

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Daniela Alves de Faria

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO PROCESSO DE EXPRESSÃO
GÊNICA NA SÍNDROME DO X FRÁGIL**

São Paulo

2024

Daniela Alves de Faria - SPGR011051

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO PROCESSO DE EXPRESSÃO GENICA
NA SÍNDROME DO X FRÁGIL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina do
Centro Universitário São Camilo,
orientado pelo Mestre Rodrigo Vela,
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2024

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Faria, Daniela Alves de

Alterações epigenéticas no processo de expressão genica na síndrome do X frágil / Daniela Alves de Faria. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2024.

36 p.

Orientação de Rodrigo Vela.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2024.

1. Epigenômica 2. Expressão gênica 3. Genes 4. Síndrome do cromossomo X frágil I. Vela, Rodrigo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 575.1

Daniela Alves de Faria

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO PROCESSO DE EXPRESSÃO GENICA
NA SÍNDROME DO X FRÁGIL**

São Paulo,

Professor Orientador Rodrigo Vela

Professor Examinador

Agradecimentos

Sou muito grata pelo processo todo de obstáculos, desafios, tristezas e alegrias que passei ao decorrer desta graduação. Acredito que tudo ocorreu de forma a ajudar no meu crescimento e formação como pessoa, no meu tempo e somando muitas experiências enriquecedoras.

Agradeço imensamente o suporte e ajuda dos meus pais.

Meu Zucker pelo apoio emocional.

Pelos amigos Giovanna Martins, Kelwin Borba e Rafael Martins, que a faculdade me concedeu e que me ajudaram não só academicamente, mas com conselhos e companheirismo incríveis.

Ao amigo Daniel que me proporcionou histórias maravilhosas, as estagiárias que me deram muita noção sobre trabalho e ao estágio obrigatório que me ajudou a ter certeza do que eu quero para a vida.

Agradeço a minha resiliência, esforço, trabalho árduo e muita esperança para a resolução e término deste curso de graduação e trabalho de conclusão de curso.

Sou imensamente feliz por toda a trajetória até aqui e os inúmeros aprendizados que a persistência me trouxe.

RESUMO

A epigenética mostra a relação entre a expressão gênica e fenômenos do DNA, não relacionados a alteração das sequências de nucleotídeos. A síndrome do X frágil é uma doença rara, sem cura e causada por mutação, afeta um a cada quatro mil homens e oito mil mulheres. As alterações se encontram no gene FMR1 do cromossomo X, que possui um sítio propenso a quebra próximo ao telômero do braço longo, também apresenta aumento de repetições citosina guanina (CGG) e hipermetilação, esse conjunto de fatores provoca o silenciamento da proteína sintetizada, a chamada FMRP e prejuízo as sinopses, explicando os sintomas de atraso no desenvolvimento intelectual e neuropsicomotor. O número de cópias do gene nos portadores é superior a 200 e os sintomas são mais severos em homens, por possuírem somente uma cópia do cromossomo. A relação da epigenética com a síndrome se dá por meio dos mecanismos epigenéticos do gene, como: metilação do DNA, modificação de histonas e os RNAs não codificantes, que agem como fator para que o gene FMR1 seja silenciado e não sintetize sua proteína, e coincidentemente os sinais clínicos mentais característicos. O diagnóstico mais preciso depende da combinação de técnicas de PCR e Southern Blot. Tratamento é feito por múltiplas frentes, sendo educacional, medicamentoso, terapêutico e social e requer acompanhamento e apoio para inclusão dos pacientes e maior qualidade de vida

Palavras-chave: Síndrome do x frágil; Alterações genéticas; Genes; Epigenética; Expressão gênica.

ABSTRACT

Epigenetics is about the link between gene expression and DNA phenomena, with does not cause changes in the nucleotides sequence. Fragile X syndrome is a rare disease, it's is caused by mutation and that is no cure, afflicting one in four thousand men and eight thousand women. The mutation are found in the FMR1 gene on the x chromosome, which has an easily breakable spot close to the telomere of the long arm, with also has increase of the cytosine guanine (CGG) repeats and hypermethylation, those set of factors induce the silencing of the synthesized protein, named FMRP, and that results in damage of synapses, explaining the symptoms of delay in intellectual and neuropsychomotor development. The number of copies in the sequence in the gene is more than 200 and the symptoms are more severe in men, because they have only one copy of the chromosome. The relationship between epigenetics and the syndrome is through the gene's epigenetic mechanisms, such as: DNA methylation, histone modification and non-coding RNAs, which act as a factor for the FMR1 gene to be silenced and not synthesize its protein, and coincidentally the characteristic mental clinical signs. The most accurate diagnosis depends on the combination of PCR and southern blot techniques. Treatment is carried out on multiple fronts, including educational, medication, therapeutic and social and requires monitoring and support for patient inclusion and improved quality of life.

Key words: fragile x syndrome; Genetic modifications; Genes; Epigenetics; Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Heredogramas da Síndrome do X Frágil, 18

Figura 2: Sintomas físicos da síndrome, 18

Figura 3: Cromossomo X normal e de portador da síndrome, 19

Figura 4: Erro da síntese proteica, 19

Figura 5: Vias de metilação e desmetilação do DNA, 21

Figura 6: Modificação de histonas, primeiramente em estado de repressão transcricional, 23

Figura 7: Rna não codificante, 24

Figura 8: PCR para detecção do X frágil, 25

Figura 9: Processo da reação do PCR, 26

Figura 10: Resultado de Southern Blot para paciente com síndrome do X frágil, 27

Figura 11: Processo do Southern Blot, 27

Figura 12: Eletroferogramas para a sequência CGG por qPCR, 28

LISTA DE ABREVIACÕES

5'UTR	Untranslated region 5'
5mC	5-metilcitosina
AMPA e NMDA	Receptores ionotrópicos
CGG	Citosina e guanina
CPG	Citosina e guanina separadas por um grupo fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EcoR1	Enzima de restrição proveniente da Escherichia coli
FMR1	Fragile X mental retardation gene 1
FMRP	Fragile X mental retardation protein
FXTAS	Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil
GABA	Ácido γ-aminobutírico
H3K4	Sítio que sofre metilação e desmetilação no gene FRM1
Hind 3	Enzima de restrição proveniente do Haemophilus influenzae
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
lncRNA	RNA longo não codificante
MeCP2	Proteína de ligação methyl CpG (MBD)
MGLUR5	Receptor metabotrópico de glutamato 5
miRNA	MicroRNA
ncRNAs	RNA não codificadores de proteínas
NCRNAS	RNAs não codificadores
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico (rRNA)
SXF	Síndrome do X Frágil
TDAH	Ansiedade, transtorno de hiperatividade
TEA	Transtorno do aspecto autista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	16
2.1. GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. METODOLOGIA	17
4. DESENVOLVIMENTO	18
4.1 SÍNDROME DO X FRÁGIL E FISIOPATOLOGIA	18
4.2 EPIGENÉTICA DA SXF E MECANISMOS	21
4.3 DIAGNÓSTICO DA SXF	25
4.4 TRATAMENTO E EPIDEMIOLOGIA	29
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Descoberta em 1943 pelos pesquisadores Martin e Bell, mas nomeada somente em 1960 pelo Dr. Herbert Lubs, em razão da sua aparência, por um sítio propenso a quebra próximo ao telômero do braço longo, a síndrome do X frágil é uma anomalia genética dominante que acomete o cromossomo X e causa um déficit no desenvolvimento intelectual e comportamental, sendo o primeiro lugar como causadora de deficiência intelectual ligada à hereditariedade e segundo como causa mais frequente do mesmo acometimento genético. Afetando cerca de 1 em cada 4.000 homens e 1 a cada 6.000 mulheres, o gene responsável pela síndrome foi descoberto somente em 1991 e corresponde ao FMR1, que se localiza no braço longo do cromossomo. Tal alteração afeta o número de cópias dos nucleotídeos neste gene e conseqüentemente, a síntese de proteínas decorrente (KIMURA, SILVERIO; CAMPAROTO, 2022; SITZMANN et al., 2018; GENOMIC, 2022).

Como afeta a síntese proteica, o erro está presente na molécula de DNA, que é composta por duas fitas pareadas, uma em sentido 5' → 3' e outra inversa e complementar, unidas por ligações de hidrogênio entre os nucleotídeos de cada fita, sendo que cada um deles é composto por um grupo fosfato, uma pentose e bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C), que fazem ligações A-T e G-C. O processo de expressão gênica é feito utilizando essas informações contidas no gene, sendo que para tal é necessário ocorrer a transcrição e tradução, à qual resulta em proteínas. Essa sequência de produção: DNA → transcrição = RNA → tradução = Proteínas é conhecida como dogma central da biologia molecular (MENCK, 2017; RIBEIRO, 2020).

Mecanismos como a modificação de histonas, metilação do DNA e a ação de RNAs não codificadores (ncRNAs) são parte do ciclo celular, sendo assim a epigenética versa sobre os fatores que as afetam, de modo reversível e hereditário, mas que não alteram a sequência de nucleotídeos. Tanto as modificações das histonas, como a metilação, acetilação, remodelagem da cromatina e os ncRNAs acontecem com o propósito de manutenção e regulação da expressão, transcrição, recombinação e replicação dos genes, também na sinalização, diferenciação celular

e silenciamento de elementos repetitivos do genoma (MENCK, 2017; KUEHNER et al., 2019).

Essas alterações na expressão gênica podem induzir mutações, sendo alterações no DNA promovidas por causas internas ou externas. Um exemplo de doença por mutações é a síndrome do X frágil, que, por alteração do gene FMR1 no cromossomo X (fragile X mental retardation gene 1), juntamente ao aumento do número de repetições citosina e guanina (CGG) e a hipermetilação anormal da ilha CpG, resultando em silenciamento da transcrição do gene e a não expressão e ausência da proteína FMRP, no sistema nervoso, cuja função principal é a regulação e transporte do RNA nas sinapses, também regulação da tradução de mGluR5 (receptores de glutamato metabotrópicos) em trocitos e a produção de mielina nos oligodendrócitos (FLEURY, 2024; ACERO-GARCÉS et al., 2023).

Normalmente encontram-se de 6 a 50 cópias da trinca CGG na região gênica do cromossomo X, relacionada à síndrome, em indivíduos normais. Na síndrome em questão, há mais de 200 repetições da mesma sequência. Os indivíduos com 55 a 200 cópias estão na faixa intermediária, a pré-mutação, que geralmente não manifestam problemas cognitivos ou comportamentais, mas podem transmitir às proles um número de repetições superior a 200, com sintomas atenuados nas mulheres e mais marcantes no sexo masculino. Aqueles com cópias entre 45 a 54 possuem baixo risco e os indivíduos normais, têm até 45 cópias (DB MOLECULAR, 2024; HAGERMAN; HAGERMAN, 2021).

As mulheres com a Síndrome são menos afetadas pelos sintomas que os homens, por possuírem dois cromossomos X enquanto os homens têm apenas um. Também são os homens que transmitem a pré-mutação para todas as suas filhas, mas para nenhum de seus filhos, já as mulheres portadoras terão filhos que, independente de gênero, têm 50% de chance de herdar o gene alterado, pois sempre vão receber um cromossomo X da mãe (SPECTOR et al, 2021).

Os sintomas podem ser físicos, intelectuais e comportamentais, como hiperatividade, dificuldade na interação social, timidez, ansiedade, movimentos

estereotipados de mãos, atraso e déficits no desenvolvimento neuropsicomotor (aprendizagem, fala, atenção, cognição e emoções). Também características físicas recorrentes como face alongada, orelhas grandes, músculos flácidos, articulações mais flexíveis que o normal, sola dos pés mais achatadas, escoliose, mandíbula projetada para frente, alterações oculares (estrabismo e miopia) e aumento do volume dos testículos após a puberdade (MARTINS et al., 2020; SPECTOR et al., 2021;).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Demonstrar os efeitos epigenéticos sobre a expressão gênica na Síndrome do X Frágil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a Síndrome do X Frágil, suas características, epidemiologia, genética, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento
- Demonstrar como a alteração genética interfere na expressão fenotípica
- Caracterizar a epigenética e seus mecanismos (metilação, modificação de histonas e RNAs não codificantes)
- Demonstrar a interação entre epigenética e a Síndrome do X Frágil.

3. METODOLOGIA

Levantamento bibliográfico em bases de dados e bibliotecas científicas, sintetizando, analisando e discutindo as informações mais relevantes sobre o processo de expressão gênica e as alterações epigenéticas que ocorrem para o desenvolvimento da síndrome do x frágil. Foi realizada uma revisão narrativa da literatura sobre: "As alterações epigenéticas envolvidas na síndrome do x frágil". Para a seleção de textos foram utilizadas as bases de dados, como: Pubmed, Scientific Electronic Library Online (SciELO), Google Scholar e também o acervo de livros da biblioteca central do campus Ipiranga Padre Inocente Radrizzani. A pesquisa abrangeu 43 estudos que constituíam análises genéticas com foco em síndrome do x frágil, sendo publicados entre os anos de 2017 e 2024, nos idiomas português e inglês.

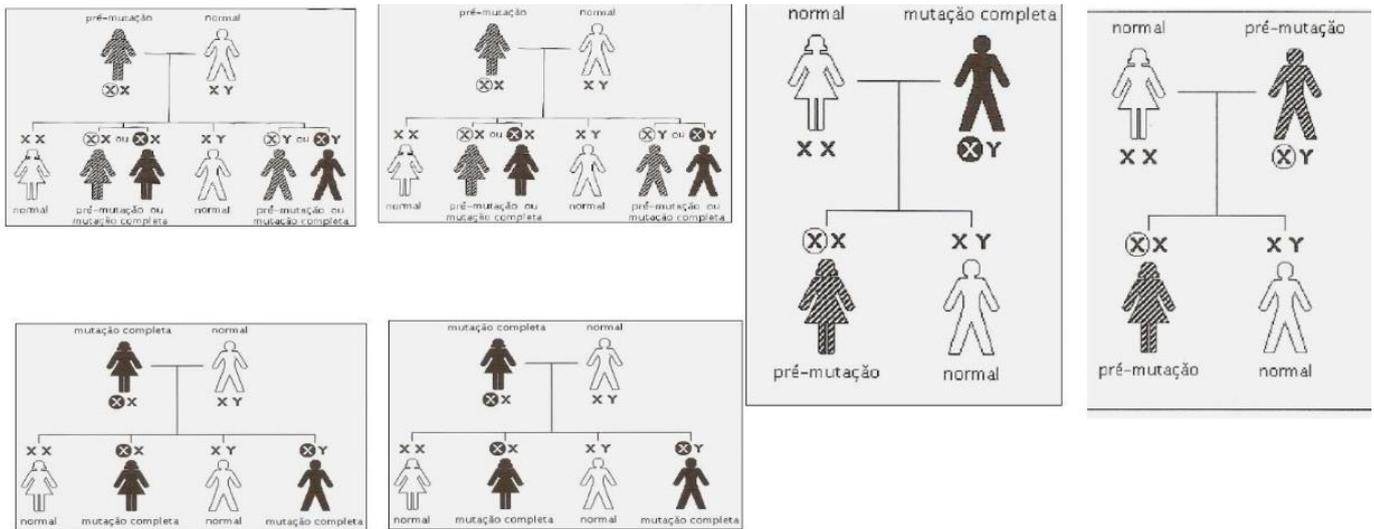
4. DESENVOLVIMENTO

4.1 SÍNDROME DO X FRÁGIL E FISIOPATOLOGIA

A síndrome do X frágil, difere de outras anormalidades cromossômicas por não ser decorrente de nova mutação, sendo somente hereditária pois é transmitida pelo cromossomo X, e este é herdado pelo pai ou mãe e por ter o mecanismo de mutação dinâmica na herança, na qual envolve unidades repetidas de três ou mais nucleotídeos em tandem (adjacentes) em expansão em um gene determinado. A importância deste mecanismo tem relação com a instabilidade das repetições, que podem se expandir e resultar na pré ou mutações completas. O início dos sintomas nos portadores ocorre na infância, por volta de 12 meses em meninos e 16 meses em meninas, sendo que o diagnóstico costuma ser antecipado no sexo masculino em decorrência da maior gravidade destes pacientes, tanto pelos sintomas serem inespecíficos e se tornarem mais evidentes somente após o desenvolvimento cognitivo e intelectual do indivíduo, quanto pelas características físicas variadas, sendo manifestadas desde a infância até a idade adulta (AMARAL, MELO, 2017; ICHTER; ZHAO, 2021).

A síndrome é uma alteração de repetição de nucleotídeos não mendeliana. O gene alterado, denominado FMR1, está presente no braço longo do cromossomo X e a alteração envolve o número maior de cópias da trinca CGG, sendo mais de 200 para portadores e entre 55 até 200 para aqueles em pré mutação. Os indivíduos com a mutação completa apresentam sintomas característicos enquanto os na faixa de pré-mutação não possuem as alterações intelectuais ou comportamentais, só as transmitem (Fig 1.). Os características fenotípicas clássicas são (Fig. 2) : Face alongada, orelhas proeminentes e grandes, hipermobilidade articular, macroorquidismo, mandíbula proeminente, pés planos, estrabismo, atraso no desenvolvimento intelectual, social e de linguagem, transtorno do aspecto autista (TEA), ansiedade, transtorno de hiperatividade (TDAH), possíveis desordens compulsivas como hiperfagia e agressividade, maiores chances de convulsões, obesidade e distúrbio do sono, disfunções gastrointestinais (SALCEDO-ARELLANO, HAGERMAN, MARTÍNEZ-CERDEÑO, 2019; ACERO-GARCÉS et al., 2023).

Figura 1: Heredogramas da Síndrome do X Frágil



Fonte: (AMARAL LR, MELO HCS, 2017)

Figura 2: Sintomas físicos da síndrome

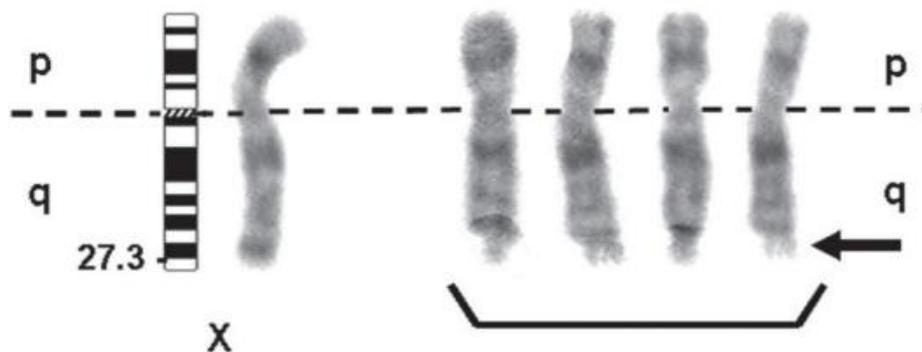


Fonte: (NEUROLOGY; MD, 2020)

O gene onde a mutação ocorre, o FMR-1, está localizado no braço longo do cromossomo X (fig. 3) e produz uma proteína de nome “Fragile X Mental Retardation-Protein”, que não é exclusiva dos neurônios, mas é mais abundante nesse local. A alteração trata-se especificamente de um distúrbio de amplificação gênica, resultando em aumento nas repetições de trinucleotídeos instáveis (CGG) na região 5’UTR, o qual é um local que não passa pela tradução (Fig. 4), e por esta razão a proteína é expressa em menor quantidade ou nem sintetizada e isso determina o fenótipo da síndrome. A falta dessa proteína nos neurônios leva a um exacerbamento de receptores de glutamato, metabotrópicos (mGluR5) e ionotrópicos (AMPA e NMDA),

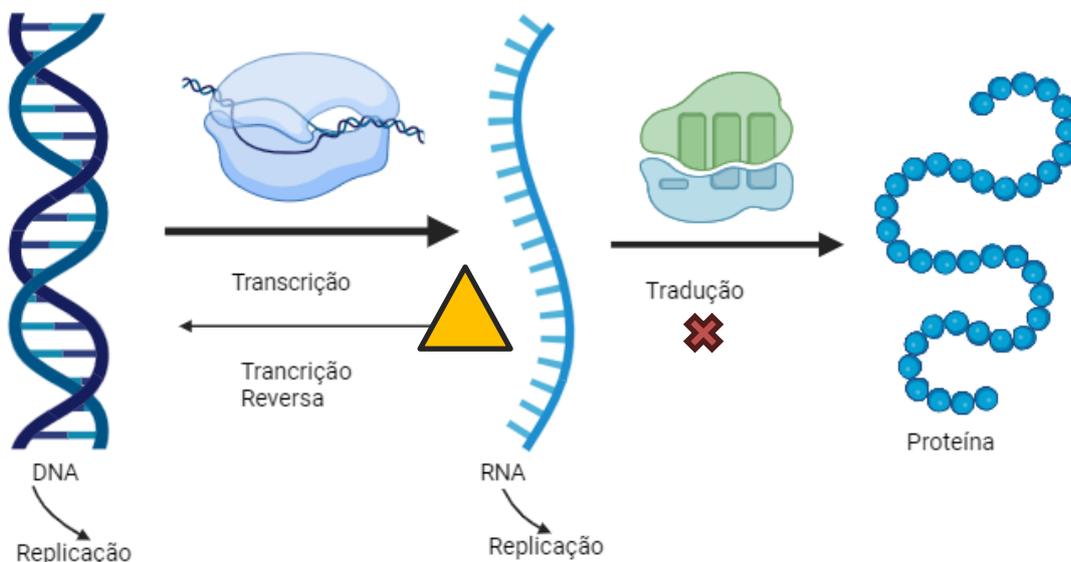
também proteínas de síntese, degradação e transporte de ácido γ -aminobutírico (GABA) e seus receptores estarão reduzidos (SALCEDO-ARELLANO, HAGERMAN, MARTÍNEZ-CERDEÑO, 2019; PINHO; PINHO FILHO; PINHO, 2023).

Figura 3: Cromossomo X normal (X, um par) e de portador da síndrome (seta, dois pares), “p” representa braço curto e “q” o braço longo dos cromossomos (q27.3 é a região em alteração da qual decorre a síndrome e o local que também é apontado na seta).



Fonte: AMARAL, L. R.; MELO, H. C. S., 2017.

Figura 4: Erro da síntese proteica



Fonte: Criado por BioRender

A expansão das repetições dos nucleotídeos ocasiona muita instabilidade no DNA, levando a maiores chances de novas ampliações nas gerações seguintes e assim sucessivamente, como um processo progressivo, que avança até a formação

da mutação completa, ocorrendo quando essas são hipermetiladas em citosina-fosfato-guanina (ilhas CpG) na região 5'UTR e provocam desvantagem ao curso da transcrição e baixos níveis do RNAm. Este RNA promove a codificação da proteína FMRP, e os sinais clínicos decorrentes. Alguns pacientes podem apresentar simultaneamente mutação completa e alelos pré mutados (retições entre 55 a 200) também áreas metiladas e não metiladas, caracterizando um mosaico, em que geralmente tem menor gravidade quando comparado aos com somente mutação completa (PANDELACHE et al., 2019; JUÁREZA et al., 2021; RICHTER; ZHAO, 2021).

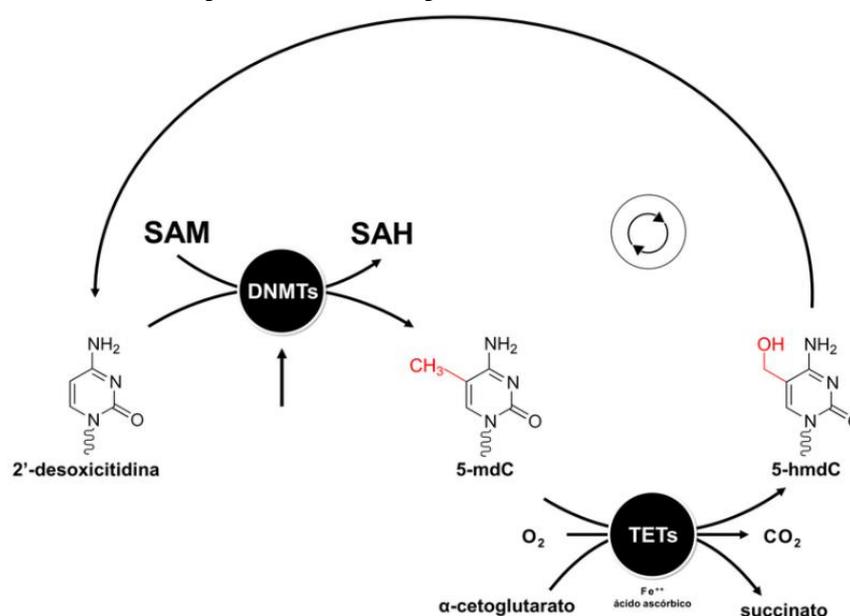
4.2 EPIGENÉTICA DA SXF E MECANISMOS

A epigenética surgiu como conceito em 1939 por Conrad Waddington, com a seguinte proposta: "O desenvolvimento embrionário se origina do interações do material de partida no ovo fertilizado, e que as interações dão origem a algo novo, esse processo é ciclo, levando à formação de um todo organismo", e atualmente essa definição mais aceita é que esse conceito é o estudo de modificações da cromatina que diretamente afetam e estão relacionadas a expressão de um gene, mas não alteram a sequência de DNA subjacente. Essas alterações podem ser Modificações de DNA, modificações de histonas, remodelamento de cromossomos e regulação de RNA via RNAs não codificantes, como microRNA (miRNA) e RNA longo não codificante (lncRNA), sendo envolvidas alterações químicas e regulação transcricional, em células e tecidos diversos. Os principais mecanismos são metilação do DNA, modificação de histonas e os RNAs não codificantes. (KUEHNER et al, 2019; KRAAN; GODLER; AMOR, 2019; MAEDA, 2023; VIEIRA, 2018).

A metilação do DNA (fig.5) (ligação ou substituição de um grupo metila), envolve a ligação covalente na posição cinco do anel de citosina, nas ilhas CpG, gerando 5-metilcitosina (5mC) e esse determina se o gene correspondente será expresso ou não, pois acontece para reprimir a transcrição genética e sendo assim pode atuar na regulação de proteínas codificadas pelos genes e no RNA codificador não proteico. Também mantem a estabilidade genômica por controlar a expressão de regiões altamente repetitivas como os retrotransposons e DNA satélite e tem papel

importante no início processos de desenvolvimento, como impressão genética, que é uma metilação de longo alcance de controle. Esse mecanismo é necessário para o desenvolvimento do cérebro e o seu funcionamento em todas as fases da vida, sendo crítica para a diferenciação celular. As citosinas do alelo são metiladas, incluindo aquelas da ilha CpG na região promotora (mutação completa), silenciando assim o gene. Alelos de pré-mutação, que não são metilados, conferem um risco aumentado para ambos os sexos, para Síndrome de Ataxia Tremor X Frágil, uma forma neurodegenerativa de parkinsonismo e insuficiência ovariana prematura X frágil, uma forma causadora de menopausa prematura (antes dos 40 anos de idade). (NOBILE et al., 2021; FIELD et al., 2019)

Figura 5 – Via de metilação e desmetilação do DNA.

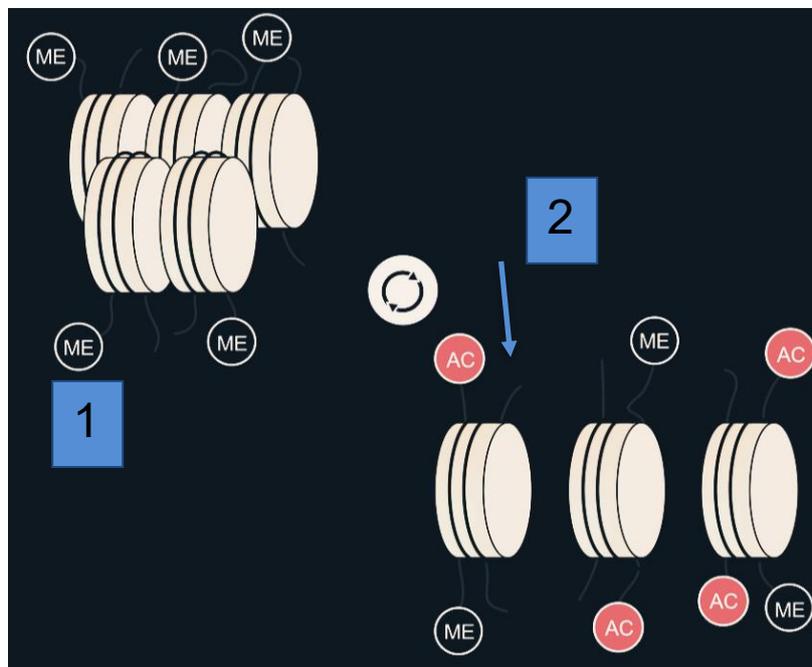


Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2018. Adição de um grupo metil, através de enzimas DNA Metiltransferase (dnMt), à posição C-5 da citosina, originando a molécula 5-metil- deoxicitosina (5-mdC). Para essa adição, é necessário que haja um doador de CH₃ (cofator S adenosilmetionina - SAM), originado Sadenosilhomocisteína (SAH). A oxidação de 5-mdC para 5- hmdC é catalisada por uma família de dioxigenases dependentes de acetogluturato e Fe(II), denominadas proteínas TETs.

A modificação de histonas na cromatina é um dos fatores que provoca a inativação da atividade do gene FMR1 (fig. 6), o processo pode ocorrer pela acetilação/desacetilação. Por proteína de ligação methyl CpG (MBD), como a

chamada MeCP2, que é ativada pela enzima DNA metiltransferase e então se liga as histonas desacetilases e suprime a sua atividade de transcrição e consequentemente sua produção da proteína do gene. A acetilação das histonas resulta em uma forte associação entre a terminação amino da histona e o DNA, resultando em cromatina de estrutura condensada, que também exclui o fator de transcrição e o efeito sobre a conformação da cromatina depende do resíduo de lisina específico a ser metilado. Na síndrome, a modificação de histonas acontece de maneira altamente localizada, no sítio de início da transcrição, essas alterações afetam diretamente a conformação da cromatina, a acetilação é caracterizada pela transferência de grupo acetila do co-fator acetil coenzima A e reduz a capacidade desta de formar fibras compactas. A sequência de eventos que promove pôr fim a inativação da proteína do gene FMR1 é primeiramente a desacetilação das histonas, metilação (tanto no sítio H3K9 quanto do DNA) e desmetilação do sítio H3K4, seguida de metilação aumentada em algumas lisinas, especialmente próximos a expansão da repetição CGG (CHOWDHURY; A; BHAT, 2023; MAEDA, 2023).

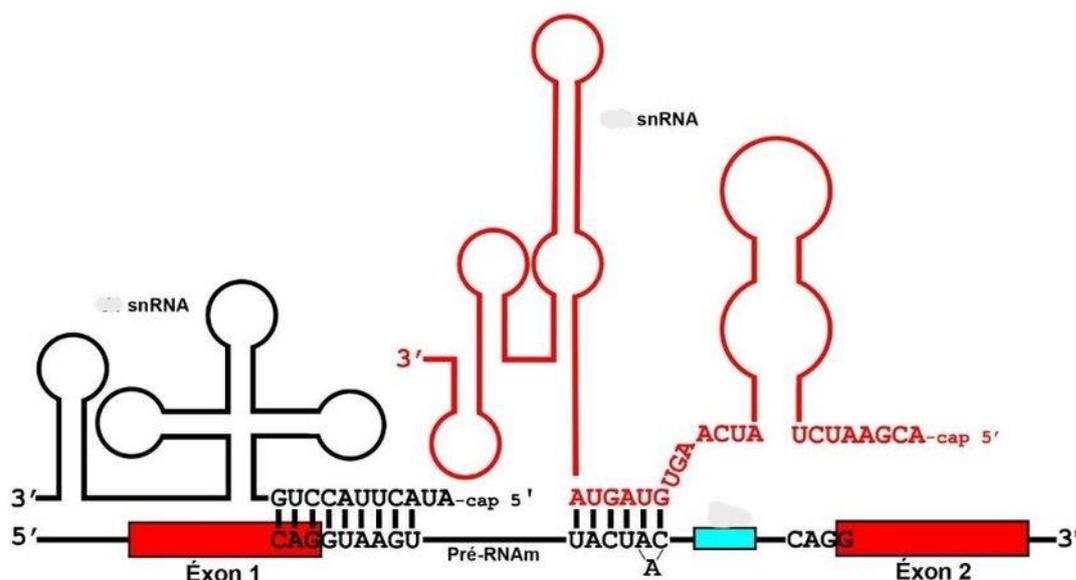
FIGURA 6: Modificação de histona, primeiramente em estado de repressão transcricional – Cromatina condensada e DNA inacessível para o segundo estado (seta) – em ativação transcricional: Cromatina aberta e DNA acessível



Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2018. Para que ocorra a mudança para conformação ativada da cromatina, são necessárias modificações das histonas (Acetilação, AC; Metilação, ME) na porção N-terminal.

Os RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) são diversas classes de RNA, que não são traduzidos em proteínas, mas tem múltiplas funções dentro do genoma (fig 7.), sendo classificados em duas classes: housekeeping, que regulam funções celulares genéricas, como tradução de mRNA, splicing e modificação de RNA ribossômico (rRNA) ou então em ncRNAs regulatórios, que com base no seu tamanho do transcrito, pequenos (<200bp) ou longos (>200 nucleotídeos, os lncRNA) Os ncRNAs reguladores são moléculas que têm uma importante função na regulação da expressão gênica, dentre eles existem os microRNAs (miRNAs), que podem induzir silenciamento genético, pois reprimem a expressão no nível pós transcricional através da sua associação direta com o RNA mensageiro (mRNA) e hipermetilação. Os lncRNA ainda podem atuar como guia, modificadora de estrutura de cromatina, por interação com proteínas, regulador transcricional, afetando interações do RNA polimerase e fatores de transcrição, também como scaffolds, recrutando proteínas e formando complexos ribonucleoproteicos e decoy, ligando-se em alvos e impedindo estes de ligarem ao alvo original. Podem estar relacionados a maioria das fases da regulação de expressão gênica, sendo a transcricional, pós transcricional e traducional, tornando os processos mais coesos. (DURÁN et al., 2023; JORGE et al., 2020; BONILAU, 2018).

Figura 7: Rna não codificante



FONTE: Adaptado de LUVISON, 2018. Interações entre pré-RNA mensageiro (pré-RNAm) e os RNA não codificantes no processo de splicing do RNAm. Poderá gerar transcritos que não serão traduzidos, e assim, o controle de expressão gênica pós-transcricional.

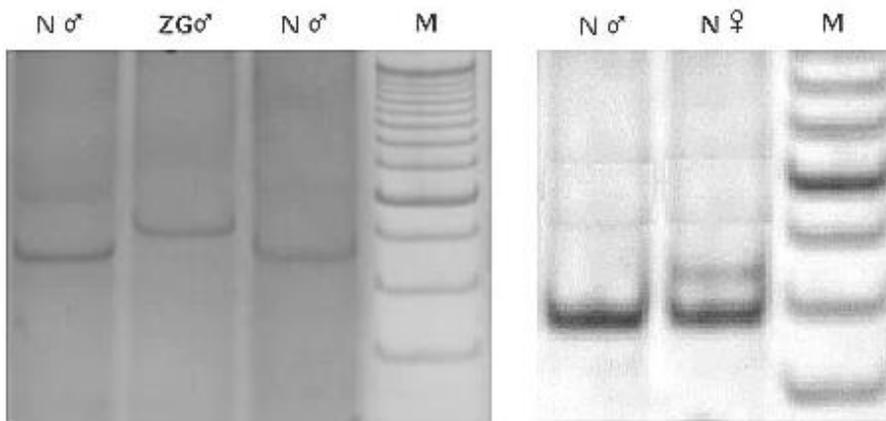
4.3 DIAGNÓSTICO DA SXF

A Síndrome do X Frágil pode ser diagnosticada por meio de análises em biologia molecular, sendo que as técnicas mais utilizadas são: a PCR (fig.8 e 9), SOUTHERN BLOT (fig.10 e 11) ou qPCR (fig.12). Os que possuem maior precisão são, o PCR ou então o qPCR(real time), sigla referente a "reação em cadeia da polimerase" primeiramente e o Southern blot como confirmatório, enquanto o cariótipo é um complementar que é realizado em menor frequência. A combinação das duas técnicas alcança 99% em confiabilidade do diagnóstico e pode ser feito com amostras de sangue, tecido ou células amnióticas já se pode fazer a detecção pré-natal. (AMARAL; MELO, 2017; OLIVEIRA; MORAES FILHO, 2018).

O PCR (fig. 8 e 9) que foi criado em 1983, se utiliza da amplificação enzimática das cadeias de nucleotídeos da região afetada, ou seja, a cadeia repetitiva CGG do cromossomo x, na região q27.3, para a descoberta do número de cópias da repetição em normais e pré-mutados (com número entre 55 a 200). O processo do exame ocorre (Fig. 8) se utilizando de insumos como nucleotídeos, primers, íons magnésio e solução

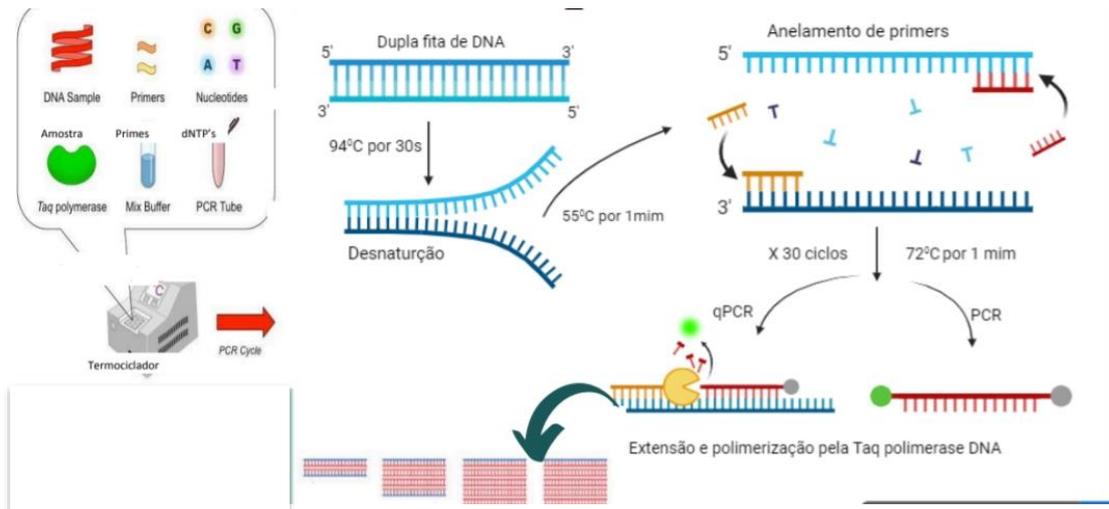
tampão, enzima polimerase e amostra, nas seguintes etapas: Desnaturação do DNA, na temperatura de 94°C por 30 segundos, após ocorre o anelamento dos primers em 55°C por 1min e por último a polimerização em 72°C por 1min, isso se repete por 20-30 ciclos. A desnaturação é essencial para a abertura da dupla fita da molécula de DNA, para que as sequencias de primers construídas, forward e reverse se encaixem no início e fim da região de interesse, delimitando a reação e que por fim, na amplificação é utilizada a enzima Taq DNA Polimerase, que atua a partir dos primers e completa a sequência, criando uma nova fita complementar e aumentando a quantidade de material genético, que no qPCR (fig.12) é feito o mesmo processo que o PCR convencional mas concomitantemente pode ser quantificado por um software pelo acréscimo de sondas de fluorescência, o que permite ainda a quantificação gráfica, que demonstra valores. (THERMOFISHER, 2024; RAJALAKSHMI, 2017).

Figura 8: PCR para detecção do X frágil: M= marcador, N= paciente normal, ZG= paciente em zona cinza (intermediario - baixo risco).



Fonte: Neurogene, 2021

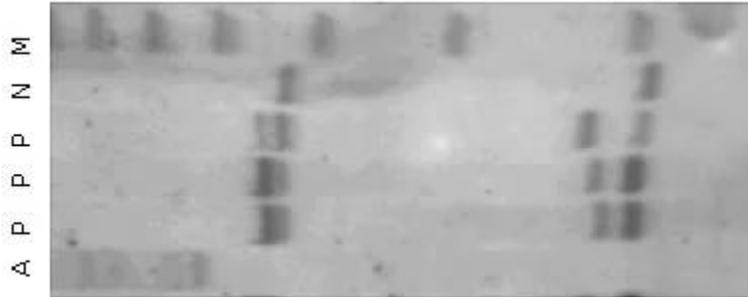
Figura 9: Processo da reação do PCR



Fonte: Criado pelo BioRender, Adaptado de oliveira; moraes filho, 2018

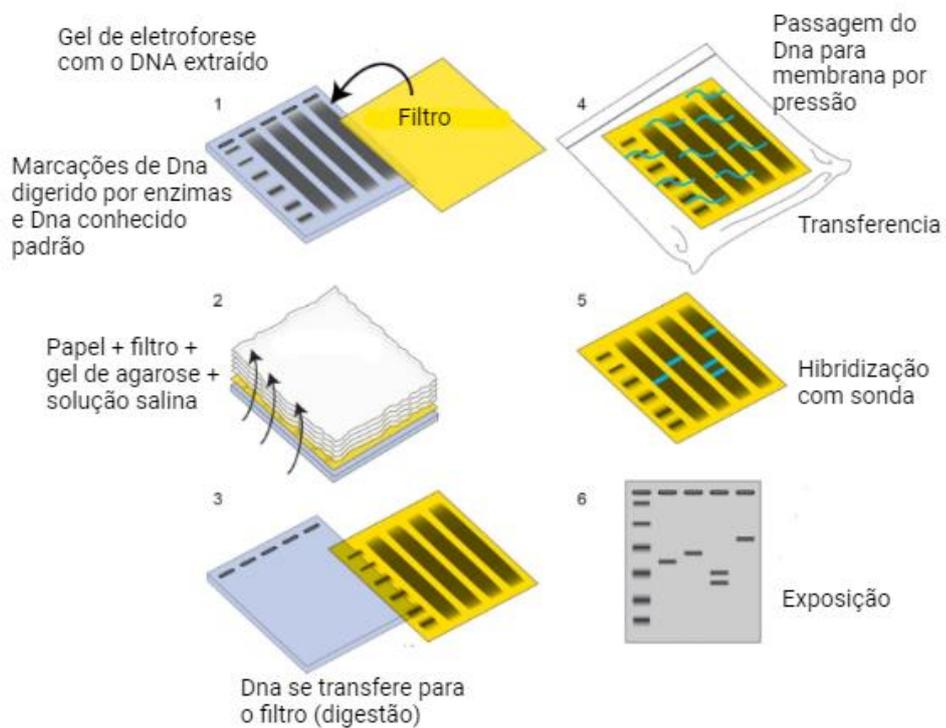
O segundo exame mais utilizado que é o southern blot (fig. 10 e 11), nomeado com o sobrenome de seu criador, o biólogo Edwin Southern, e que permite a identificação da mutação completa e a pré-mutação e os alelos normais, obtendo o valor aproximado do número de repetições e determinação do estado de metilação da região promotora gene FMR1. É citado como padrão ouro para o diagnóstico dessa síndrome, apesar das limitações que apresenta, não sendo possível a descoberta do número exato de repetições como no qPCR, não detecta deleções e que este necessita de grandes quantidades de DNA genômico. Realizado com etapas como (Fig.11): Extração de DNA, eletroforese/digestão do DNA por enzimas como EcoR I e Hind III em gel de agarose, preparo da sonda, transferência do gel tratado com solução alcalina desnaturante da dupla fita, a fim de separá-las em simples fita, e o DNA das etapas seguintes possa aderir e parear com a sonda, então ocorre a Transferência do DNA para uma membrana de nitrocelulose por pressão no gel para que esse passe e se acomode e por fim ser feito a hibridização (marcação de sonda de DNA covalentemente com a enzima) e detecção (visualização) (CIOBANU et al., 2023; CAI et al., 2019).

Figura 10: Southern Blot para Síndrome do X Frágil



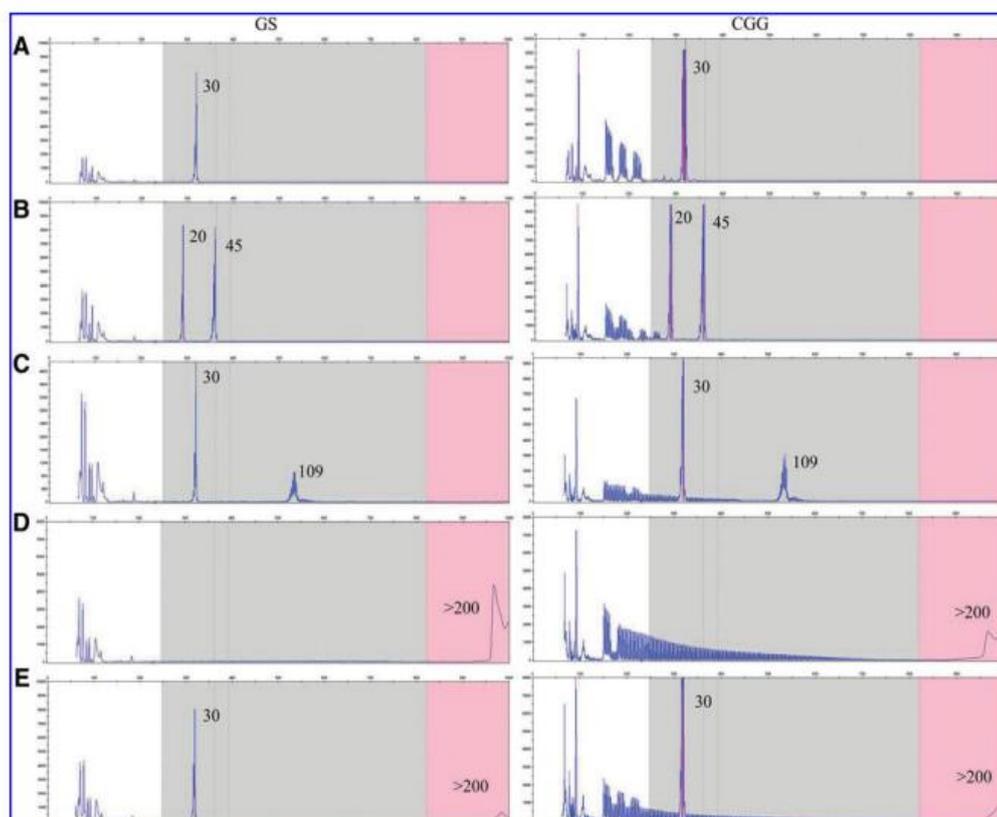
Fonte: Adaptado de Neurogene, 2021. M= marcador, N= paciente normal, P= paciente com pré mutação e A= paciente portador

Figura 11: Processo do Southern Blot



Fonte: Criado pelo BioRender, Adaptado de National human genome research institute, 2024; roger williams university, 2022

Figura 12 - Eletroesferogramas para a sequência CGG por amplificação em qPCR em amostras de pacientes portadores da síndrome, o par de primer amplifica a região CGG de FMR1 por tamanhos, classificando do normal a mutação completa



Fonte: Adaptado de FIELD et al., 2019. A - Normal homocigoto feminino com 30 CGG repetições; B - Zona cinza heterocigoto feminino com 20 e 45 repetições CGG; C - Feminino com pré mutação entre 30 e 109 CGG repetições; D - Masculino com mutação completa com mais de 200 repetições da sequência CGG; E - Feminino com mutação completa com 30 e mais de 200 repetições.

4.4 TRATAMENTO E EPIDEMIOLOGIA

Este distúrbio afeta uma parcela considerável da população, cerca de um em cada quatro mil homens e uma a cada seis mil mulheres. A pré-mutação é a mais comum e tem uma pouca prevalência, mas que se apresenta maior entre os homens. Segundo dados do IBGE, do Censo Demográfico de 2019, há pelo estimadas 2,5 milhões de pessoas com deficiência mental ou intelectual (1,2% da população com 2 anos ou mais de idade), sendo entre os idosos de 2,9%. (GOV BR - IBGE, 2019).

A Síndrome pode estar associada ao autismo e quando na faixa de pré-mutação pode acarretar o desenvolvimento de ataxia, que é a dificuldade ou mesmo incapacidade de se manter a coordenação motora como normalmente e/ou tremores, menopausa precoce e insuficiência ovariana, também incidem riscos de prolapsos da válvula mitral e convulsões. No sexo masculino os portadores do FXTAS (Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil), demonstram em imagens de ressonância magnética, atrofia do cérebro e anormalidades na substância branca, incluindo envolvimento do pedúnculo medular do cerebelo, ademais esses indivíduos apresentam em algumas áreas cerebrais, neurônios com células dendríticas densas e imaturas (ALBERTS et al, 2017; JUÁREZ et al., 2021; BAKER et al., 2019).

Os portadores da síndrome possuem o desafio de inclusão social, visto que ainda existe preconceito contra deficientes intelectuais na sociedade, devido a maiores dificuldades em atenção e integração de informações. Dessa forma, necessitam de compreensão e apoio para o desenvolvimento adequado, necessitando de assessoramento psicopedagógico para a adaptação curricular e manter um ambiente agradável, acolhedor e estimulante. Como o tratamento se baseia em trabalho multidisciplinar, composto pela terapêutica medicamentosa, psicoterápica, reabilitativas e psicossociais, é de extrema importância para os profissionais da área da saúde a atenção e o acompanhamento de portadores e também aos próprios pacientes, que necessitam de apoio tanto em suas famílias, quanto nos tratamentos para viverem com maior qualidade de vida e mais inclusão na sociedade. (SILVA COLELLA, 2021).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síndrome do X frágil é uma doença genética, hereditária e que afeta parte considerável da população, sendo a segunda causa genética mais comum de deficiência mental, tendo essa importância e visto que afeta os portadores com sintomas tanto físicos quanto psicológicos, sociais e de desenvolvimento é de extrema importância a atenção multidisciplinar ao paciente. O diagnóstico para esta ainda passa por dificuldades para seja realizado perfeitamente, como os sintomas clínicos não são tão específicos, pode ter um diagnóstico errado, confundido por doenças alternativas e a falta de disponibilidade dos exames confirmatórios na rede pública de saúde compromete ainda mais, sendo que obriga o paciente a se testar por laboratórios particulares e o tratamento segue a mesma linha, sendo necessárias atenções em diversas frentes, a educacional, psicológica, médica, social e familiar, o que requer um comprometimento e dedicação.

Após o estudo e o agrupamento de dados é possível reconhecer essa importância, tanto para os portadores, quanto para suas famílias e a sociedade, pois passam por inúmeros desafios e o diagnóstico clínico e laboratorial o mais precocemente implica em um melhor entendimento e uma melhor inclusão social. Também a busca por tratamento e acompanhamento garante uma melhor qualidade de vida ao paciente, portanto é de extrema importância a preocupação da ciência em estudos e desenvolvimento de pesquisas e investimentos acerca da procura de obtenção de maiores conhecimentos da doença e estudos acerca de seus mecanismos genéticos, pois fornece mais segurança as famílias e maior conhecimento científico, ademais auxiliando no aconselhamento genético e no planejamento de maternidade, mantendo a qualidade de vida as próximas gerações igualmente, também para fins de busca de recursos que tragam melhores tratamentos e melhoria no diagnóstico ofertado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACERO-GARCÉS, D. O. et al. Fragile X Syndrome in children. **Colombia Médica**, [S.I.], v.54, n.2, p.1–22, maio. 2023. Disponível em: <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/5089>. Acesso em: 23/03/2024.

ALBERTS et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. [S.I.]: ArtMed, 2017.1464 p. E-book. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1OKtpaU8dKr583b8Udwn3dJqvues6lILO/view>

AMARAL, L. R. do; MELO, H. C. S. Síndrome do X frágil: breve revisão e relato de caso. **ResearchGate - Evidência - Ciência e Biotecnologia**, [S.I.], v. 17, n. 2, p. 135–150, novembro 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321939997_Sindrome_do_X_fragil_breve_revisao_e_relato_de_caso. Acesso em: 13/02/2024

BAKER, E. K. et al. Incomplete silencing of full mutation alleles in males with fragile X syndrome is associated with autistic features. **Molecular Autism BMC**, [S.I.], v.10, n.21, p.1–13, outubro 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6499941/>. Acesso em: 11/09/2023.

BONILAU, B. **EXPRESSÃO DE RNAS NÃO-CODIFICANTES LONGOS NO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO**. 2018. 198 p. Dissertação (Pósgraduação em Biologia Celular e Molecular) — Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/bitstream/handle/1884/58214/R%20-%20D%20-%20BERNARDO%20BONILAU. pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 04/06/2024.

CAI, X. et al. Clinical Genetic Testing for Fragile X Syndrome by Polymerase Chain Reaction Amplification and Southern Blot Analyses. **Springer Nature**, [S.I.], v.1942, n.2, p.11–27, janeiro 2019. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9080-1_2. Acesso em: 07/09/2023

CHOWDHURY, D. R.; A, S. S.; BHAT, P. Histone modifications and FMR role in Fragile X syndrome: A review. **Jaz India - Journal of Advanced Zoology**, [S.I.], v.44, n.04, p.815–822, novembro 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/375971507_Histone_modifications_and_FMR_role_in_Fragile_X_syndrome_A_review. Acesso em: 28/03/2024

CIOBANU, C. et al. Narrative Review: Update on the Molecular Diagnosis of Fragile X Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 24, n.11, p.1–16,

maio 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10252420/pdf/ijms-24-09206.pdf>. Acesso em: 20/03/2024.

DB MOLECULAR. **X frágil**. São Paulo, 2024. Disponível em: <https://www.dbmolecular.com.br/material-tecnico/x-fragil>. Acesso em: 07/09/2023.

DURÁN, M. A. C. et al. Epigenética em Ciências Forenses. **Revista Brasileira de Criminalística**, [S.l.], v.12, n.2, p.83–90, abril 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/370305489_Epigenetica_em_Ciencias_Forenses. Acesso em: 23/04/2024

FIELD, M. et al. Significantly Elevated FMR1 mRNA and Mosaicism for Methylated Premutation and Full Mutation Alleles in Two Brothers with Autism Features Referred for Fragile X Testing. **International Journal of Molecular Sciences - MDPI**, v. 20, n. 3907, p. 1 – 16, agosto 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/335117711_Significantly_Elevated_FMR1_mRNA_and_Mosaicism_for_Methylated_Premutation_and_Full_Mutation_Alleles_in_Two_Brothers_with_Autism_Features_Referred_for_Fragile_X_Testing. Acesso em: 04/06/2024

FLEURY. **Síndrome do X frágil**. São Paulo, 2024. Disponível em: <https://www.fleury.com.br/manual-de-doencas/sindrome-do-x-fragil>. Acesso em: 07/09/2023.

GENOMIC. FMR1 – **Síndrome do X-Frágil**. 2022. Disponível em: <https://genomic.com.br/portal/x-fragil/>. Acesso em: 04/06/2024.

GOV BR - IBGE. PNS 2019: país tem 17,3 milhões de pessoas com algum tipo de deficiência. **Agência de notícias – IBGE. GOV**, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/31445-pns-2019-pais-tem-17-3-milhoes-de-pessoas-com-algum-tipo-de-deficiencia>. Acesso em: 19/04/2024

HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. Fragile X syndrome. **Current Biology CellPress**, [S.l.], v.31, n.1, p.1–3, março 2021. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(21\)00076-2.pdf](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(21)00076-2.pdf). Acesso em: 11/09/2023.

JORGE, A. L. et al. MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein Journal**, v. 19, n. 1, p. 1 – 7, 12 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/zMRWzLVCTFsjGx86PtjXgNy/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 04/06/2024.

JUÁREZA, J. C. C. et al. Síndrome X frágil y otras patologías asociadas al gen FMR1. **Revista Med**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 37–55, dezembro 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.18359/rmed.5262>. Acesso em: 23/04/2024.

KIMURA, K. M.; SILVERIO, W. D.; CAMPAROTO, M. L. ABORDAGEM EPIGENÉTICA NO TRATAMENTO DA SÍNDROME DO X- FRÁGIL: REVISÃO INTEGRATIVA. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 70 – 83, Dezembro 2022. Disponível em: <https://www.revneuropsiq.com.br/rbnp/article/view/745>. Acesso em: 07/03/2024.

KRAAN, C. M.; GODLER, D. E.; AMOR, D. J. Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders. **Developmental medicine & child neurology**, [S.l.], v.61, n.2, p.121–127, fevereiro 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dmnc.13985>. Acesso em: 23/03/2024

KUEHNER, J. N. et al. Epigenetic Regulations in Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in genetics**, [S.l.], v.10, n.268, p.1–30, abril 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2019.00268/full>. Acesso em: 24/03/2024

LR, A.; HCS, M. Síndrome do X Frágil: Breve revisão e relato de caso. **Research Gate-Evidencia**, Joaçaba, v. 17, n. 2, p. 135 – 150, 12 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/321939997_Sindrome_do_X_fragil_breve_revisao_e_relato_de_caso. Acesso em: 11/06/2024.

LUVISON ARÁUJO, Leonardo Augusto CAVALHEIRO VIEIRA, Gilberto. Admirável mundo novo: a epigenética in. **Evolução Biológica: da pesquisa ao ensino**: 1.ed. Porto Alegre, RS: Fi, 2018. Capítulo 7. 519 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322885478_Amiravel_Mundo_Novo_Epigenetica. Acesso em: 24/04/2024

MAEDA, D. K. **MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: O PAPEL E AS INTERAÇÕES ENTRE RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES E MODIFICADORES DE HISTONAS NO CÂNCER**. 2023. 32 p. Dissertação (Bacharel em Ciências Biomédicas) — Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/daaea7ef-1578-4bce-ac84-aef42fef3be1/content>. Acesso em: 04/06/2024.

MARTINS, G. B. et al. Características físicas e bucais na síndrome do X frágil: revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 61, n. 1, p. 1 – 7, 01 2020. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/view/99833/58199>. Acesso em: 04/06/2024.

MENCK, C. F. M. **Genética molecular básica**: dos genes aos genomas. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/7700457/mod_resource/content/1/Genetica%20Medica%20Thompson%20Thompson%20-%208ed.pdf. Acesso em: 04/06/2024

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. **Southern Blot**. 2024. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Southern-Blot>. Acesso em: 19/05/2024.

NEUROGENE LABORATÓRIO. **Biologia Molecular: SÍNDROME DO X FRÁGIL PCR para a síndrome do X-Frágil (FRAXA) PCR para a síndrome do X-Frágil (FRAXE), PCR para pesquisa de pré-mutação e Southern Blotting**, Santa Catarina, 2021. Disponível em: <https://neurogene.com.br/site/exames/>. Acesso em: 15/02/2024

NEUROLOGY, U. B. C. H. S. F. D. of; MD, A. F. **Pediatric Neurology Pearls for the Adult Neurologist**. 2020. Disponível em: https://www.ucsfcmo.com/2020/MNR20001/slides/10_FosterBarber_PediatricNeuro.pdf. Acesso em: 04/06/2024.

NOBILE, V. et al. DNA Methylation, Mechanisms of FMR1 Inactivation and Therapeutic Perspectives for Fragile X Syndrome. **MDPI Journal Biomolecules**, [S.l.], v. 11, n. 296, p. 1 – 17, fevereiro 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/2/296>. Acesso em: 26/03/2024

OLIVEIRA, T. S. de; MORAES FILHO, A. V. de. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR UTILIZADAS PARA DESVENDAR CRIMES. **Saúde & ciência em ação – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde UNIFAN**, v. 4, n. 1, p. 1 – 14, julho 2018. Disponível em: <https://revistas.unifan.edu.br/index.php/RevistaICS/article/view/399/316>. Acesso em: 04/06/2027

PANDELACHE, A. et al. Clinical and Molecular Differences between 4-Year-Old Monozygous Male Twins Mosaic for Normal, Premutation and Fragile X Full Mutation Alleles. **Gene MDPI Journal**, [S.l.], v.10, n.279, p.1–10, abril 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523498/pdf/genes-10-00279.pdf>. Acesso em: 19/03/2024

PINHO, M. C. N. de; PINHO FILHO, L. C. de; PINHO, R. L. de. Resenha do artigo científico: Síndrome x frágil y otras patologías asociadas al gen fmr1. **Revista Processus de Estudos de Gestão, jurídicos e Financeiros - Uni Processus**, v. 14, n. 47, p. 1 – 7, 12 2023. Disponível em: <https://periodicos.processus.com.br/index.php/egjf/article/view/1032/1029>. Acesso em: 04/06/2024.

RAJALAKSHMI, S. Different types of pcr techniques and its applications. **International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, [S.l.], v.7, n.3, p.285–292, janeiro 2017. Disponível em: <https://www.ijpcbs.com/archive/ijpcbs-volume-7-issue-3-year-2017.html>. Acesso em: 23/04/2024.

RIBEIRO, M. C. M. **GENÉTICA MOLECULAR**. 2020. Licenciatura online em Biologia - Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://antigo.uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Gen%C3%A9tica-Molecular.pdf>. Acesso em: 04/06/2024.

RICHTER, J. D.; ZHAO, X. The Molecular Biology of FMRP: New Insights into Fragile X Syndrome. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.l.], v.22, n.4, p. 209–222, abril 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41583-021-00432-0>. Acesso em: 23/03/2024.

ROGER WILLIAMS UNIVERSITY. **Southern blot**. 2022. Disponível em: https://rwu.pressbooks.pub/encyclopediaofbiologicalmethods/chapter/southern-blot/#southern_schematic. Acesso em: 19/05/2024

SALCEDO-ARELLANO, M. J.; HAGERMAN, R. J.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. Síndrome X frágil: presentación clínica, patología y tratamiento. **Gaceta Médica de México**, [S.l.], v.156, n.1, p.60–66, julho 2019. Disponível em: <https://www.scielo.org.mx/pdf/gmm/v156n1/0016-3813-gmm-156-1-60.pdf>. Acesso em: 14/03/2024

SANTOS, S. C. et al. Identificação de alterações genéticas relacionadas à síndrome do X frágil e ao transtorno de espectro do autismo por meio de ferramentas de bioinformática. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 2, p. 292 – 297, 08 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/34910>. Acesso em: 04/06/2024

SILVA, R. P. da; COLELLA, T. L. A. As implicações nos processos de aprendizagem causadas pela síndrome do X-Frágil: uma abordagem psicopedagógica. **Revista Educação Pública**, [S.l.], v.11, n.30, p.1–4, agosto 2021. Disponível em: <https://educacaopublica.cecierj.edu.br/artigos/21/30/as-implicacoes-nos-processos-de-aprendizagem-causadas-pela-sindrome-do-x-fragil-uma-abordagem-psicopedagogica>. Acesso em: 04/01/2024

SITZMANN, A. F. et al. Rare FMR1 gene mutations causing fragile X syndrome: A review. **Am J Med Genet A**, [S.l.], v.176, n.1, p.11–18, janeiro 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6697153/pdf/nihms-1043090.pdf>. Acesso em: 23/03/2024.

SPECTOR, E. et al. Laboratory testing for fragile X, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). **Nature - Genetics in medicine**, [S.l.], v.23, n.1, p.799–812, abril 2021. Disponível em:

<https://www.gimjournal.org/action/showPdf?pii=S1098-3600%2821%2901453-2>.
Acesso em: 14/03/2024

THERMOFISHER. **PCR Methods—Top Ten Strategies**. [S.l.], 2024. Artigo. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html>. Acesso em: 23/04/2024

VIEIRA, G. C. Admirável Mundo Novo: Epigenética. In: ARÁUJO, L. A. L. (org.). **Evolução Biológica: da pesquisa ao ensino**. 1. ed. Editora fi, 2018. cap. 7. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322885478_Amiravel_Mundo_Novo_Epigenetica. Acesso em: 04/06/2024