

SÍNDROME DO X FRÁGIL

Estudo caso-controle envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular

Raquel Boy¹, Patrícia Santana Correia², Juan Clinton Llerena³,
Maria do Carmo Machado-Ferreira⁴, Márcia Mattos Gonçalves Pimentel⁵

RESUMO - A síndrome do X frágil é a causa mais comum de retardo mental herdado; entretanto, é subdiagnosticada na população pediátrica. Objetivamos, neste estudo, determinar as características clínicas pré e pós-puberais mais significativas observadas entre indivíduos que apresentam a mutação no gene FMR-1, e que possam ser utilizadas como método de triagem dos pacientes que devem ser submetidos à análise molecular. A partir de protocolo clínico-laboratorial, foram analisados 104 indivíduos (92 do gênero masculino e 12 do feminino) portadores de retardo mental idiopático. 17 pacientes (14 do gênero masculino) apresentaram a mutação completa. História familiar de retardo mental e contato ocular pobre foram os achados que se mostraram associados, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), aos pacientes com a síndrome do X frágil em idade pré e pós-puberal. Os pacientes em idade pós-puberal também diferiram dos controles em relação à presença de orelhas grandes, fronte proeminente e macroorquidismo.

PALAVRAS-CHAVE: síndrome do X frágil, retardo mental, FMR-1.

Fragile X syndrome confirmed by molecular analysis: a case-control study with pre and post-puberal patients

ABSTRACT - The fragile X syndrome (FRAXA) is the most common cause of inherited mental retardation. However, it has been frequently underdiagnosed in pediatric population. The characterization of the most significant pre and post-puberal clinical features observed among patients that are positive for the FMR-1 mutation, is useful as a screening tool for ordering the DNA test. Therefore, a screening program for FRAXA has been conducted in a sample of 104 mentally retarded individuals (92 males and 12 females), comprehending familial history and physical examination in order to determine the clinical characteristics. The molecular test for the disease was performed in all individuals. Seventeen patients (14 males) were positive for the FMR-1 mutation. Familial mental retardation and poor eye contact were the most common clinical findings with statistical significance ($p < 0.05$) in FRAXA pre and post-puberal patients. The post-puberal patients presented, as opposed to the control group, large ears, broad forehead and macroorchidism.

KEY WORDS: fragile X syndrome, mental retardation, FMR-1.

A síndrome do X frágil é a causa mais frequente de retardo mental herdado, com uma incidência estimada de 1/4.000 em homens e 1/6.000 em mulheres¹, e, é causada por uma expansão de trinucleotídeos CGG no primeiro exon do gene *FMR-1*, localizado na região Xq27.3 no cromossomo X. A clonagem desse gene em 1991²⁻⁴ propiciou o diagnóstico molecular acurado⁵. Indivíduos afetados

apresentam acima de 200 repetições da sequência CGG, sendo chamados de portadores da mutação completa². Esta expansão é acompanhada por hipermetilação anormal da ilha CpG, resultando em silenciamento da transcrição e ausência da proteína FMRP⁶. Na população normal, o número de repetições CGG é polimórfico e varia de 6-54⁷. Indivíduos, fenotipicamente normais, que apresentam repeti-

¹Mestre em Ciências Focruz, Geneticista clínica – SERGEN – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). ²Geneticista clínica - SERGEN - UERJ; ³Doutora em Ciências UFRJ, Geneticista clínico, IFF - Fiocruz; ⁴Mestre em Biociências Nucleares, Professor Assistente do IBRAG – UERJ; ⁵Doutora em Genética Humana, Professora Adjunto do IBRAG – UERJ. Apoio da FAPERJ, UERJ/SR-3, CEPUERJ.

Recebido 28 Abril 2000, recebido na forma final 17 outubro 2000. Aceito 20 Outubro 2000.

Dra. Raquel Boy - Praia do Botafogo 528 Bloco B Apto 1202 - 22250-040 Rio de Janeiro RJ - Brasil.

ções CGG entre 55-200 unidades são chamados de portadores da pré-mutação.

O fenótipo associado à síndrome do X frágil na população masculina adulta está bem determinado, sendo utilizados sistemas de pontuação clínica na triagem diagnóstica^{8,9}. No entanto, em função de sua variabilidade fenotípica, esta doença é subdiagnosticada na população pediátrica^{10,11}. Desta forma, torna-se importante definir critérios clínicos para identificar os indivíduos que devam ser selecionados para efetuar os estudos diagnósticos específicos¹².

Objetivamos, neste estudo, determinar as características clínicas pré-puberis e pós-puberis mais significativas entre indivíduos portadores da síndrome do X frágil confirmada por diagnóstico molecular, em relação a indivíduos portadores de retardo mental cujo estudo molecular foi negativo para a síndrome do X frágil.

MÉTODO

Rastreamento clínico e molecular da síndrome do X frágil foi realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em um grupo de indivíduos com retardo mental idiopático; assim denominados, após terem sido submetidos a investigação clínico-laboratorial compreendida por exame morfológico segundo critérios estabelecidos por Jones¹³, estudo citogenético com protocolos padronizados de cultura celular para sangue periférico¹⁴⁻¹⁶, e triagem plasmática e urinária para erros inatos do metabolismo, nos quais o diagnóstico etiológico não fora definido.

A amostra de investigação compreendeu 104 indivíduos, 92 do gênero masculino (53 pré-puberis, 39 pós-puberis) e 12 do feminino (pós-puberis), faixa etária de 2 a 33 anos (média 13,4 anos).

A triagem clínica foi realizada por geneticistas no ambulatório de Genética Médica do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, com o preenchimento de respectivo questionário de avaliação que abrangia dados genealógicos, clínicos e antropométricos (Quadro). O protocolo clínico empregado foi elaborado a partir de revisão bibliográfica e experiência pessoal sobre os sinais mais frequentemente observados nessa síndrome, de fácil avaliação no exame clínico. O diagnóstico de distúrbio de comportamento/autismo foi realizado pelo médico de origem do paciente, habitualmente, nesses casos, neurologista e/ou psiquiatra. Os valores obtidos na aferição de perímetro cefálico foram dispostos em gráfico elaborado por Marcondes et al.¹⁷, sendo considerado macrocefálico valores > 2DS. As medidas de orelhas foram baseadas em tabelas preconizadas por Feingold & Bossert¹⁸, respectivamente. O volume testicular foi aferido com o uso de orquímetro de Prader, sendo considerado macroorquidismo as aferições que superavam os valores normais para a idade.

Quadro 1. Questionário empregado na avaliação clínica.

UERJ - SERVOGEN - Ambulatório de Genética Clínica
Estudo Clínico e molecular da Síndrome do X-Frágil

Nome _____ Reg _____ DN ____/____/____

Nome do Pai _____

Nome da Mãe _____

Endereço _____ Tel. _____

Data da Avaliação ____/____/____

Origem _____ Médico Avaliador _____

Hist. Familiar de Retardo Mental () Sim () Não

Heredograma

# Exame Clínico	# Anormalidades Neurológicas
() RM	() Convulsões
() Per. cefálico aumentado __percentil	() hiperatividade
() Face alongada	() contato ocular pobre
() Orelhas grandes	() defensivo ao tato
() Fronte proeminente	() mov estereotipado mãos
() Mandíbula proeminente	() dist. psiquiátrico _____
() Pectus excavatum	() fala rápida/repetitiva
() Flacidez ligamentar	() atraso na fala
() Macroorquidismo	() comportamento autista
() Prega única palmar/Sidney	
() Pés planos	
() Outros _____	

DNA Data ____/____/____ Fragmento CGG _____

GTG Data ____/____/____ _____

Os pacientes investigados foram classificados em pré e pós-puberis de acordo com a presença de sinais físicos de puberdade.

A característica retardo mental não foi utilizada como parâmetro comparatório visto que todos os indivíduos avaliados (pré e pós-puberis) apresentavam algum grau de retardo, sendo a principal característica clínica de encaminhamento destes indivíduos.

Realizamos o exame de DNA em 104 indivíduos. Na análise molecular, o método adotado foi o da dupla digestão do DNA genômico com as enzimas EcoRI e EagI

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes pré-puberais

Características clínicas	FRAXA positivos	FRAXA negativos	Yates χ^2 b	p valor ^c
	%(n/n)	%(n/n)		
	%positivo (#positivos/ntotal) a			
RM familiar ^d	100 (4/4)	22,4(11/49)	7,47	0,0062
Contato ocular pobre	100 (4/4)	30,6 (15/49)	5,02	0,025
Orelhas grandes	100 (4/4)	38,8(19/49)	3,43	0,064
Flacidez ligamentar	100 (4/4)	40,8(20/49)	3,11	0,078
Defensivo ao tato	75 (3/4)	32,7(16/49)	1,34	0,247
Estereotipias de mãos	50 (2/4)	30,6(15/49)	0,06	0,800
Per. cefálico aumentado ^e	25 (1/4)	26,5(13/49)	0,27	0,600
Face alongada	25(1/4)	34,7(17/49)	0,02	0,876
Fronte proeminente	25(1/4)	10,2(5/49)	0,01	0,938
Palato alto	25 (1/4)	24,5(12/49)	0,34	0,560
Pés planos	25(1/4)	32,7(16/49)	0,06	0,808
Transtornos linguagem	100(4/4)	65(32/49)	0,76	0,383
Macroorquidismo	0(0/4)	2(1/49)	2,63	0,104
Dist,comportamento	0 (0/4)	57,1(38/49)	2,82	0,092
Autismo	0 (0/4)	43,8(21/49)	1,33	0,248
Convulsões	25 (1/4)	12,2(6/49)	0	0,965

^aNúmero de pacientes com as características positivas/número total de pacientes de cada categoria; ^bTeste do qui-quadrado corrigido para pequenas amostras; ^cp valor<0.05 - considerado estatisticamente significativo; ^dretardo mental familiar; ^eperímetro cefálico aumentado.

seguido de *Southern blot* e hibridação com a sonda StB12.3 marcada radioativamente com α^{32} PdCTP, específica para a identificação de amplificação de seqüências de trinucleotídeos no gene FMR1, responsável pelo retardo mental FRAXA¹⁹.

Tendo em vista a análise comparativa dos dados, foram discriminados e comparados em tabelas 2x2 os principais dados clínicos e genealógicos entre 2 grupos distintos de pacientes do sexo masculino – pré e pós-puberais: o grupo de pacientes com características pré-puberais cujo estudo molecular foi positivo em relação aos indivíduos pré-puberais cujo estudo foi negativo; e o grupo de pacientes pós-puberais com estudo molecular positivo comparando-os com os indivíduos pré-puberais cujo estudo foi negativo.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o pacote de programas do EPI-Info v.6.0. Os dados foram apresentados como proporções ou percentagens com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças entre os grupos (pré e pós-puberais, positivos e negativos no estudo molecular) foram avaliadas com o teste do χ^2 com correção de Yates, considerando como significante um $p < 0,05$.

RESULTADOS

A mutação completa foi observada em 17 pacientes (16,3%), 14 homens e 3 mulheres, distribuídos em 8 famílias; sendo, nos indivíduos do gênero masculino, observada em 4 dos 53 pacientes pré-puberais triados (4/53), e em 10 dentre os 39 pós-puberais (10/39).

A faixa etária dos pacientes pré-puberais variou de 7 a 12 anos (média de 9,1 anos) e a dos pacientes pós-puberais de 12 a 27 anos (média 18,8 anos).

Os achados clínicos/genealógicos de todos os pacientes estudados encontram-se subdivididos em 2 grupos de comparação: pré e pós-puberais – Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Dentre os indivíduos pré-puberais positivos para a síndrome do X frágil, os itens avaliados que apresentaram significância estatística foram: história familiar de retardo mental e contato ocular pobre (Tabela 1).

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes pós-puberais.

Características clínicas	FRAXA positivos	FRAXA negativos	Yates χ^{2b}	p valor ^c
	%(n/n)	%(n/n)		
	%positivo (#positivos/ntotal) ^a			
Rmfamiliar ^d	90 (9/10)	44,8(13/29)	4,47	0,033
Orelhas grandes	90(9/10)	34,5(10/29)	7,09	0,0077
Flacidez ligamentar	70 (7/10)	41,4(12/29)	1,43	0,232
Contato ocular pobre	100(10/10)	58,6(17/29)	4,19	0,041
Defensivo ao tato	30(3/10)	20,7(6/29)	0,03	0,867
Estereotipias de mãos	40 (4/10)	24,1(7/29)	0,31	0,579
Per.cefálico aumentado ^e	60 (6/10)	35,7(10/49)	1,09	0,297
Face alongada	100(10/10)	65,5(19/29)	3,01	0,083
Fronte proeminente	80(8/10)	27,6(8/29)	6,42	0,011
Palato alto	60(6/10)	42,9(12/29)	0,42	0,515
Pés planos	0 (0/10)	13,8(4/29)	0,4	0,525
Transtornos linguagem	66,7(6/9)	34,5(10/29)	1,75	0,186
Macroorquidismo	80 (8/10)	34,5(10/29)	4,50	0,033
Dist,comportamento	0(0/10)	31,0(9/29)	2,48	0,115
Autismo	0(0/10)	17,2(5/29)	0,74	0,390
Convulsões	20(2/10)	31(9/29)	0,07	0,793

^aNúmero de pacientes com as características positivas/número total de pacientes de cada categoria; ^bTeste do qui-quadrado corrigido para pequenas amostras; ^cp valor<0,05 - considerado estatisticamente significativo; ^dretardo mental familiar; ^eperímetro cefálico aumentado.

No grupo de pacientes pós-puberais 5 itens mostraram significado estatístico: a ocorrência de retardo mental familiar, orelhas grandes, contato ocular pobre, fronte proeminente e macroorquidismo (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Estudos acerca da pré-seleção clínica dos indivíduos portadores de retardo mental para a investigação molecular da síndrome do X frágil, têm mostrado aumento na positividade do teste. A partir da utilização de *checklists* distintos, diferentes taxas de detecção têm sido observadas^{20,21}.

Nos pacientes pré-puberais com diagnóstico molecular da síndrome do X frágil, observamos, apesar da pequena amostra, dois sinais clínicos com significância estatística quando comparados com aqueles observados nos pacientes cuja análise molecular foi negativa:

1-História familiar de retardo mental – o relato de casos familiares de retardo mental compatíveis

com herança ligada ao cromossomo X foi observado em 100% dos pacientes com a síndrome do X frágil. Este padrão de segregação, único para uma condição ligada ao cromossomo X, conforme ilustrado na Figura 1, torna obrigatória a triagem dos familiares. A ocorrência de retardo mental em diversos graus é devida a inativação da transcrição do gene FMR-1, expressado, de forma variável, nos tecidos fetais e adultos, especialmente no cérebro (hipocampo e camada granular do cerebelo) e testículos²² nos pacientes do gênero masculino. O estudo molecular estendeu-se às famílias dos pacientes portadores da mutação completa, sendo detectados até o momento, 9 mulheres pré-mutadas, e 1 mutada não portadora de retardo mental. Nesta última justificado pelo padrão preferencial de inativação do cromossomo X mutado²³.

2-Contato ocular pobre – definido como desviar os olhos ao olhar do examinador também foi observado em todos os pacientes portadores da síndrome. Defensividade ao tato do examinador e estereo-

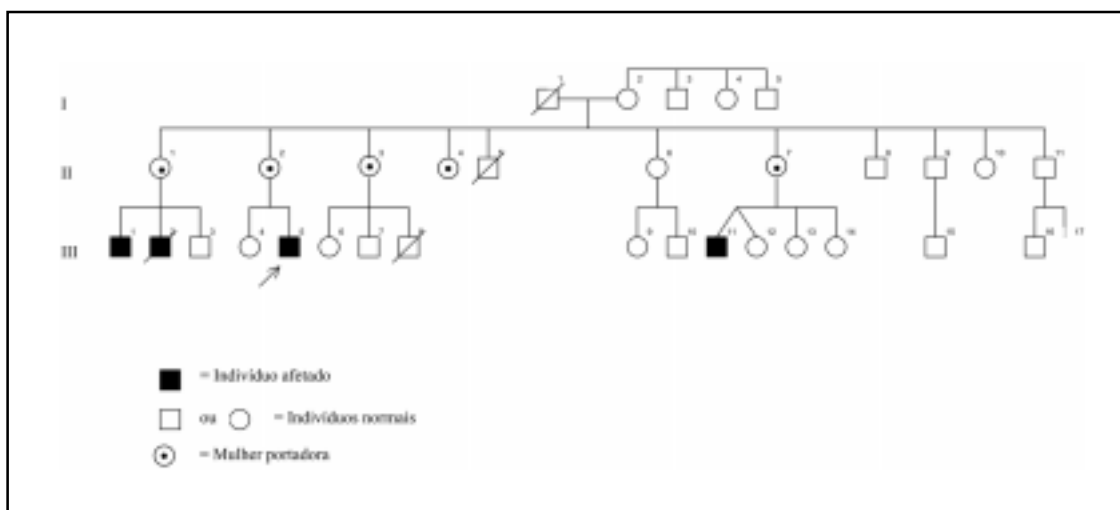


Fig 1. Heredograma mostrando a segregação da mutação no loco FRAXA em uma genealogia.

tipias de mãos também foram observados em percentuais altos, e são achados comportamentais sem definição etiopatogênica^{24,25}.

Em 100% destes pacientes foram observados também a ocorrência de orelhas grandes, flacidez ligamentar e transtornos de linguagem, que, apesar de terem sido também observadas em percentuais menores no grupo controle (Tabela 1), poderão ser utilizados como auxílio no reconhecimento clínico.

Os achados clínicos observados nos pacientes pós-puberis neste estudo muito se assemelham ao fenótipo característico descrito na população adulta portadora da síndrome do X frágil: história familiar de retardo mental, orelhas grandes, fronte proeminente (Fig. 2), contato ocular pobre e macroorquidismo foram observados nestes pacientes com significância estatística (Tabela 2). Face alongada e flacidez ligamentar também foram observados na maioria destes.

Transtornos de linguagem como fala rápida/repetitiva nos pacientes pós-puberis e atraso/dificuldade na fala nos pacientes pré-puberis, conhecidos nos portadores da síndrome do X frágil, foram observados em percentuais altos (60 e 100%, respectivamente), no entanto sem diferença estatisticamente significativa quando comparada aos grupos com teste molecular negativo. Alterações no desenvolvimento da linguagem e fala são descritas em outras patologias, como na síndrome de Down e no autismo; no entanto, a complexidade estrutural da elocução nos portadores da síndrome do X frágil parece ser semelhante ao observado em crianças normais²⁴.

Não observamos positividade dentre os pacientes triados por autismo (21/53) e distúrbio de compor-

tamento (28/53). A frequência de autismo na síndrome do X frágil é bastante variável^{24,25} e, a associação de X frágil com autismo confunde-se pelo comportamento autista apresentado por muitos daqueles pacientes²⁶, em que estereotípias de mãos são descritas e foram observadas em 50% dos pré-puberis com exame molecular positivo. Além do mais, os critérios diagnósticos de autismo não são uniformes, podendo ocorrer um falso índice diagnóstico elevado. De qualquer forma, justifica-se a triagem molecular na população de autistas, tendo-se em mente a baixa prevalência da mutação FRAXA nesta população. Para pesquisas futuras, solicitaremos aos psiquiatras e neurologistas, a utilização da Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID 10²⁷ no ato do encaminhamento para diagnóstico molecular.

Apesar de não termos observado macroorquidismo nessa amostra de pacientes pré-puberis, esse



Fig 2. Pacientes portadores da Síndrome do X frágil onde são observados frente ampla, face alongada e orelhas grandes.

achado não é exclusivo (e nem obrigatório na idade adulta), podendo ser observado mais raramente em crianças de idade variável. Estudos histopatológicos testiculares de pacientes portadores da síndrome do X Frágil mostram aumento de colágeno e edema²².

Nossos dados são consistentes com estudos previamente conduzidos em relação à variabilidade de características físicas e comportamentais de portadores da síndrome do X frágil^{12,21}. Certamente, a ausência de marcadores clínicos patognomônicos limitam o potencial de um único *checklist* para o rastreamento da síndrome do X frágil, sendo recomendada a aplicação do teste molecular em todos os meninos com retardo mental de etiologia não identificada²⁸. No entanto, chamamos atenção para a validade dos diversos *checklists* já publicados, como um instrumento de rastreamento passível de modificações e adaptações com o objetivo de sinalizar indicadores de risco, de forma eficiente e custo-efetiva^{21,28,29}. Salientamos que o conhecimento destas características auxiliará profissionais de saúde ainda pouco familiarizados com a síndrome do X frágil na sua suspeição clínica e no pronto encaminhamento para centros de diagnóstico e aconselhamento genético.

Por fim, enfatizamos a importância de identificar indivíduos com a síndrome do X frágil^{19,29}, que se reflete em várias áreas. O diagnóstico acurado pode aliviar a incerteza e a angústia dos pais em relação à causa da deficiência. Mesmo na ausência de tratamento específico, o diagnóstico precoce provê oportunidade para intervenção educacional e terapêutica precoces. A identificação de indivíduos afetados é importante para o aconselhamento genético familiar de membros sob risco de serem portadores da pré-mutação, considerando medidas de prevenção secundária (diagnóstico pré-natal). E, em termos de saúde pública, tem-se demonstrado a diminuição de custos institucionais²⁵ e, com o aconselhamento genético, a conseqüente queda na incidência da doença³⁰.

Agradecimentos - Ao Dr. Jean Louis Mandel (INSERM/França) que gentilmente nos cedeu a sonda StB12.3. Ao Dr. Pedro H. Cabello, pesquisador titular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, pela revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64:196-197.
- Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991;252:1097-1102.
- Verkerk AJMII, de Graff E, de Boule K, et al. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* 1993;2:399-404.
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;252:1179-1181.
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991;325:1673-1681.
- Verheij C, Bak CE, de Graaff E, et al. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 1993;722-724.
- Fu YH, Kohl DPA, Pizzuti A, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability; resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991;67:1047-1058.
- Laing S, Partington M, Robinson H, et al. Clinical screening score for the fragile X (Martin-Bell) syndrome. *Am J Med Genet* 1991;38:256-259.
- Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A. Fragile X screening program in New York State. *Am J Med Genet* 1991;38:283-287.
- Fryns JP. X linked mental retardation and the fragile X syndrome: a clinical approach. In Davies KE (ed). *The fragile X syndrome*. Oxford. Oxford Univ Press, 1989: 1-39.
- Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2253 cases. *Am J Hum Genet* 1994;55:225-237.
- Torrado MDV, Chertkoff L, Herrera J, Bin L, Barreiro C, Tenenbaum S. Validación de un puntaje clínico para la detección del síndrome de sitio frágil del X. *J Pediatr (Rio)* 1997;73 (Suppl):61-68.
- Jones K L. Smith's recognizable patterns of human malformation. 4Ed. Philadelphia: Saunders, 1998.
- Bender MA. Methods in human cytogenetics. *Arq. Bras Endocrinol Metab* 1965, 14:47-72.
- Moorhead PS, Nowel PC, Mellman WJ. Chromosome preparation of leukocytes cultures from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-616.
- Seabright, M. A rapid banding technique from human chromosomes. *Lancet* 1971;2:971-972.
- Marcondes E, Berquó E, Regg R, Colli A, Zacchi MAS. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiros: I. Metodologia. São Paulo: Editora Brasileira de Ciências, 1982.
- Feingold M, Bossert WH. Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation. *The National Foundation March of Dimes* 1974;BD:OASX,13:1-17.
- Pimentel MMG, Hemery AP, Boy, et al. Retardo mental e FRAXA: projeto piloto de investigação molecular na UERJ. *Genet Mol Biol* 1998;21 (Suppl):320.
- De Vries BBA, van den Ouwelan AMW, Mohkaamsing S, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. *Am J Hum Genet* 1997;61:660-667.
- Giangreco C, Steele M, Aston C, Cumins J, Wenger S. A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J Pediatr* 1996;611-614.
- Nelson D I. *The fragile X mental retardation*. Shaw DJ. Edinburgh: John Wiley & Sons, 1995:91-116.
- Mingroni-Netto RC, Pavanello RCM, Otto PA, Vianna-Morgante AM. Experience with molecular and cytogenetic diagnosis fo fragile X syndrome in Brazilian families. *Braz J Genet* 1997;20:731-739.
- Fisch SG. What is associated with the fragile X syndrome?. *Am J Med Genet* 1993;48:112-121.
- Hagerman RJ, Wilson P, Staley LW, et al. Evaluation of School children at high risk for fragile X syndrome utilizing buccal cell FMR-1 testing. *Am J Med Genet* 1994;51:474-481.
- Maes B, Fryns JP, Van Walleggem M, Van Den Berghe H. Fragile X syndrome and autism: a prevalent association or misinterpreted connection?. *Am J Med Genet* 1994;51:606-614.
- OMS: CID-10 – Classificação de transtornos mentais de comportamento da CID 10: Critérios diagnósticos para pesquisa. Porto Alegre: Artes Médicas Editora, 1998.
- Lachiewicz A M, Dawson DV, Spiridigliozzi GA. Physical characteristics of young boys with fragile X syndrome: reasons for difficulties in making a diagnosis in young males. *Am J Med Genet* 2000;92:229-236;
- Mazocco MMM, Myers GF, Hamner JL, Panoscha R, Shapiro BK, Reiss AL. The prevalence of FMR1 and FMR2 mutations among preschool children with language delay. *J Pediatr* 1998;132:795-801.
- Robinson H, Wake S, Wright F, Laing S, Turner G: Informed choice in fragile X syndrome and its effects on prevalence. *Am J Med Genet* 1996;64:198-202.