

Diagnóstico molecular del síndrome de X frágil mediante PCR específica de metilación.

Molecular diagnosis of Fragile X syndrome through methylation-specific PCR.

*Antonio Alejandro Esperón Álvarez,^I Lainet Merencio Santos,^{II} Ixchel López Reyes,^{III}
Lídice Reyes Navarro,^{IV} Marileivis García Heredia,^V Teresa Collazo Mesa.^{VI}*

Resumen

El síndrome de X frágil (SXF) es causado por el silenciamiento epigenético del gen FMR1, debido al incremento por encima de 200 repeticiones del trinucleótido CGG localizado en su región 5' no traducida. Las expansiones entre 55 y 200 repeticiones, denominadas premutación (PM), tienden a expandirse a mutación completa (MC) cuando se transmiten por vía materna. Los individuos con PM pueden desarrollar el síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil o insuficiencia ovárica primaria asociada a X frágil (FXPOI). En este trabajo se describen los resultados del análisis molecular del gen FMR1 en 251 individuos con sospecha clínica de SXF o con historia familiar de esta enfermedad, así como en 14 fetos de madres con riesgo de tener hijos afectados. El análisis se realizó empleando PCR específica de metilación. Se identificaron 16 varones y 4 hembras con MC, 3 varones mosaicos, y 4 varones y 21 mujeres con PM, 8 de ellas con un alto riesgo de transmitir la enfermedad. Se confirmó el diagnóstico clínico de FXPOI en dos mujeres y de SXF en 20 pacientes con discapacidad intelectual. La distribución de frecuencias alélicas difiere de la reportada para otras poblaciones.

Palabras clave: Síndrome de X frágil, PCR específica de metilación, síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil, insuficiencia ovárica primaria asociada a X frágil.

Abstract

Fragile X syndrome (FXS) is caused by epigenetic silencing of the FMR1 gene, due to increment over 200 repeats of the trinucleotide CGG in the 5'UTR. The expansions between 55 and 200 repeats, named premutation, tend to expand to full mutation on maternal transmission. Premutated carriers can develop fragile X-associated tremor/ataxia syndrome or fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). In this work we describe the results of the molecular analysis of the FMR1 gene in 251 individuals with clinical evidence of SXF or with family history of this disease, as in 14 fetuses of mothers at the risk of having affected children. The analysis was performed using methylation-specific PCR. We identified 16 males and 4 females with full mutation, 3 mosaic males, and 4 males and 21 women with permutation, 8 of them with a high risk to transmit the disease. We confirm the clinical diagnostic of FXPOI in two women and FXS in 20 patients with intellectual disability. The allelic frequency distribution differs from the reported for other populations.

Keywords: Fragile X syndrome, methylation-specific PCR, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, fragile X-associated primary ovarian insufficiency.

^I Licenciado en Biología. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba. E-mail: alejandroea@infomed.sld.cu

^{II} Licenciada en Microbiología. Reserva Científica. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

^{III} Licenciada en Biología. Aspirante a Investigador. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

^{IV} Técnico en Química Analítica. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

^V Técnico en Química Industrial. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

^{VI} Licenciada en Bioquímica. Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Titular. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

Introducción

El síndrome de X frágil (SXF), principal entidad clínica heredada de discapacidad intelectual, es causado por el silenciamiento epigenético del gen FMR1 (*Fragile X mental retardation 1*), debido al incremento por encima de las 200 repeticiones (mutación completa) de un trinucleótido CGG localizado en su región 5' no traducida.^{1,2} De manera excepcional el SXF puede ser causado por mutaciones puntuales en el gen FMR1 y no por la expansión de este trinucleótido.^{3,4}

Las manifestaciones clínicas del SXF incluyen discapacidad intelectual, retraso en la aparición del lenguaje, hiperactividad con déficit de atención, comportamiento tipo autista, y características físicas como cara alargada con frente amplia y mentón prominente, orejas grandes y despegadas, hiperlaxitud articular y macroorquidismo.⁵⁻⁷

Las pequeñas expansiones de CGG, entre las 55 y las 200 repeticiones, denominadas premutación (PM), son inestables y tienen una fuerte tendencia a expandirse a mutación completa (MC) cuando se transmiten por vía materna. Se ha calculado que el riesgo de expansión a MC de alelos premutados de más de 99 repeticiones, bajo transmisión materna, es prácticamente del 100%.⁸ Sin embargo, otra fuente de polimorfismo dentro de la secuencia repetitiva CGG es proporcionada por interrupciones de AGG (entre 0 y 3), que ocurren usualmente cada 10 trinucleótidos.⁹ Existe evidencia de que la presencia de interrupciones AGG reduce el riesgo de transmisión de una MC para todas las premutaciones maternas con una longitud total por debajo de las 100 repeticiones.¹⁰

Los individuos que portan un alelo premutado no manifiestan el SXF, pero pueden desarrollar el síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil (FXTAS, del inglés *fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*)⁵ o insuficiencia ovárica primaria asociada a X frágil (FXPOI, del inglés *fragile X-associated primary ovarian insufficiency*).¹

FXTAS es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, cuyos síntomas incluyen temblor intencional, ataxia cerebelar, pérdida de memoria, demencia y ansiedad. Afecta entre el 20 y el 40% de los hombres con PM y al 8% de las mujeres portadoras de alelos premutados con edades por encima de los 50 años.¹²

Los estudios que involucran a mujeres portadoras de PM en el gen FMR1, revelan que del 16 al 24% de ellas tienen FXPOI, que se manifiesta por insuficiencia ovárica antes de los 40 años de edad.¹³ Se ha señalado que la relación entre la edad de aparición de la FXPOI y el tamaño de la PM no es lineal, y portadoras de PM

en el rango medio tienen mayor riesgo de desarrollar FXPOI que las portadoras de expansiones más largas.¹⁴ Algunos datos publicados sugieren que tener repeticiones CGG cercanas al límite superior del rango normal (de 35 a 54) pudiera estar asociado con un riesgo incrementado de desarrollar FXPOI, pero no se ha llegado a un consenso sobre este tema.¹⁵

Los alelos normales se han subdividido en dos categorías, alelos comunes (hasta 44 repeticiones) y alelos intermedios o zona gris (entre 45 y 54 repeticiones). Los alelos intermedios son ocasionalmente inestables a través de la transmisión y son precursores potenciales de una PM en generaciones subsiguientes.¹⁶

En los últimos años se han aplicado variados métodos diagnósticos para establecer el número de repeticiones CGG y determinar el estado de metilación de los alelos del gen FMR1. Estos métodos han estado basados, principalmente, en el empleo de las técnicas de Southern blot, de ligación de sondas, de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y de PCR específica de metilación (PCRem).¹⁷⁻²² Para la realización del análisis diagnóstico, las PCR se ha combinado tanto con electroforesis en gel de agarosa (EGA), como con electroforesis capilar (EC) en poliacrilamida.²²

Con el método de PCR más EC se alcanza una resolución de una simple repetición de trinucleótido,²² lo cual no se logra con el Southern blot, que ha sido por varios años la principal técnica empleada para el diagnóstico de SXF. Por otra parte la PCRem, al contrario de las PCR convencionales, brinda la posibilidad de analizar el estado de metilación y amplificar los fragmentos de mayor tamaño (grandes premutaciones e incluso las mutaciones completas). Por tal razón, en la actualidad existe una tendencia a la generalización de este método: PCRem para la amplificación de la región promotora del gen FMR1 y EC para el análisis de los amplicones obtenidos.

La técnica de PCRem en combinación con la EGA resulta, sin embargo, más económica, y aunque carece de la exactitud para la determinación del número de repeticiones que se logra con la EC, puede brindar una aproximación cercana al valor real de repeticiones del trinucleótido. Este método diagnóstico ha sido empleado en nuestro laboratorio desde el año 2010, en sustitución de la técnica de Southern blot.

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos en el análisis del gen FMR1, mediante PCRem y EGA, en pacientes con sospecha clínica de SXF, en individuos con historia familiar de esta enfermedad y en fetos de madres con riesgo de tener hijos afectados. Además se analiza, por primera vez,

la distribución de las frecuencias del número de repeticiones de CGG en una muestra de la población cubana.

Métodos

Las muestras de sangre periférica de 251 individuos (pacientes con manifestaciones clínicas que hacen sospechar de un SXF o con historia familiar de la enfermedad) y 14 muestras de líquido amniótico, fueron tomadas en las consultas de la Red Nacional de Genética, y enviadas para su análisis al Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica de Cuba (CNGM) entre los años 2010 y 2014, donde se procesaron mediante métodos estándares de aislamiento del ADN.

EL ADN se modificó con bisulfito de sodio (por método manual o mediante estuche comercial) y se amplificó mediante la técnica de PCR específica de metilación, según lo descrito previamente por Zhou y colaboradores.¹⁷ En resumen, se utilizaron tres juegos de cebadores para la amplificación de la región repetitiva CGG del gen FMR1, tanto en alelos no metilados como en alelos metilados.

Los fragmentos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,8%, durante 4 horas, a 6 V/cm. Posteriormente el gel fue expuesto a luz ultravioleta y fotografiado. Se estableció el número aproximado de repeticiones de CGG de cada alelo en el rango normal o premutado, por comparación con patrones de peso molecular, con la ayuda del programa informático para el procesamiento de imágenes AlphaView (Cell Biosciences).

En el caso de los diagnósticos prenatales, se estableció el sexo del feto mediante la amplificación por PCR del gen SRY, previo al análisis del gen FMR1.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de

la institución y para su realización se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes o sus progenitores. Los líquidos amnióticos correspondieron a madres con algún riesgo de tener hijos afectados con SXF, las cuales asistieron a las consultas de asesoramiento genético de todo el país, y dieron su consentimiento informado por escrito para el diagnóstico prenatal molecular.

Resultados

De las 265 muestras analizadas, 179 fueron enviadas para su análisis por sospecha clínica de SXF. De estos casos, resultaron positivos para la expansión 22 (el 12,3%): 16 varones y una hembra tuvieron MC; tres varones resultaron ser mosaicos (presentaron tanto alelo premutado como alelo con MC) y dos tuvieron PM.

También se enviaron al laboratorio dos muestras por sospecha de FXPOI y ambos casos resultaron positivos para PM. Una muestra se remitió por sospecha de FXTAS, sin embargo este caso resultó ser negativo para la expansión de trinucleótido.

Además, las muestras de 69 individuos fueron analizadas por ser posibles portadores de una expansión, y resultaron positivos 22 casos (31,9%): dos varones y 19 hembras tuvieron PM, y una joven de 20 años, con un hermano enfermo previamente diagnosticado por método molecular, resultó también ser portadora de MC.

De los 14 diagnósticos prenatales realizados, dos hembras resultaron positivas para la MC, mientras que seis fetos varones y seis fetos hembras tuvieron alelos en el rango normal.

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos en el presente estudio.

Tabla 1. Resultados del análisis de FMR1 en las 265 muestras incluidas en el estudio.

	MC	Mosaico	PM	Normal		Total
				Intermedio	Común	
Varones	16	3	4	4	164	191
Hembras	4	0	21	12 ^a	37 ^b	74
Total	20	3	25	16	201	265

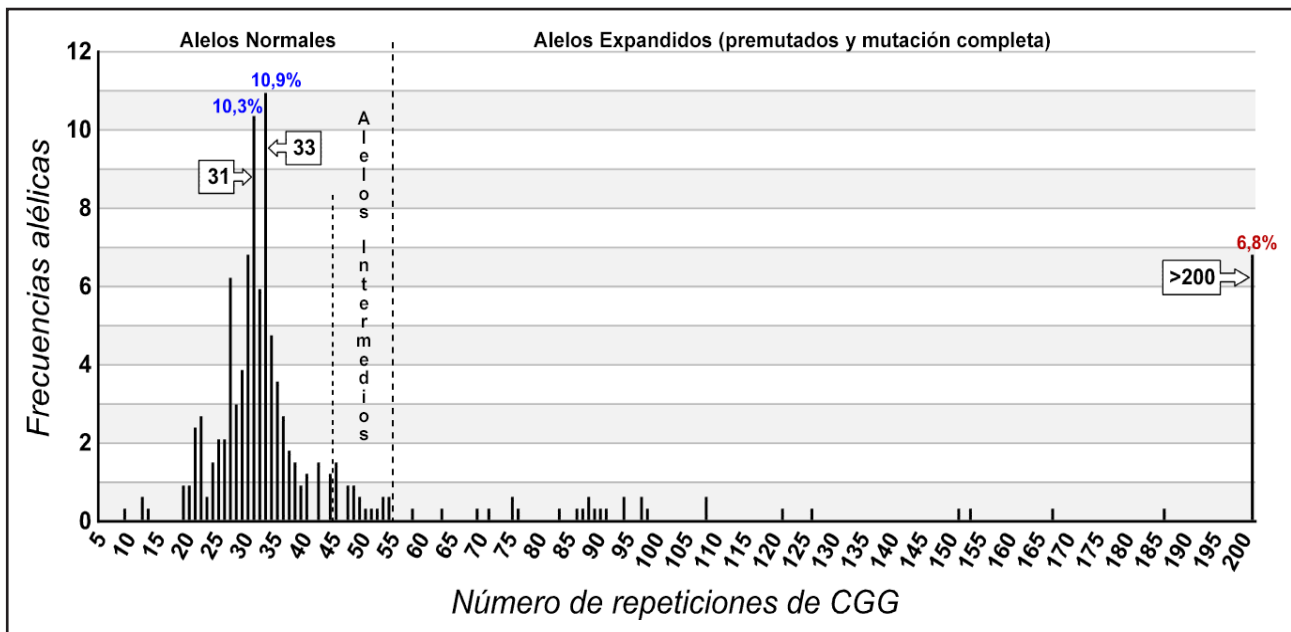
^aAl menos con un alelo en el rango intermedio.

^bCon ambos alelos en el rango común.

El alelo que resultó ser más frecuente en los 339 cromosomas analizados fue el de 33 repeticiones de CGG que se detectó en el 10,9% de ellos, seguido del alelo de 31 repeticiones, presente en un 10,3% (Figura

1). En total, se detectaron 51 alelos expandidos (23 alelos con MC y 28 alelos premutados), además se identificaron 20 alelos en el rango intermedio o zona gris.

Figura 1. Distribución de las frecuencias de número de repeticiones de CGG entre los 339 cromosomas analizados. Se señalan los alelos más frecuentes (31 y 33 repeticiones) y la frecuencia de los alelos con mutación completa.



Discusión

La distribución genotípica obtenida en nuestro estudio para ambos sexos, concuerda con lo reportado por otros autores.^{16, 21} La Tabla 1 muestra que hubo más varones identificados con MC (16 vs. 4) y más hembras con PM (21 vs. 4). Esto se atribuye al hecho que la gran mayoría de los varones estudiados tenían sospecha clínica de SXF (176 de 185) y manifiestan algún grado de discapacidad intelectual, y sus madres fueron frecuentemente portadoras de una premutación. Solo tres hembras fueron estudiadas por presentar algún nivel de retraso mental, y 63 lo fueron por tener historia familiar de la enfermedad.

A un varón con PM en el que se sospechaba SXF, se le detectó un alelo de 186 repeticiones de CGG. Este paciente de 19 años de edad, con tres familiares diagnosticadas como portadoras de PM, ha transitado por la enseñanza general, pero presenta dificultades en el aprendizaje y es distraído. Además, muestra características físicas típicas de la enfermedad como cara alargada, orejas despegadas, mentón prominente e hiperlaxitud articular. Se ha señalado que los varones con alelos premutados muy largos parecen tener un riesgo significativo de padecer problemas conductuales y dificultades para el aprendizaje, probablemente causados por niveles elevados de ARNm del gen FMR1 y niveles reducidos de la proteína FMRP.⁸

A otro varón, que resultó tener PM a pesar de tener clínica de SXF (con retraso mental moderado, macroorquidismo, cara alargada y mentón prominente), solo se le detectó un alelo de 89 repeticiones. Este paciente, también de 19 años, tiene un hermano con MC y su madre porta una PM de 83 repeticiones. Este pudiera ser un raro caso de mosaicismo intertejido, como ha sido reportado por otro autor,²³ donde la mutación completa resultó indetectable a partir del ADN aislado de sangre periférica, independientemente del método que se utilizó para el análisis, debido a la ausencia en los linfocitos del alelo expandido a MC. Las dos mujeres en las que se confirmó FXPOI a través del diagnóstico de portadoras, tienen alelos para FMR1 en el rango intermedio de la PM (86 y 71 repeticiones de CGG, respectivamente). En la literatura se señala un mayor riesgo de desarrollar esta patología entre las mujeres con alelos de expansiones medias.¹⁴ La primera paciente, de 42 años, presentó una menopausia precoz y tiene un sobrino con SXF confirmado en el presente estudio. Mientras que la segunda, de 30 años de edad, era tratada por problemas de infertilidad y tiene un familiar también diagnosticado como X frágil con anterioridad. El análisis del caso del paciente con sospecha de FXTAS arrojó, sin embargo, que el mismo tiene un alelo en el rango normal común (44 repeticiones de CGG). Este individuo de 62 años había presentado un

deterioro cognitivo y motor progresivo a lo largo de aproximadamente una década, con manifestaciones de daño en las funciones mentales superiores y las funciones ejecutivas, dificultad en el habla, disfagia, bradicinesia, inestabilidad de la marcha y de la postura, entre otras.

Los resultados de análisis recientes, indican una posible contribución de los alelos intermedios (incluso desde las 39 repeticiones de CGG) a manifestaciones clínicas que hasta el momento se relacionaban solo con la presencia de alelos premutados. Se ha planteado la hipótesis de que una pequeña elevación del ARNm del gen FMR1 en los portadores de alelos intermedios pudiera representar un riesgo adicional para algunas enfermedades neurodegenerativas como aquellas asociadas con la enfermedad de Parkinson, en interacción con otros genes de susceptibilidad o con factores ambientales.⁷ A la luz de estos nuevos hallazgos, el paciente con sospecha de FXTAS pudiera ser un caso de parkinsonismo asociado a X frágil.

El hecho que en los cuatro años que abarca el estudio, solo se hayan recibido para análisis, dos muestras de casos con sospecha clínica de FXPOI y uno con sospecha de FXTAS, nos alerta sobre la necesidad de brindar más información a los genetistas clínicos, ginecobstetras y neurólogos sobre la posibilidad de diagnóstico de estas dos entidades relacionadas con X frágil. Cabría esperar más casos no diagnosticados teniendo en cuenta que la prevalencia a nivel mundial de la PM en la población general es relativamente alta, y va de 1:130 a 1:256 en las mujeres y de 1:250 a 1:813 en los hombres²⁴, y los porcentajes reportados de mujeres y hombres portadores de PM que desarrollan estas dos enfermedades van de 16 a 24% para FXPOI y de 20 a 40% para FXTAS.

De las 19 mujeres portadoras de PM (se excluyen las que presentan FXPOI), 16 se encuentran en edad fértil, con un promedio de edad de 34,5 años. De ellas, 8 presentan alelos con 91 o más repeticiones del trinucleótido CGG, y por tanto tienen un riesgo entre el 42 y el 50% de tener un hijo varón afectado, y entre el 21 y el 25% de tener una hija afectada. Estos valores son obtenidos a partir del riesgo de transmisión del alelo con mutación completa estimado por Yrigollen y colaboradores en el 2012.¹⁰

Aunque resulta llamativo que tan solo dos de los 14 fetos caracterizados para FMR1, heredaron el alelo mutado, se debe señalar que solamente en 5 casos existió la confirmación previa que las madres eran portadoras de una PM o de una MC. Un caso fue remitido para estudio debido a que la madre presentó un alelo intermedio con un número de repeticiones

muy cercano al rango premutado, estimado en 52 repeticiones de CGG. Los otros 8 casos de diagnóstico prenatal, sin embargo, correspondieron a 7 madres y un padre con historia familiar de SXF que no habían sido sometidos previamente al diagnóstico de portadores (todos tuvieron alelos normales), y por encontrarse las madres en una edad gestacional alrededor de las 20 semanas se decidió, por parte de los genetistas clínicos, enviar directamente para análisis la muestra de líquido amniótico.

Si tenemos en cuenta solo los 5 casos de embarazadas portadoras de una expansión, los fetos que heredaron el alelo mutado representaron el 40% del total. Estos resultados, aun cuando la muestra para análisis prenatal en nuestro estudio fue pequeña, concuerdan con lo reportado por Tejada y colaboradores en el 2014. En dicho estudio, que incluyó 271 diagnósticos prenatales en embarazadas portadoras de PM o MC, no se obtuvo diferencia significativa entre la segregación de alelos mutados o normales. El alelo mutado había pasado al feto en el 54% de los casos y el alelo normal en el 46%.²¹

Las investigaciones sobre la distribución alélica han identificado valores modales de 29 o 30 repeticiones de CGG en casi todas las poblaciones, incluyendo la española y la subsahariana.^{6, 24-28} El análisis de las frecuencias alélicas en nuestra muestra develó, sin embargo, una distribución bimodal, con picos en 33 y 31 repeticiones (de 10,9 y 10,3%, respectivamente). Les siguieron los alelos de 30, 27 y 32 repeticiones con frecuencias de 6,8; 6,2 y 5,9%, respectivamente. Resulta llamativo que el alelo de 29 repeticiones estuviera presente en solo el 3,8% de los cromosomas analizados.

En un análisis de frecuencias alélicas en la población mestiza mexicana, que incluyó 129 individuos no emparentados, se obtuvo una distribución multimodal, siendo los alelos más frecuentes los de 32 (27,6%) y 30 (25,3%) repeticiones.²⁹ Se ha señalado que las pequeñas diferencias entre estudios (de 1 o 2 repeticiones de CGG) pudieran ser consecuencia de errores experimentales por carecer la técnica empleada de una precisión de una simple repetición y por no disponerse de muestras patrones secuenciadas.²⁵ Pero también se plantea que estas diferencias pueden ser consecuencia de las particularidades étnicas de una población y su nivel de mestizaje²⁹, que en el caso de la población cubana es alto. Los resultados también mostraron una amplia variedad alélica en la muestra analizada, con 36 alelos diferentes solo en el rango normal (entre 9 y 54 repeticiones) y 23 alelos en el rango premutado (entre 58 y 186 repeticiones).

Conclusiones

La técnica de PCR específica de metilación, en combinación con la electroforesis en gel de agarosa, permitió analizar de manera rápida y sencilla el 100% de las muestras. Se estableció el número de repeticiones de los alelos en los rangos normal y premutado, y se determinaron los alelos con mutación completa. Esto permitió identificar 8 mujeres portadoras de una expansión con un alto riesgo de transmitir la enfermedad, y confirmar el diagnóstico clínico de FXPOI en dos mujeres y de SXF en 20 pacientes afectados con discapacidad intelectual. El análisis de la frecuencia alélica permitió identificar

un patrón de distribución que difiere de lo reportado para otras poblaciones.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a todos los especialistas y personal de apoyo de Red Nacional de Genética que intervinieron en la toma y remisión de las muestras incluidas en este estudio, así como por facilitar los datos clínicos y de historia familiar de los pacientes por ellos atendidos, sin lo cual la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Referencias bibliográficas

1. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65(5):905-14.
2. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Human molecular genetics* 1992;1(6):397-400.
3. Collins SC, Coffee B, Benke PJ, Berry-Kravis E, Gilbert F, Oostra B, et al. Array-based FMR1 sequencing and deletion analysis in patients with a fragile X syndrome-like phenotype. *PLoS One* 2010;5:e9476.
4. Handt M, Epplen A, Hoffjan S, Mese K, Epplen JT, Dekomien G. Point mutation frequency in the FMR1 gene as revealed by fragile X syndrome screening. *Mol Cell Probes* 2014;28(5-6):279-83.
5. Hagerman RJ, Hagerman PJ. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol* 2013;12(8):786-98.
6. Peprah E. Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations. *Ann Hum Gene* 2012;76(2):178-91.
7. Loesch D, Hagerman R. Unstable mutations in the FMR1 gene and the phenotypes. *Adv Exp Med Biol* 2012;769:78-114.
8. Nolin SL, Glicksman A, Ding X, Ersalesi N, Brown WT, Sherman SL, et al. Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010. *Prenat Diagn* 2011;31(10):925-31.
9. Terracciano A, Pomponi MG, Marino GME, Chiurazzi P, Rinaldi MM, Dobosz M, et al. Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet* 2004;12(4):333-6.
10. Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, et al. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med* 2012;14(8):729-36.
11. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril* 2007;87(3):456-65.
12. Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004;10:25-30.
13. Pastore LM, Karns LB, Pinkerton JV, Silverman LM, Williams CD, Camp TR. Acceptance of fragile X premutation genetic screening in women with ovarian dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(3):738-43.
14. Ennis S, Ward D, Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet* 2006;14(2):253-5.
15. Rajkiewicz M, Szlendak-Sauer K, Sulek A, Gawlik-Zawislak S, Krysa W, Radowicki S, et al. A molecular and cytogenetic investigation of FMR1 gene premutations in Polish patients with primary ovarian insufficiency. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;155(2):176-9.
16. Rifé M, Badenas C, Quintó L, Puigoriol E, Tazón B, Rodríguez-Revenga L, et al. Analysis of CGG variation through 642 meioses in Fragile X families. *Mol Hum Reprod* 2004;10(10):773-6.
17. Zhou Y, Law HY, Boehm CD, Yoon CS, Cutting GR, Ng ISL, et al. Robust fragile X (CGG)n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. *J Med Genet* 2004;41(4):e45.
18. Zhou Y, Lum JMS, Yeo G-H, Kiing J, Tay SKH, Chong SS. Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. *Clin Chem* 2006;52(8):1492-500.

19. Gatta V, Gennaro E, Franchi S, Cecconi M, Antonucci I, Tommasi M, et al. MS-MLPA analysis for FMR1 gene: evaluation in a routine diagnostic setting. *BMC Med Genet* 2013;14:79.
20. Grasso M, Boon EMJ, Filipovic-Sadic S, van Bunderen PA, Gennaro E, Cao R, et al. A Novel Methylation PCR that Offers Standardized Determination of FMR1 Methylation and CGG Repeat Length without Southern Blot Analysis. *J Mol Diagn* 2014;16(1):23-31.
21. Tejada MI, Glover G, Martinez F, Guitart M, de Diego-Otero Y, Fernandez-Carvajal I, et al. Molecular testing for fragile X: analysis of 5062 tests from 1105 fragile X families—performed in 12 clinical laboratories in Spain. *Biomed Res Int* 2014;2014:195793.
22. Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, et al. A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem* 2010;56(3):399-408.
23. MacKenzie JJ, Sumargo I, Taylor SA. A cryptic full mutation in a male with a classical fragile X phenotype. *Clin Genet* 2006;70(1):39-42.
24. Tassone F, Iong KP, Tong TH, Lo J, Gane LW, Berry-Kravis E, et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Med* 2012;4(12):100.
25. Fernandez-Carvajal I, Walichiewicz P, Xiaosen X, Pan R, Hagerman PJ, Tassone F. Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *J Mol Diagn* 2009;11(4):324-9.
26. Winarni TI, Utari A, Mundhofir FEP, Tong T, Durbin-Johnson B, Faradz SMH, et al. Identification of expanded alleles of the FMR1 gene among high-risk population in Indonesia by using blood spot screening. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16(3):162-6.
27. Indhumathi N, Singh D, Chong SS, Thelma BK, Arabandi R, Srisailpathy CRS. Fragile X CGG repeat variation in Tamil Nadu, South India: a comparison of radioactive and methylation-specific polymerase chain reaction in CGG repeat sizing. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16(2):113-22.
28. Fatima T, Zaidi SA, Sarfraz N, Perween S, Khurshid F, Imtiaz F. Frequency of FMR1 gene mutation and CGG repeat polymorphism in intellectually disabled children in Pakistan. *Am J Med Genet A* 2014;164A(5):1151-61.
29. Rosales-Reynoso MA, Mendoza-Carrera F, Troyo-Sanromán R, Claudina M, Barros-Núñez P. Genetic Diversity at the FMR1 Locus in Mexican Population. *Arch Med Res* 2005;36:412-7.