico para homens e mulheres, incluindo portadoras.	Alto custo, requer grande quantidade de DNA de alta qualidade, indisponibilidade comercial de sondas.
PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	Resultado rápido, utiliza pequena amostra de DNA.	Confirmação apenas para SXF em homens, risco de resultado inconclusivo, risco alto de não detectar portadores, não identifica mutação pontual.
Sequenciamento	Identifica mutações de ponto, confiável para homens e mulheres.	Alto custo requer profissionais altamente qualificados.
MLPA (<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>)	Identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente, resultados rápidos.	Alto custo, requer DNA de alta qualidade, difícil padronização.

Adaptado ST EINER *et al.*, 2005.

Apesar da técnica padrão-ouro para o diagnóstico da SXF ser a PCR, a escolha adequada de cada técnica irá depender das características clínicas de cada paciente com suas vantagens e desvantagens (STEINER *et al.*, 2005).

Considerações Finais

Várias técnicas laboratoriais já foram desenvolvidas para o diagnóstico da Síndrome do X-frágil (SXF), mas os testes genéticos são os mais utilizados atualmente, principalmente a combinação de algumas delas com a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que é considerada padrão-ouro para diagnóstico desta síndrome. Com o uso desses testes foi possível identificar o gene mutado *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*), além da pré-mutação e da mutação completa contribuindo para o diagnóstico preciso da SXF.

Apesar do uso de testes genéticos tenha promovido um grande avanço no diagnóstico SXF, ainda existem barreiras de ordem econômica e técnica que dificultam o seu uso na rotina, dessa forma é importante que o clínico avalie a necessidade de cada paciente escolhendo assim a técnica com maior vantagem para cada caso.

Referências

- BECHARA, E.G.; DIDOT, M.C.; MEIKO, M.; DAVIDOVIC, L.; BENSALD, M.; MARTIN, P.; CASTETS, M.; POGNONEC, P.; KHANDJJAN, E.W.; MOINE, H.; BARDONI, B. A novel function for Fragile X mental retardation protein in translational activation. *Plos Biology*, vol. 7, n. 1, jan. 2009.
- BIACSI, R.; KUMARI, D.; USDIN, K. SIRT1 Inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome. *Plos Genetics*, vol. 4, n. 3, mar. 2008.
- GOMEZ, M., K., A. Estudos dos alelos da região 5'UTR no gene FMR1 (Fragile X Mental Retardation) em homens da população geral de Salvador-BA. Bahia. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal da Bahia. 2011.
- HAGERMAN, R.; HOEM, G.; HAGERMAN, P. Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. *Mol Autism*, v.1(1), p.12, 2010.
- HALLAHAN, P. B; DALY, M., E; SIMMONS, A; MOORE, C., J; MURPHY, K., C; AND MURPHY, D., D., C. Fragile X syndrome: a pilot proton magnetic resonance spectroscopy study in premutation carriers. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 4:23. 2012.
- HALL, S.S.; MAYNES, N.P.; REISS, A.L. Using percentile schedules to increase eye contact in children with fragile X syndrome. *Journal of applied behavior analysis*, vol. 42, n. 1, 2009.
- KHALIL, A.M.; FAGHIHI, M.A.; MODARRESI, F.; BROTHERS, S.P.; WAHLESTEDT, C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in Fragile X Syndrome. *Plos One*, vol.3, n. 1, jan.2008.
- KUMARI, D.; USDIN, K. The distribution of repressive histone modifications on silenced FMR1 alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, v.19 (23), p.4634-42, 2010.
- OOSTRA, B. A.; WILLEMSSEN, R. FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta*, v.1790(6), p.467-77, 2009.
- QUEIROZ, M. A. Avaliação de pré-mutação por PCR na síndrome do X- frágil. Florianópolis, 2006. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina.
- RUIZ, L.R., BORGARELLO, M.Q., AYTÉS, L.B., ESCODA, C.G. Fragile X syndrome: literature review and report of two cases. *Medicina Oral*, vol. 14, n. 9, set. 2009.



SHEN, Y.; WU, B.L. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J. Genet Genomics*, v.36(4), p. 257-65, 2009.

SHTORCH, A.; AMIEL, A.; PELES, L.; PRAS, E.; RIES-LEVAVI, L. Three peaks in the polymerase chain reaction fragile X analysis. *Journal of Medical Screening*. (19):3112-115. 2012.

STEGANI, F., C. Desafios na avaliação genético-molecular de pacientes com suspeita da síndrome do X-frágil atendidos na rede pública de saúde do estado de Goiás. Goiânia, 2011. [Dissertação de Mestrado]. Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

STEINER, C.E.; GUERREIRO, M.M.; MARQUES-DE-FARIA, A.P.; LOPES-CENDES, I. Laboratorial diagnosis of fragile-X syndrome: experience in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. *Arq Neuropsiquiatr*, v.63 (3A), p.564-70, 2005.

STOGER R.; GENEREUX D.P.; HAGERMAN R.J.; HAGERMAN P.J.; TASSONE F., et al. Testing the FMR1 Promoter for Mosaicism in DNA Methylation among CpG Sites, Strands, and Cells in FMR1-Expressing Males with Fragile X Syndrome. *Plos One*, 6(8):23648. 2011.

YIM, S.Y.; JEAN, B.H.; YANG, J.A.; KIM, H.J. Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. *J Korean Med Sci*, v.23 (3), p.470-6, 2008.