

11216  
2º  
29



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA



## Frecuencia del Síndrome "X" Fragil en una Población de Varones con Retraso Mental

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO CIRUJANO ESPECIALISTA  
EN GENETICA CLINICA  
P R E S E N T A  
ELIZABETH CADIVICH TRIANA

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TABLA DE CONTENIDOS

	PAGINAS	
I.	INTRODUCCION	
A.	ANTECEDENTES	4
1.	HISTORIA	4
2.	ESTUDIOS DE POBLACION	5
3.	FENOTIPO CLINICO	7
4.	SITIOS FRAGILES CROMOSOMICOS	14
5.	RELACION ENTRE FENOTIPO Y EXPRESION DEL SITIO FRAGIL EN Xq 27.3	29
6.	PATRON DE HERENCIA DEL SINDROME DE "X" FRAGIL	33
7.	DIAGNOSTICO	38
8.	ANALISIS DE LIGAMIENTO EN SINDROME X FRAGIL Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL LOCUS FRAXA	51
9.	TRATAMIENTO.	61
B.	OBJETIVO	63
C.	HIPOTESIS	64
D.	JUSTIFICACION	64
II.	MATERIAL Y METODOS	66
III.	RESULTADOS	70
IV.	DISCUSION	89
V.	CONCLUSIONES	95
VI.	BIBLIOGRAFIA.	98

## RESUMEN

El síndrome de X frágil está caracterizado por retraso mental (RM) de grado variable asociado con una anormalidad citogenética inducible, un sitio frágil heredable en la porción distal del brazo largo del cromosoma X [fra(X)].

Su estudio resulta de gran interés. Por una parte, es la forma de RM hereditario más común. Presenta un patrón de herencia único y está asociado con una alteración citogenética inducible. Por otro lado, el desarrollo tan importante que ha tenido la Biología Molecular, nos ha permitido conocer un poco más de las alteraciones que presenta el locus FRAXA a este nivel; aún cuando no se ha establecido la asociación entre el mecanismo de producción a nivel molecular y su relación con el cuadro clínico.

Con este estudio nos propusimos conocer, por medio de la evaluación citogenética, la frecuencia del síndrome de X frágil en sujetos masculinos con RM, sin diagnóstico previo o causa que lo justificara. Debido a que el síndrome de X frágil puede estar asociado con retraso en el desarrollo psicomotor sin otros datos clínicos, sólo fueron incluidos pacientes con RM. Los resultados demostraron una frecuencia de 6%. Encontramos una frecuencia de RM inespecífico ligado al X de 16%. Por lo tanto se concluye que la frecuencia del síndrome en nuestro grupo de estudio fue similar a la reportada por otros autores, lo que subraya la importancia de realizar la búsqueda de fra(X) en estos grupos, permitiendo identificar a las portadoras asintomáticas de este síndrome para ofrecer un consejo genético adecuado.

## A.- ANTECEDENTES

### 1.- HISTORIA

En los últimos años, se ha llegado al conocimiento de que el síndrome de X frágil, es la forma de retraso mental hereditario más común (1). De acuerdo a los estudios realizados con anterioridad, se sabe que en la población general existe una proporción mayor de varones con retraso mental ( 25 %) con respecto a las mujeres (2).

Esta diferencia fue considerada inicialmente por Penrose en 1938 (3) y ha sido verificada posteriormente (4). Se ha sugerido por varios autores que la explicación para ello podría estar dada por la presencia de formas de retraso mental ligado al X no diagnosticadas (5). Existen más de 50 padecimientos ligados al X asociados con retraso mental, pero sus frecuencias individuales son bajas (6-11). En 1943, Martin y Bell describieron una gran familia con retraso mental, que segregaba en forma ligada al X (12). Y en la que posteriormente se demostró la presencia de X frágil (13). El sitio frágil en el cromosoma X inicialmente fue observado por Lubs en 1969 (14), y fue descrito como un cromosoma X marcador presente en los varones afectados y en las mujeres portadoras obligadas de una familia con retraso mental ligado al X. El marcador consistía en una constricción o ruptura en el extremo distal del brazo largo del X (14).

En 1977, Sutherland (15) descubre que el medio de cultivo deficiente en ácido fólico es necesario para detectar el

cromosoma marcador . Este tipo de medio era de uso general a finales de los años Sesenta y fue el empleado por Lubs (14,15). Posterior a este descubrimiento , el método es aplicado para el estudio de retraso mental ligado al X, encontrando el marcador citogenético en algunas familias, como ocurrió en la descrita por Martín y Bell, en las que se confirmó el diagnóstico de Síndrome de X Frágil (16,17). Debido al aspecto de constricción o de ruptura del cromosoma X marcador, que da una apariencia de ser susceptible a romperse, la anomalía se identificó como un sitio frágil y al cromosoma completo se le denominó X frágil. El síndrome de X frágil se refiere a la entidad clínica, y al marcador citogenético constituido por el sitio frágil en Xq27.3 se le llama X frágil, y se utiliza el símbolo génico FRAXA para designarlo (18,19).

## 2.- ESTUDIOS DE POBLACION.

Desde de la observación de retraso mental asociado con el X marcador en 1969 hasta el presente, han sido publicados cerca de 900 artículos acerca del retraso mental ligado al X en general y del síndrome de X frágil en particular (20-22).

Actualmente se ha establecido, que las formas de retraso mental ligadas al X son responsables de entre 25 y 50% de todos los casos de retraso mental. Estos afectan 1 de 296 individuos y constituyen un grupo heterogéneo pero muy importante de padecimientos. Una proporción significativa, alrededor de 40% de todos los retrasos mentales ligados al X, corresponden a una sola entidad clínica, identificada como síndrome de X frágil. El cual

se define por un fenotipo somático y neurológico característico, asociado a un sitio frágil inducible en el cromosoma X, en la banda q27.3 (23-25).

A finales de los setenta y principio de los ochenta, varios estudios reportaron que cerca de 40% de las familias con dos o más hermanos afectados con RM podrían presentar el cromosoma X frágil, al efectuarse el estudio citogenético (8). De acuerdo a esto, si en la población general encontramos que existe 25% más de varones con RM, de este grupo 40 % corresponden al síndrome de X Frágil, entonces cerca de 10 % de los varones con RM tienen un cromosoma X frágil (24,26). Estudios citogenéticos realizados a varones en instituciones para deficientes mentales han mostrado rangos de prevalencia del síndrome de X Frágil de 2 a 9% (27). Bloomquist y cols (28) realizaron un estudio de frecuencia en varones con retraso mental en una población rural sueca, encontrando una proporción de afectados de 1 en 1 500. Un gran estudio epidemiológico en Inglaterra, de Webb y cols (24) demostraron una incidencia de 1 en 1 350 varones. Diferentes autores han tratado de establecer la frecuencia del síndrome en otras poblaciones de varones con retraso mental en Inglaterra (23), Australia(25), Italia (29), Sudáfrica (30), Suecia (31) y Hawaii (32), encontrando una incidencia de 1 a 7 % en pacientes masculinos sin diagnóstico previo. Investigadores en Inglaterra y Australia, aplicando la frecuencia de este padecimiento en niños con retraso mental, estimaron, que es la causa más común, y se presenta en una proporción de 1 a 2 en 2 600 para varones, y de 1 a 2 en 4 100 mujeres. Considerándose así, la causa de RM

hereditario más frecuente en el mundo (25).

### 3.- FENOTIPO CLINICO.

El cuadro clínico de este síndrome presenta un espectro muy amplio, que en base a su expresión fenotípica podemos dividirlo en cuatro grupos: a) los varones transmisores, que no muestran datos clínicos. b) los varones afectados, que es el grupo con mayor número de alteraciones fenotípicas. c) las mujeres portadoras, quienes también cursan asintomáticas. d) las mujeres afectadas, que pueden presentar sólo dificultad para el aprendizaje, hasta RM en grado variable. De acuerdo a lo que ha sido reportado en la literatura, a continuación se describen con detalle estos grupos.

#### 3.1.- VARONES.

3.1.1.- Fenotipo.- La ausencia de características notables en el período neonatal inmediato, dificulta la identificación de estos pacientes en este período. A excepción del peso al nacimiento, que ha sido reportado como algo mayor al promedio, en los niños con síndrome de X frágil (33-37). Los datos clínicos se instalan en forma progresiva, así por ejemplo, el aumento del perímetro cefálico (>pc:75), el frontal y pabellones auriculares prominentes, e hipotonía aparecen durante la infancia. Mientras que, el prognatismo y macro-orquidismo se presentan durante la pubertad en más de 80% de los afectados. De 20 % a 60% de los pacientes cursan con paladar alto, estrabismo, miopía, pectus

excavatum, dilatación de la base aórtica, prolapso de la válvula mitral, hiperlaxitud articular en manos y pie plano. Datos que se correlacionan con displasia del tejido conectivo (35-42).

3.1.2.-Hallazgos neurológicos. Las alteraciones neurológicas ocasionalmente se presentan asociadas a este padecimiento. Dentro de las que se han reportado se enumeran: aumento de los reflejos osteotendinosos, nistagmo y crisis convulsivas de curso transitorio. Estas últimas, en sólo 10% de los pacientes y generalmente presentan buena respuesta al tratamiento (37).

3.1.3.- Alteraciones de la conducta.- En estos pacientes, el retraso mental se presenta como un dato común (80%), de severidad variable, aún dentro de los miembros de una misma familia (43-45). El coeficiente intelectual (C.I) está entre 20 y 60, con una media entre 30 y 45 (46-49).

Existen alteraciones en la conducta, que pueden ser útiles para el diagnóstico. Tales como, movimientos estereotipados de manos, y contacto visual pobre con una frecuencia de 60 y 90 % respectivamente. Los pacientes con retraso mental moderado, con cierta frecuencia tienen callosidades en manos por mordeduras , pero es raro encontrar signos de automutilación (48,49).

El patrón de lenguaje también se encuentra afectado en aquéllos con retraso mental moderado o un C.I limítrofe. Este consiste en tartamudeo, lenguaje rápido, de escaso contenido, con frases cortas, repetitivas y ecolalia. Los pacientes con retraso mental severo o profundo, con frecuencia no desarrollan el lenguaje (49-52).

Los problemas de atención, en la mayoría de los casos, se asocian con hiperactividad. Los niños en edad escolar suelen ser envidados por este motivo, aunque, después de un cuidadoso interrogatorio, se encuentran también asociados retraso del lenguaje, estereotipias tales como aplauso iterativo o mordedura de manos. La hiperactividad es más notable durante la etapa prepuberal, interfiriendo con el aprendizaje escolar. En la etapa postpuberal, la actividad disminuye, aunque persisten los problemas de atención hasta la etapa adulta (37,46).

Los pacientes, usualmente son dóciles y amables, sin embargo, en una minoría se han observado episodios de conducta violenta, que han requerido de internamiento en instituciones para enfermos mentales (37,49).

Existe una estrecha asociación de este síndrome con autismo (53). Esto ha sido demostrado por la presencia del síndrome de X frágil en poblaciones de autistas. Entre los varones autistas varía la positividad para fra(X) entre 5.3 y 15.7% (53-57).

Por otra parte, entre los varones con síndrome de X frágil, tenemos un espectro de datos de autismo. Hagerman y cols (54) reportaron una frecuencia de 16% con diagnóstico de autismo infantil basados en los criterios de DSM-III ( American Psychiatric Association 1980). Que incluyen: edad de inicio antes de los 30 meses de edad, ausencia de respuesta hacia otras personas, grandes deficiencias en el desarrollo del lenguaje, patrón de lenguaje peculiar, respuestas bizarras a estímulos ambientales y ausencia de alucinaciones. Sin embargo, la mayoría

de sus pacientes mostraron : pobre contacto visual y moderada tendencia al aislamiento. Otros datos de tipo autista, reportados con frecuencia son: estereotipias, fascinación por algunos objetos y reacciones violentas hacia los cambios ambientales (57).

### 3.2.- VARONES TRANSMISORES.

La mayoría de los varones hemicigotos para la mutación de X frágil presentan alguna de las anomalías descritas. Sin embargo, una minoría parece ser clínicamente normal y sin expresión del sitio frágil en el cromosoma X, (58-62).

Estos varones hemicigotos, clínicamente normales, han sido denominados varones transmisores. Su existencia como portadores obligados del gen, sólo puede ser inferida por su posición en el árbol genealógico, más que por los datos clínicos o hallazgos citogenéticos. Los análisis de segregación del síndrome de X frágil en los descendientes de mujeres portadoras obligadas, muestran que sólo 40 % de los varones descendientes están afectados, en lugar de 50 % esperado para los padecimientos ligados al X con penetrancia completa (60,61). No existe evidencia de letalidad para varones in útero, ni alteración en la proporción de sexos al nacimiento. Estos datos sugieren, que los varones transmisores podrían constituir 20 % de todos los varones que portan la mutación (61).

### 3.3.- FENOTIPO CLINICO EN MUJERES.

Las pacientes femeninas heterocigotas, tienen un gran espectro de

alteraciones secundarias a la presencia del gen FRAXA. Pueden ser normales, o cursar con retraso mental leve, moderado o severo, o bien, presentar autismo (37,63,64). Aproximadamente un tercio de las mujeres heterocigotas cursan con retraso mental moderado, pero un número importante de las mujeres heterocigotas con C.I. normal presentan dificultad para el aprendizaje (63).

El por qué de esta gran variabilidad clínica, aún no ha sido bien explicado. Existe una correlación positiva entre la proporción del cromosoma marcador Fra(X) y retraso mental entre las mujeres heterocigotas. Esto es, que las mujeres heterocigotas con retraso mental, generalmente presentan un elevado porcentaje de células con el cromosoma marcador, mientras que las heterocigotas no afectadas, lo presentan en baja proporción (1 %) (47).

Sherman demostró que 40 % de heterocigotas no expresan el sitio frágil, aún cuando son portadoras obligadas (43).

Algunos investigadores sugieren que existe correlación entre el retraso mental y el proceso de inactivación del X frágil. Las heterocigotas normales o no afectadas clínicamente, tienden a tener una proporción mayor de células con el cromosoma X frágil inactivo. En cambio, las heterocigotas más afectadas presentan mayor porcentaje de células con el cromosoma X frágil activo (59,63). Por lo que se considera que el patrón de inactivación del cromosoma X en heterocigotas con el síndrome, tiene gran influencia sobre el desarrollo mental (63).

Se aplicaron las escalas de inteligencia de Weschler para niños

en niñas en etapa escolar, hermanas de varones afectados. Se encontró pobre capacidad para la aritmética, empleo de números, diseño de formas, pero con un C.I. dentro de lo normal (65).

Frecuentemente presentan dificultad para el aprendizaje y reciben ayuda especial, especialmente en aritmética. Estos datos también se han reportado para las madres heterocigotas, clínicamente normales, con un C.I. normal ( 63-66).

Un estudio reciente, de 7 niñas FRAXA (+) mostró como datos clínicos constantes : sobrepeso desde el nacimiento y problemas de conducta, tales como falta severa de atención , ansiedad y timidez con tendencia al aislamiento. Estos parecerían ser los criterios clínicos de selección más importantes para la detección del síndrome de X frágil, en mujeres en general y especialmente en niñas prepúberes (67).

Se han realizado muy pocos estudios , para documentar la presencia de datos clínicos tanto en mujeres heterocigotas no afectadas, como en las afectadas con retraso mental (66). Reportes aislados han demostrado la presencia de frontal alto, pabellones auriculares prominentes, prolapso de válvula mitral e hiperextensibilidad articular en ambos grupos de mujeres heterocigotas (33,39,40). En otro estudio, de 144 mujeres portadoras obligadas, 34% tuvieron deficiencia mental y más de 50% fueron citogenéticamente negativas (68). Reiss (69) estudió clínicamente a 125 heterocigotas, en las cuales encontró que 28% presentaron cara grande, frontal prominente, aumento del perímetro cefálico y ocasionalmente pabellones auriculares

grandes y evertidos. En las heterocigotas con retraso mental son más notables estas alteraciones fenotípicas, estando presentes en más de 50 % de los casos . Problemas psiquiátricos incluyendo psicosis fueron vistos en 10 % de las pacientes sin retraso mental y 20% de aquéllas con retraso mental. En una familia afectada, se encontró relación entre trastornos afectivos mayores y estado de portadoras (69).

#### 3.4.- ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

El examen histológico de los tejidos afectados, no ha permitido unificar criterios para correlacionar los procesos bioquímicos o fisiológicos que expliquen las anormalidades somáticas y la disfunción neurológica (70).

Un estudio realizado en cinco varones afectados, en biopsia de piel del antebrazo, mostró elastina con arborización incompleta o ausente en la dermis papilar y aumento de la fragmentación de las fibras de elastina en la dermis reticular profunda, comparada con la de los controles (71).

El testículo está caracterizado por un aumento de volumen intersticial, con tejido conectivo en exceso, incluyendo aumento en las fibras de colágeno peritubular (72). También se han reportado, alteraciones en la diferenciación de espermátides, tal vez debida a la presión existente en los túbulos seminíferos por el edema (73). Los niveles de secreción hormonal de gonadotropinas y esteroides han sido normales y no explican las alteraciones en testículo (74).

En los varones prepúberes generalmente no se encuentran alteraciones histológicas, a este nivel (33), aunque se han reportado anomalías en fetos masculinos afectados (73,75).

En las mujeres afectadas, se ha reportado crecimiento ovárico secundario a cambios quísticos, sugiriendo que, en mujeres al igual que en los varones, las gónadas podrían estar alteradas (76).

Existe sólo un reporte de un estudio neuropatológico, realizado en el cerebro de un hombre de 62 años de edad, con diagnóstico de X frágil, que mostró cambios degenerativos inespecíficos menores en dendritas espinales y estructuras sinápticas corticales (77). Recientemente, se llevó a cabo la investigación de alteraciones anatómicas en el sistema nervioso central de pacientes femeninas con síndrome de X frágil por medio de resonancia magnética. Se encontró disminución en el tamaño del vérmix posterior y aumento en el tamaño del cuarto ventrículo. Estos datos sugieren, que las anomalías en el neurodesarrollo de esta región, podrían estar asociadas con funciones sensoriales y del lenguaje, más que con habilidades cognitivas generales (78).

Sin embargo, la patogénesis de las anomalías encontradas en este padecimiento aún no ha sido aclarada.

#### 4.- SITIOS FRAGILES CROMOSOMICOS.

##### 4.1.- DEFINICION.

Un sitio frágil es un punto específico de un cromosoma,

susceptible de ruptura. Generalmente, se presenta como una hendidura no teñida o como una constricción que puede incluir una o ambas cromátides de un cromosoma en metafase (79). Ocasionalmente, este sitio puede presentar ruptura completa, produciendo un fragmento acéntrico, el cual puede ser deletado o duplicado por no disyunción mitótica ( configuración trirradial). La mayoría de los sitios frágiles no se presentan espontáneamente bajo las condiciones de cultivo rutinarias, por lo que deben ser inducidos por exposición de las células a alguna de las distintas condiciones del medio de cultivo o tratamientos con fármacos, durante la fase S (síntesis) previa a mitosis. Todos los métodos de inducción para sitios frágiles, producen rupturas cromosómicas al azar, así que, por definición, un sitio frágil es cualquier región cromosómica ( mancha caliente o "hot spot") donde se produzca una ruptura cromosómica con una frecuencia significativamente mayor que la observada por un evento al azar (18,80).

Los estudios para sitios frágiles, se realizan observando cromosomas en metafase, empleando microscopio de luz. Existe sólo un reporte de análisis en microscopio electrónico, del sitio frágil en Xq27 (81). Este estudio demostró que el fragmento distal del sitio frágil permanece unido al segmento proximal del cromosoma por una fibra de 25 nm, tamaño que coincide con el diámetro aproximado de una sola fibra de cromatina normal.

#### **4.2.- SITIOS FRAGILES RAROS Y COMUNES.**

4.2.1.- Clasificación.- Existen más de 110 sitios frágiles en

el genoma humano, que han sido divididos en dos grandes categorías: raros y comunes (18). Un sitio frágil raro, es aquél que encontramos en una minoría de la población, generalmente en menos de 1% (18).

Por lo regular afecta sólo un homólogo del par cromosómico, y es heredado en forma mendeliana codominante. Se han reportado veinte sitios frágiles raros, que han sido identificados en 13 autosomas y en el cromosoma X (18,82,83).

La mayoría de los sitios frágiles raros son folato - sensibles, y pueden ser inducidos por cualquiera de las siguientes tres formas de cultivo: medio deficiente en ácido fólico y timidina; medio que contenga un antagonista del folato como metotrexate; o un medio con adición de fluorodeoxiuridina (FUdR) como inhibidor de la timidilato sintetasa. Tres sitios frágiles raros no son folato-sensibles, de éstos, dos se expresan con frecuencia en forma espontánea, pero se inducen preferentemente con distamicina A y compuestos relacionados y otro es inducido de forma específica por bromodeoxiuridina (BUdR) (Tabla I) (18).

Los sitios frágiles comunes fueron descubiertos recientemente (79,84-86). Como su nombre lo indica, están presentes en la mayoría de la población y se encuentran en ambos homólogos del par cromosómico. Hasta el momento, han sido reportados aproximadamente 110 de estos sitios que están presentes por todo el genoma humano (TablaII) (18,19). La mayoría de estos sitios, son sensibles principalmente a la inducción con afidicolina (APC) (85), aunque un pequeño número se induce por 5-azacitidina

**TABLA I**  
**SITIOS FRAGILES RAROS**

CONDICION DE CULTIVO	NO. DE CROMOSOMA	BANDA	SIMBOLO*
SITIOS FRAGILES RAROS FOLATO SENSITIVO O POR ANTAGONISTAS DE AF (GRUPO 1)	1	q21.3	FRA1M
	2	q11.2	FRA2A
		q13	FRA2B
		q22.3	FRA2K
	6	p23	FRA6A
	7	p11.2	FRA7A
	8	P22.3	FRA8A
	9	p21.1	FRA9A
		q32■	FRA9B
	10	q23.3	FRA10A
		q24.2	FRA10B
	11	q13.3	FRA11A
		q23.3■	FRA11B
	12	q13.1	FRA12A
		q24.13	FRA12D
	16	p12.3	FRA16A
	19	p13	FRA19B
20	p11.23	FRA20A	
22	q13	FRA22A	
X	q27.3	FRAXA	
TRATAMIENTO CON DISTAMICINA A (GRUPO 2)	8	q24.1■	FRA8E
	11	p15	FRA11I
	16	q22.1■	FRA16B
	17	p12	FRA17A
TRATAMIENTO CON BROMODESOXIURIDINA (GRUPO 3)	10	q25.2■	FRA10B
	12	q24.2	FRA12C
NÓ CLASIFICADO	8	q13	FRA8F

VERNA, 1989 (18)

\* SIMBOLOS ASIGNADOS EN EL OCTAVO TALLER INTERNACIONAL DE  
MAPEO DEL GENOMA HUMANO (18).

■ SF RAROS QUE COINCIDEN EN LOCALIZACION CON SF COMUNES.

TABLA II  
SITIOS FRAGILES COMUNES

CONDICION DE CULTIVO	NO. DE CROMOSOMA	BANDA	SIMBOLO*	
TRATAMIENTO CON AFIDILCOLINA (GRUPO 1)	1	p36	FRA1A	
		p32	FRA1B	
		p31.2	FRA1C	
		p22	FRA1D	
		p21.2	FRA1E	
		q21	FRA1F	
		q25.1	FRA1G	
		2	p24.2	FRA2C
			p16.2	FRA2D
			p13	FRA2E
	q21.3		FRA2F	
	q31		FRA2G	
	q32.1		FRA2H	
	q33		FRA2I	
	3		p24.2	FRA3A
			p14.2	FRA3B
	4		q23	FRA3C
		p16.1	FRA4A	
		p15	FRA4D	
		q231	FRA4C	
	5	q15	FRA5D	
		q31.1	FRA5C	
		6	p25.1	FRA6B
			p22.2	FRA6C
	q13		FRA6D	
	7	q21	FRA6F	
		q26	FRA6E	
		p22	FRA7B	
		p14.2	FRA7C	
		p13	FRA7D	
		q21.2	FRA7E	
		q22	FRA7F	
q31.2		FRA7S		
q32.3		FRA7H		
q36		FRA7I		
8	q22.1	FRA8B		
	q24.1■	FRA8C		
	q24.3	FRA8D		
9	q22.1	FRA9D		
	q32■	FRA9E		

TABLA II (CONTINUACION)

TRATAMIENTO CON AFIDILCOLINA (GRUPO 1)	10	q22.1	FRA10D
		q25.2■	FRA10E
		q26	FRA10F
	11	p15.1	FRA11C
		p14.2	FRA11D
		p13	FRA11E
		q13	FRA11H
		q14.2	FRA11F
		q23.3■	FRA11G
	12	q21.3	FRA12B
		q24	FRA12E
	13	q13.2	FRA13A
		q21.2	FRA13C
	14	q23	FRA14B
		q24.1	FRA14C
	15	q22	FRA15A
	16	q22.1■	FRA16C
		q23.2	FRA16D
	17	q23.1	FRA17B
	18	q12.2	FRA18A
		q21.3	FRA18B
	19	q13	FRA19A
20	p12.2	FRA20B	
22	q12.2	FRA22B	
X	p22.31	FRAXB	
	q22.1	FRAXC	
	q27.2	FRAXD	
TRATAMIENTO CON 5-AZACITIDINA (GRUPO 2)	1	q12	FRA1J
		q42	FRA1H
	9	q12	FRA9F
TRATAMIENTO CON BUdR (GRUPO 3)	4	q12	FRA4B
	5	p13	FRA5A
		q15	FRA5B
	9	p21	FRA9C
	10	q21	FRA10C
	13	q21	FRA13B
NO CLASIFICADOS (GRUPO 4)	4	q27	FRA4E
	Y	q12	FRA4A

VERNA, 1989 (18)

\* SIMBOLOS ASIGNADOS EN EL OCTAVO TALLER INTERNACIONAL DEL MAPEO DEL GENOMA HUMANO (18).

■ SF COMUNES QUE COINCIDEN EN LOCALIZACION CON SF RAROS.

BUdR = BROMODESOXIUridINA

o BUDR (Tabla II) (87).

La posible relación entre sitios frágiles raros y comunes, aún no ha sido dilucidada. La mayoría de los sitios frágiles comunes son inducidos débilmente por las condiciones que producen los sitios folato-sensibles y los sitios raros folato-sensibles son inducidos pobremente por APC. Aunque los mecanismos de inducción parecerían distintos, resulta inexplicable porqué de los 27 sitios frágiles raros, seis ocurren en la misma banda cromosómica que un sitio frágil común. Estos son: 8q22, 9p21, 9q32, 10q25, 11q23, y 16q22 (18). Esta coincidencia en la localización, permite suponer, que cuando menos algunos sitios frágiles raros podrían representar mutaciones o alteraciones de sitios frágiles comunes preexistentes (86,88). Por ejemplo, en las células cancerosas encontramos correlación entre la localización de sitios frágiles y puntos de ruptura de los rearrreglos cromosómicos específicos, sugiriendo que éstos podrían estar participando en la carcinogénesis (88,89,90). Así mismo, ha sido propuesto que los sitios frágiles podrían estar conservados evolutivamente y servir para un propósito práctico (82): la ruptura de los sitios frágiles podría promover recombinación de exones y tener un significado en la evolución (91). Al realizar análisis de recombinación de marcadores que flanquean un sitio frágil en células somáticas híbridas, se observó que efectivamente ocurre una ruptura en los sitios frágiles (92).

4.2.2.- Significado Clínico de los Sitios Frágiles. De todos los sitios frágiles, raros y comunes, solamente el sitio en Xq27.3 ha sido asociado con una entidad clínica y retraso mental

(48). Debido a que en los sitios frágiles pueden observarse deleciones (79,80), es obvio que en ellas ocurre una verdadera ruptura, favoreciendo la formación de rearreglos cromosómicos (93).

De acuerdo con esto, experimentos recientes han demostrado que en ambos grupos de sitios frágiles pueden ser inducidos rearreglos cromosómicos con medios de cultivo adecuados y prolongando el período de crecimiento celular (88,94). Estos datos sugieren la posibilidad de que los sitios frágiles podrían predisponer para deleciones constitutivas o translocaciones. Estudios retrospectivos de la localización de los puntos de ruptura de los rearreglos cromosómicos, nos indican que éstos se ubican preferentemente en las bandas con sitios frágiles (89,95). Existen algunos reportes de casos de translocaciones de novo (96) o deleciones asociados con un sitio frágil raro, originado en alguno de los padres (90,97). Sin embargo, existen pocos reportes al respecto con correlación clínica. Por ello resulta prematuro considerar a los sitios frágiles como factores de riesgo para anomalías cromosómicas.

Comparaciones retrospectivas similares acerca de la localización de los sitios frágiles raros y comunes con respecto a los puntos de ruptura de las translocaciones observadas en leucemias y otros tipos de neoplasias malignas, han sugerido que existe correlación positiva entre éstos (98). En algunos casos han sido observados los sitios frágiles raros, en células normales de individuos con rearreglos cromosómicos que implica dicha región, en células malignas (98,99). Esta asociación, se ha visto entre el sitio

frágil raro en 16q22 y el punto de ruptura en 16q22, asociado con inversiones, deleciones o translocaciones presentes en leucemia mielomonocítica aguda. Sin embargo, recientemente se demostró que el sitio frágil y el punto de ruptura en cáncer, no son idénticos a nivel molecular, hecho que disminuye la posibilidad de una relación causal (100). Se requiere de análisis molecular, para otros sitios frágiles y los puntos de ruptura en cáncer, para que cualquier asociación posible sea descartada o verificada.

#### 4.3.- INDUCCION DE LA EXPRESION DE SITIOS FRAGILES.

Debido a su importancia clínica el sitio frágil Xq27.3 ha sido el centro de atención de numerosas investigaciones, para determinar las condiciones óptimas para su expresión y definir su mecanismo bioquímico. Estas condiciones han sido idénticas, a las requeridas para la expresión de otros sitios frágiles sensibles a folato. También, éstas se han comparado con las características de inducción de los sitios frágiles comunes, que requieren de APC para su expresión (18,82).

4.3.1.- Sitios frágiles folato-sensibles.- Sutherland fue el primero en demostrar que la expresión de los sitios frágiles en linfocitos de sangre periférica, es dependiente del tipo de medio de cultivo empleado (17). La expresión del sitio frágil Xq27 era inducida con el medio de cultivo M 199, pero no con otros medios de cultivo disponibles comercialmente (101). Estudios posteriores permitieron reconocer que las características principales del M

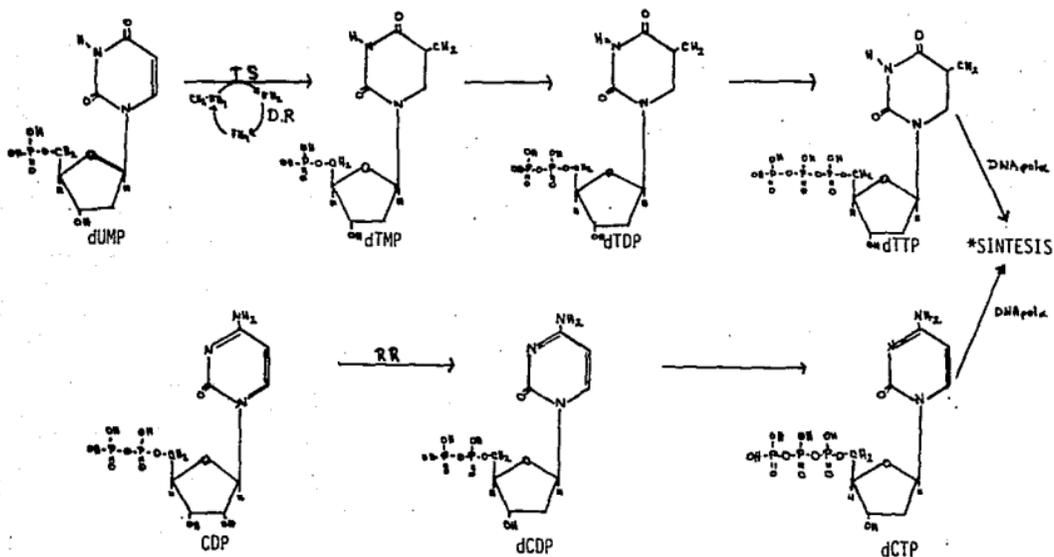
199 eran las concentraciones relativamente bajas de ácido fólico y timidina. Además, podía ser inducido con metotrexate por ser antagonista de folatos (79).

Los sitios folato-sensibles son inducidos notablemente por FUDR, ya que su metabolito 5-fluorodeoxiuridil monofosfato (FdUMP) es un potente inhibidor de la enzima timidilato sintetasa (TS) (101,102). La expresión del sitio frágil Xq27 también es inducida en células híbridas deficientes en TS, cuando se depriva la timidina exógena (92). Estas condiciones de inducción deben estar presentes en la fase S previa a la mitosis, momento en el que su expresión es observada. La presencia de ácido fólico o de timidina pueden suprimir por completo la expresión del sitio frágil que había sido inducido por deficiencia de folato o con metotrexate (79), aunque solamente la timidina puede revertir los efectos de la acción de FUDR (82). Así, la depleción de trifosfato timidina (dTTP) durante la fase S, ya sea por inhibición o ausencia de TS a través de la depleción de su cofactor metilen-tetrahidrofolato, es un método efectivo, pero no exclusivo para inducir el sitio frágil en Xq27 (82,92, 101,102). Recientemente, se ha observado que concentraciones elevadas de timidina ( 1-2 mM) pueden inducir el sitio frágil en Xq27 en forma efectiva (83,91,103). Este efecto parece estar dado por los niveles elevados de dTTP, los cuales inhiben la reducción de citidina difosfato (CDP) por la ribonucleótido reductasa, causando deficiencia de deoxicitidina trifosfato (dCTP) para la síntesis de DNA (104). Este mecanismo para inducción del sitio frágil en Xq27, se apoya en el dato de que la adición de

deoxicitidina inhibe la inducción por las elevadas concentraciones de timidina (91,103). El mecanismo de producción de los sitios frágiles, está de acuerdo al inductor empleado y al nivel en que actúa en la correspondiente vía metabólica, esquematizado en la Figura 1 (82,92,101,102).

El aporte de dTTP puede ser depletado por inhibición directa de TS con FdUMP, e inhibiendo indirectamente a TS ya sea por reducción del ácido fólico con metotrexate o por limitación del ácido fólico en el medio. Elevadas concentraciones de timidina, a través de su metabolito dTTP, disminuyen en forma importante el aporte de dCTP por inhibición de la retroalimentación alostérica, por la reducción de CDP a dCDP por acción de la ribonucleótido reductasa. A partir de esto, parecería que todas las condiciones de inducción tendrían como vía metabólica común, la disminución del aporte celular de dTTP o dCTP disponibles para la síntesis de DNA (7).

4.3.2.- Sitios frágiles comunes.- Estos sitios frágiles son inducidos débilmente por deficiencia de ácido fólico, metotrexate o FUDR. El empleo de 0.2uM de afidicolina (APC) los induce fuertemente (85). APC es un inhibidor relativamente específico de la enzima DNA polimerasa  $\alpha$ , la cual actúa en la replicación del DNA, sin ser la única enzima participante en este proceso (85). APC inhibe a la DNA polimerasa por competencia con dCTP (105). Esta concentración de APC es un inductor débil del sitio frágil en Xq27.3 (85,106). Como un dato interesante, se ha visto, que la expresión del X frágil disminuye al utilizar APC, combinada con deprivación de timidilato (85).



1= TIMIDILATO SINTETASA  
 2= DIHIDROFOLATO REDUCTASA  
 3= RIBONUCLEOTIDO REDUCTASA  
 4= DNA POLIMERASA ALFA  
 FH4= ACIDO TETRAHIDROFOLICO  
 CH2= N5-N10-METILEN-TETRAHIDROFOLICO  
 FH2= ACIDO DIHIDROFOLICO

dUMP= DESOXIURIDINA MONOFOSFATO  
 dTMP= DESOXITIMIDINA MONOFOSFATO  
 dTDP= DESOXITIMIDINA DIFOSFATO  
 dTTP= DESOXITIMIDINA TRIFOSFATO  
 CDP= CITIDINA DIFOSFATO  
 dCDP= DESOXICITIDINA DIFOSFATO  
 dCTP= DESOXICITIDINA TRIFOSFATO

\*SINTESIS DE DNA. ADEMÁS DE LOS NUCLEOTIDOS PRESENTES EN ESTE ESQUEMA, SE REQUIERE DE LOS OTROS NUCLEOTIDOS Y DE LAS ENZIMAS NECESARIAS PARA QUE SE LLEVE A CABO ESTE PROCESO.

FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS RUTAS BIOSINTÉTICAS DE LOS NUCLEOTIDOS Y DE LAS ENZIMAS QUE ESTÁN IMPLICADAS EN LA EXPRESIÓN DE LOS SITIOS FRÁGILES

4.3.3.- Amplificación de la expresión de sitios frágiles con cafeína.- Yunis y Soreng (86) recientemente han demostrado que la cafeína en dosis de 2 mM, en conjunto con FUDR amplifica significativamente los niveles de expresión de los sitios frágiles comunes y del sitio frágil raro en Xq27. Aunque otros autores no han logrado reproducir este hallazgo para X frágil en linfocitos o en linfoblastos (106-108), se ha demostrado que la cafeína amplifica la expresión de X frágil en células somáticas híbridas (108). La cafeína o su análogo teofilina, también amplifican la expresión inducida por APC del sitio frágil Xq27 y de los sitios frágiles comunes en linfocitos, linfoblastos y células somáticas híbridas (108).

La cafeína tiene un efecto sinérgico con muchos agentes que dañan al DNA (109). Su efecto es predominantemente indirecto, disminuyendo el retraso mitótico asociado. Generalmente cuando existe daño al DNA se presenta retraso mitótico, la cafeína disminuye éste, al permitir la terminación del ciclo aún cuando exista daño (110,111). En un sistema híbrido, deficiente en timidilato sintetasa (TS), se demostró directamente que a las 24 horas de privación de timidina, existe un retraso de 3 a 4 horas en la aparición de células mitóticas, después de realimentarlas con timidina. La cafeína aminora este retraso en el período G 2, aumentando además la expresión del sitio frágil en Xq27 (108).

Los resultados con cafeína sugieren que, tanto para los sitios frágiles comunes como para los sitios raros folato-sensibles, su

aparición citogenética podría ser el resultado de una falla para completar la replicación del DNA o en la reparación previa al inicio de la mitosis (112).

#### 4.4.-BASES MOLECULARES DE LOS SITIOS FRÁGILES.

4.4.1.-Mecanismos de Inducción de Sitios Frágiles.- Las vías metabólicas de las células en crecimiento que bajo ciertas condiciones de inducción permiten la expresión del sitio frágil Xq27, así como de otros sitios frágiles raros y comunes, son desconocidas. Sin embargo, se tiene conocimiento de que los sitios frágiles raros son heredados de forma mendeliana codominante; por lo que podrían ser resultado de una modificación específica en la secuencia del DNA (18).

Las únicas claves para conocer la naturaleza de estas secuencias son las condiciones de cultivo, que producen su expresión citogenética. Sin embargo, las diferencias en la sensibilidad a distintos métodos de inducción de los sitios frágiles raros y comunes, no significan necesariamente que las bases moleculares sean fundamentalmente distintas para ambas clases (82,101). Para la expresión del sitio frágil en Xq27, es necesaria la deprivación de desoxirribonucleósidos trifosfato de pirimidina (82,91,103). La disminución de los niveles de dTTP de pirimidina, disminuye la velocidad de replicación del DNA (104). Además, cuando las concentraciones de dTTP o dCTP son muy limitadas para la síntesis de DNA, pueden ocurrir marcados desbalances en las

reservas de nucleótidos pirimídicos, permitiendo la incorporación errónea de desoxiuridilato por timidilato, o timidilato por desoxicitidilato (113,114). Alternativamente, esta incorporación errónea, podría dar lugar a un estado continuo e ineficiente de reparación para la excisión de las bases mal incorporadas, como resultado de este severo desbalance en la reserva de nucleótidos (101,115,116). En tales casos una región de DNA parcialmente reparada o mal replicada, puede tener una apariencia de cromatina descondensada o de hendidura, cuando debe condensarse para la mitosis (112). Finalmente, se ha sugerido que la incorporación de uracilo por timina, bajo condiciones de deficiencia severa de dTTP, podría por sí misma, interrumpir la conformación de la cromatina, por un mecanismo independiente de replicación o reparación del DNA y permitir la presencia citogenética del sitio frágil (116,117).

5.- RELACION ENTRE EL FENOTIPO Y LA EXPRESION DEL SITIO FRAGIL  
EN Xq 27.3.

5.1.- VARONES.

Se ha estimado en base a análisis de segregación que solamente 80% de los varones que llevan la mutación de X frágil, están afectados clínicamente (43,44). De estos varones afectados, sólo 1% no tienen expresión citogenética del marcador.

Aún cuando la mutación se presenta en cada una de las células, la expresión del sitio frágil Xq27, sólo es vista en una minoría de las células en metafase. Bajo condiciones óptimas de inducción la presencia del sitio frágil no es mayor de 50 %, manteniendo un rango de expresión entre 10 y 50%. La frecuencia de expresión para un individuo es relativamente constante, si el examen se realiza en el mismo laboratorio y bajo los mismos métodos de inducción [ Tabla III] (118,119).

Por otra parte , se encuentran diferencias significativas en el nivel de expresión citogenética del fra (X) en los descendientes afectados . Sin embargo, esta variación es mayor entre individuos no relacionados, que dentro de una misma familia afectada (120), indicando la presencia de algunos factores familiares que influyen en los niveles de expresión (43).

La mayoría de los estudios en varones no han demostrado correlación entre el nivel de expresión de X frágil y el grado de retraso mental (43).

Se ha estimado que 20% de los varones portadores de la mutación X frágil, son normales clínicamente, por lo que se les ha

TABLA III.

CORRELACION DE NIVELES DE EXPRESION CITOGENETICA

E.C	SEXO					
	Varón (%)			Mujer (%)		
	RETRASO MENTAL	NORMAL	TOTAL	RETRASO MENTAL	NORMAL	TOTAL
(+)	79	Raro	79	27	26	53
(-)	1	20	21	3	44	47
T	80	20	100	30	70	100

E.C= expresión citogenética.

El porcentaje de varones X frágil negativo con un C.I normal, es un estimado teórico, basado en la falta de penetrancia del gen en 20 % de los descendientes de mujeres portadoras obligadas (43,44). La frecuencia de varones normales portadores, que transmiten la mutación a sus nietos afectados, es menos frecuente (44).

denominado varones portadores (43) [Tabla III]. Estos generalmente, son identificados por la posición que ocupan dentro del árbol genealógico, ya que no presentan el cromosoma marcador (43,60,61). Sin embargo, datos recientes utilizando células somáticas híbridas, demostraron una expresión de X frágil mayor de 12 % en dos varones transmisores, no emparentados (120). Este resultado es significativamente menor, que el de los varones afectados y mayor que el de los controles normales. Datos, que apoyan la evidencia de una mutación parcial o premutación en los varones transmisores (121,122).

#### 5.2.- MUJERES.

La relación entre expresión citogenética y fenotipo clínico en mujeres heterocigotas, para la mutación de X frágil es más complicada. Existen cuatro categorías de mujeres portadoras: (1) clínicamente normales, X frágil negativo; (2) clínicamente normales, X frágil positivo; (3) con retraso mental, X frágil positivo y (4) con retraso mental, X frágil negativo (Tabla III) (43).

Aproximadamente dos tercios de las mujeres portadoras obligadas, son intelectualmente normales. De éstas, la mayoría no tendrá expresión citogenética del X frágil; pero una proporción menor de 5% lo expresa (43). Por ello, la detección de una portadora, previa al nacimiento de un hijo afectado es imposible para cerca de la mitad de las mujeres que llevan la mutación. En aquéllas con retraso mental, 90% son X frágil positivo y la frecuencia promedio de expresión es algo menor que para los varones

afectados. En las mujeres a diferencia de los varones, sí existe una correlación positiva entre el grado de retraso mental y el nivel de expresión citogenética (43).

Las causas para esta variación tan amplia en la expresión fenotípica y citogenética en las mujeres heterocigotas, aún no son conocidas. Una posibilidad, sería que las mujeres portadoras son el equivalente de los varones transmisores, y que como ellos, portan alteraciones en Xq27, sin ser aparentes fenotípica ni citogenéticamente. Sin embargo, un gran número de mujeres, clínicamente sanas y que no muestran expresión citogenética del marcador, no pueden ser consideradas como la contraparte femenina de los varones transmisores. Otra explicación complementaria, alude a la variación en el patrón de inactivación del cromosoma X; entonces, mujeres clínicamente afectadas podrían tener una proporción mayor del cromosoma X activo que lleva la mutación (123,124).

Al respecto existe un reporte de particular interés, acerca de unas gemelas heterocigotas para X frágil, siendo una de ellas intelectualmente normal y la otra con retraso mental (125). Ambas mostraban una expresión citogenética del marcador de 7%, pero en la gemela normal el X frágil era el cromosoma X activo en sólo 30% de las células, mientras que en su hermana afectada, el cromosoma con la mutación estaba activo en 85% de sus células (125).

Se han realizado numerosos estudios en mujeres portadoras, para lograr una correlación entre su estado clínico y la expresión del

marcador, con resultados contradictorios. Cuatro estudios concluyeron que la inteligencia se correlaciona con el patrón de inactivación (126-129) y otros tres afirmaron que no hay tal relación (130-132).

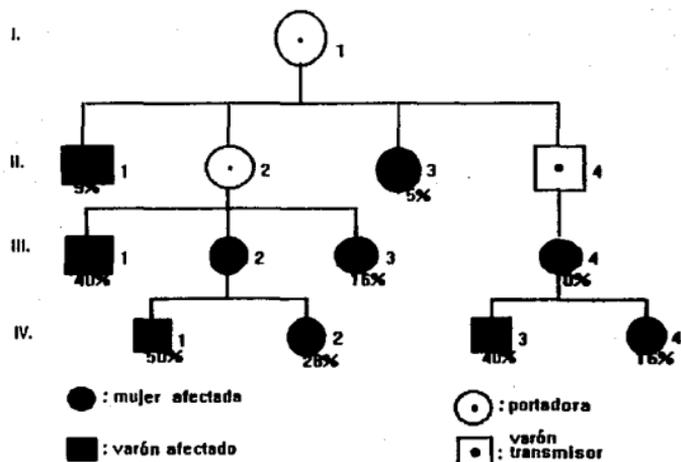
Este tipo de estudios, son técnicamente difíciles de realizar, ya que el método empleado para marcar al cromosoma X de replicación tardía, suprime la expresión del X frágil. Aunque los resultados experimentales no son concluyentes, permiten una explicación atractiva en cuanto a que el patrón de inactivación del X, tenga un papel determinante en el estado intelectual de las portadoras.

#### 6.- PATRON DE HERENCIA DEL SINDROME DE X FRAGIL.

Han sido reportadas numerosas familias, con síndrome de X frágil, que presentaban un patrón de herencia ligado al X (24,32). Actualmente se considera, como dominante ligado al X, de penetrancia incompleta y modificado por el patrón de inactivación del X (124).

La existencia de varones transmisores y su tendencia para agruparse de forma particular entre los descendientes de familias afectadas, fue notada desde los primeros estudios (58-61). El análisis del árbol genealógico de una familia afectada con este síndrome, fue hecho de manera formal por Sherman y colaboradores, quienes afirmaron que el patrón de herencia representa una forma única, dentro de la genética humana (43,44). Los principales datos de su análisis, están resumidos en un árbol genealógico hipotético, descrito en la Figura 2 (43).

Figura 2. ARBOL HIPOTETICO DE SHERMAN [43].



El estado clínico de la madre que transmite la mutación para el síndrome de X frágil, parece afectar la penetrancia del retraso mental en los descendientes. Los descendientes de las mujeres portadoras mentalmente normales, sus hijos (III-1) e hijas (III-3) tienen una incidencia de retraso mental de 40 y 16 % respectivamente. De ésto se deduce que, la penetrancia en varones es de 80 % y en mujeres de 32 %, cuando la mutación es heredada de una mujer portadora normal. Comparativamente, una mujer con retraso mental (III-2) tiene una probabilidad de 50% de heredar el retraso mental a sus hijos y de 28 % para sus hijas, con una penetrancia de 100 % para los varones y 56 % para las mujeres (43).

El sexo del padre normal, que transmite la mutación para X frágil, tiene un gran efecto sobre la penetrancia del RM en los descendientes. Por ejemplo, todas las hijas (III-4) de los varones transmisores (II-4), heredan la mutación para el síndrome de X frágil y por lo regular son clínicamente normales, implicando una penetrancia de 0 %. En contraste, las hijas (III-3) de mujeres portadoras normales (II-2), tienen 50 % de riesgo de heredar la mutación y en promedio sólo 16 % de ellas muestran RM con una penetrancia de 32 % (43).

El riesgo de RM en los descendientes de una mujer portadora clínicamente normal, depende de la presencia o ausencia de un varón transmisor entre ellos. El riesgo de RM en los hijos (III-1) e hijas (III-3) de mujeres mentalmente normales (II-2) es de 40 % y 16 % respectivamente. Sin embargo, los descendientes de los varones transmisores (II-4), parecen tener un riesgo mucho

más bajo de RM. Solamente 9 % de los hijos (II-1) y 5 % de las hijas (II-5) de madres portadoras (I-1) presentan RM (43).

Estudios familiares detallados, incluyendo análisis citogenético, se han realizado en familias donde se presenta un caso esporádico de un varón con RM y síndrome de X frágil, detectado a través de estudios de población (43,133). Estos estudios han descubierto, de forma rutinaria, otros miembros de la familia que llevan la mutación para X frágil. Esto indica que la mayoría de los casos aislados son heredados y no resultado de una mutación de novo en el probando (133). Una interpretación de estos datos, es que una mutación nueva en el locus de X frágil podría estar ocurriendo en los descendientes de un varón transmisor, que no es capaz por sí misma de causar una manifestación clínica como sería el RM. Por lo tanto, el desarrollo de una entidad clínica podría requerir de un segundo evento, que ocurre durante la subsecuente herencia de la mutación, para hacer clínicamente manifiesto el RM en los descendientes (24, 121,134,135).

Aunque aún se desconoce la causa de esta mutación, se han propuesto numerosas hipótesis para explicarla. La más aceptable e interesante es la de Laird (121). El sugiere que el fra (X), resulta de una mutación que localmente bloquea la reactivación completa de un cromosoma X inactivo. El evento normal de inactivación originalmente ocurre en mujeres, como parte de un proceso de compensación de dosis por tener dos cromosomas X, fenómeno denominado Lyonización. Proponiendo que el síndrome de X frágil, resulta de una inactividad transcripcional continua del

gen o genes en Xq27, inactividad que resulta por el bloqueo local de la reactivación que normalmente ocurre, previa a la ovogénesis. Los cromosomas fra (X) podrían ser distinguidos en su nivel de mutación (121).

Esto es: considerando que un cromosoma X tiene el potencial para bloquear la reactivación en Xq27 de un cromosoma X previamente inactivado (121). Un cromosoma fra (X) mutado ha resultado a través del paso de un ciclo de inactivación y de reactivación incompleta. El conocimiento de la variación en la secuencia o de la mutación no está definido. Pero, se cree que el patrón de metilación del DNA está implicado en la inactivación del X (121). Una alteración de la secuencia de bases a gran escala, podría ser la base para los patrones alterados de metilación. Laird, también ha sugerido, que esto podría representar una mutación en la metilación, sin requerir de variación en la secuencia (121,1359).

Esta hipótesis, tiene algunos componentes atractivos, y predice con una exactitud sorprendente la proporción de descendientes afectados y no afectados. Sin embargo, como se propuso originalmente, la teoría no explica las proporciones alteradas de segregación que han sido observadas. Esto dependiendo del sexo del transmisor, se ha denominado paradoja de Sherman (43). Laird ha sugerido, que en el ovario, las células progenitoras de las cuales derivan los óvulos es un mosaico natural. Y que, la mujer portadora cuyo ovario ha sido poblado por estas células progenitoras, podrían tener una frecuencia del cromosoma con la impronta proporcionalmente mayor de 50%. Por lo que, Laird (122) propone que la reserva de células progenitoras de las que se

derivan ovocitos con el fra(X), es de solamente dos células. Esto apoyaría, la idea de que el índice de varones afectados nacidos de mujeres portadoras, podría variar notablemente y explicaría la paradoja de Sherman (122). Es claro que la metilación del DNA y la impronta del gen, son factores muy importantes, que influyen la expresión génica. El análisis molecular directo de la mutación fra (X), es necesario para determinar si el proceso de metilación y la impronta resultante, están implicados en la mutación fra (X) (122).

Los resultados de este análisis serán descritos en el apartado de biología molecular del locus FRAXA.

## 7.- DIAGNOSTICO.

### 7.1.- DIAGNOSTICO CLINICO Y DIFERENCIAL.

El diagnóstico del síndrome de X frágil, puede sospecharse inicialmente por el fenotipo clínico e historia familiar de retraso mental con patrón de herencia ligado al X. Sin embargo, en esta etapa del diagnóstico deben considerarse otras posibilidades, ya que existen aproximadamente sesenta padecimientos, con este patrón hereditario y cuyo dato clínico más prominente es el retraso mental (23,75,137). El diagnóstico diferencial debe establecerse con un subgrupo de 18 síndromes con RM ligado al X (Tabla 4) (21,130).

Los datos clínicos más importantes para distinguir estos síndromes del de X frágil son: microcefalia, espasticidad o hipogenitalismo (136,137).

TABLA IV.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE RETRASO MENTAL LIGADO AL X.

SINDROME	DATOS CLINICOS
X FRAGIL	Normal o macrocefalia. Macroorquidismo Sitio frágil Xq27.3
RENPENNING	Microcefalia. Testiculos normales.
RM INESPECIFICO.	Similar a Sx. X frágil, pero sin el sitio frágil Xq27.
ALLAN-HERNDON-DUDLEY.	Hipotonía, atrofia muscular, contracturas.
JUBERG-MARSIDI	Microcefalia. Fisuras palpebrales pequeñas. Epicanto interno. Sordera. Retraso en el crecimiento postnatal. Hipogenitalismo.
COFFIN-LOWRY	Defecto en el crecimiento. Facies tosca. Alteraciones vertebrales. Escoliosis. Falanges terminales en cono.
RETRASO MENTAL DIPLEJIA ESPASTICA.	Retraso mental. Degeneración progresiva de SNC.
RM, EPILEPSIA, SORDERA.	Microcefalia. Convulsiones. Espasticidad. Testiculos normales.
GOLABI-ITO-HALL.	Microcefalia. Múltiples anomalías congénitas. Cabello quebradizo.
RM, HIPOTONIA ALT GONADALES Y ESQUELETICAS.	Microcefalia. Hipogenitalismo. Hipotonía intrauterina.
GAREIS-MASON SCHMIKE.	Ausencia del extensor corto del pulgar. Microcefalia. Oftalmoplejia externa. Coreoatetosis.
SEEMANOVA	Microcefalia. Atrofia cerebral. Diplejia espástica. Reflejos abdominales ausentes.
FITZSIMMONS	Diplejia espástica. Hiperqueratosis palmo-plantar.

cont. tabla iv

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE RETRASO MENTAL LIGADO AL X.

SINDROME	DATOS CLINICOS.
WIEACKER-WOLFF	Contracturas congénitas severas. Atrofia muscular distal progresiva.
ATKIN-FLAITZ	Macrocefalia. Facies tosca. Talla baja. Macoorquidismo.
WAISMAN-LAXOVA	Megaencefalia. Anormalidades de ganglios basales. Testiculos normales.
HOCKEY	Pubertad precoz. Perimetro cefálico normal.
LUJAN	Hábito marfanoide.

( Refs:21,130).

Aquí, también se debe considerar el síndrome de retraso mental inespecífico, que clínicamente resulta indistinguible del síndrome de X frágil. Excepto, porque en este último encontramos el marcador citogenético presente (137). Se han realizado diferentes estudios tratando de correlacionar ambos padecimientos, e incluso, se ha pensado que este síndrome de retraso mental inespecífico, representa una forma alélica del padecimiento. Y que, debido a problemas técnicos en la inducción del sitio frágil no se detectó el fra (X). Aún no ha sido posible llegar a una conclusión, ya que también podría tratarse de una mutación en un locus completamente distinto. De tal forma que el diagnóstico de X frágil no puede basarse solamente en los datos fenotípicos, sino que debe tratar de confirmarse la presencia del sitio frágil en Xq27.3 por análisis citogenético o de la mutación por pruebas moleculares (122).

#### 7.2.- DIAGNOSTICO CITOGENETICO EN VARONES X FRAGIL.

En la actualidad, existe una gran variedad de métodos para inducir el sitio frágil Xq27 en cultivo de linfocitos de sangre periférica. Uno de los métodos más frecuentes ha sido el empleo de medios deficientes en ácido fólico y timidina, tales como el medio 199. Sin embargo, se ha observado que este método es sensible al aporte dietético de ácido fólico (138,139). También lo es al ácido fólico y timidina presentes en el suero fetal de ternera y el tiempo de duración del cultivo (140). También se han encontrado resultados falso negativos, con el medio 199, los cuales se positivizan después de la inducción con FUDR (140-142).

Con lo que se ha sugerido que el medio 199 no sea el único medio de cultivo, para un paciente en el que se busca el sitio frágil Xq27.3, sino que se cultive en paralelo con otro método de inducción. Los métodos de inducción con FUDR y elevada concentración de timidina, han demostrado ser altamente confiables (140-142).

En los varones afectados existe un amplio rango de expresión para el fra (X), aunque en un número significativamente elevado se encuentran porcentajes de expresión citogenética de 5 a 10% (43). Para evitar resultados falsos negativos debe analizarse un número adecuado de metafases. Por ejemplo, una expresión de 6 % o mayor en 50 metafases, da un índice de confiabilidad de 95 % (143). Este es el parámetro que se ha establecido en la mayoría de los laboratorios para un diagnóstico adecuado. Debido a que 1% de los varones afectados pueden ser X frágil negativos, es necesario estudiar más miembros de la familia, antes de excluir el diagnóstico (43).

Cuando se tienen niveles de expresión de fra (X) muy bajos, por ejemplo, 1 o 2 células en 50 o 100 metafases, se debe ser muy precavido, ya que parecería que pertenecen al índice de expresión que puede observarse en individuos sanos (144). En individuos normales se ha reportado una frecuencia de 1/200 (144) a 1/300 (145) metafases observadas. De hecho, cuando menos una célula FRAXA (+) fue observada en seis controles estudiados por Marlhens (145). La expresión observada en individuos controles normales, ha sido confirmada en estudios de células somáticas híbridas, en

los que incluso se encontró una expresión de 4 a 5 % en dos varones controles sanos (120). Por lo tanto, un nivel bajo de expresión del marcador citogenético en individuos con retraso mental requiere de estudios repetidos bajo diferentes métodos de inducción para adquirir un significado diagnóstico (120).

La expresión del X frágil, también puede ser inducida en cultivo de fibroblastos, aunque estas células no muestran expresión en medios deficientes en ácido fólico y timidina, sino que requieren de FUDR (101,146), metotrexate (147,148), o una elevada concentración de timidina (149,150). Los niveles de expresión en fibroblastos (151), a pesar de las técnicas de inducción, tienden a ser significativamente menores que en linfocitos, por lo que no se considera el tejido óptimo para estudios diagnósticos. Las líneas linfoblastoides transformadas con virus de Epstein-Barr no muestran expresión en medios deficientes en ácido fólico y timidina, pero muestran niveles elevados de expresión cuando son tratadas con FUDR, que en ocasiones son mayores que en linfocitos (152). El cultivo de linfoblastos resulta muy útil para establecer líneas celulares permanentes de un paciente para experimentación in vitro (152).

### 7.3.- INDICACIONES PARA DIAGNOSTICO CITOGENETICO.

7.3.1.- VARONES.- El análisis citogenético para X frágil, en general es poco utilizado como examen diagnóstico, en los servicios de genética. En vista de la elevada frecuencia que tiene el síndrome de X frágil, y el gran riesgo de que lo presenten otros miembros de la familia, el examen debe ser

realizado en cualquier varón con RM, sin una causa que lo justifique. La ausencia de historia familiar del padecimiento, no lo excluye del estudio. Otros grupos que son particularmente importantes para el estudio, son varones que tienen diagnóstico de autismo severo más que retraso mental, o incapacidad para el aprendizaje. El síndrome de X frágil fue diagnosticado en 47 pacientes de un total de 614 varones autistas reportados en 12 estudios, que representan 7.7 % de la muestra (54,55).

Sin embargo, como ya se mencionó, se debe ser precavido con aquellos varones con RM y una frecuencia de expresión muy baja, recomendándose nuevos cultivos con distintos métodos de inducción para establecer un resultado definitivo (144).

La búsqueda del sitio frágil Xq27.3, en todos los varones con RM que carecen de un diagnóstico establecido, se justifica fácilmente, por su elevada frecuencia y por el riesgo de recurrencia en otros miembros de la familia del probando. Por ejemplo, al valorar el riesgo-beneficio se estimó que el costo de identificar a una mujer portadora a través del estudio de los familiares de los varones con RM FRAXA (+), representa sólo 3 % del costo del cuidado institucional, de un niño afectado hijo de una mujer portadora (25). Únicamente mediante la identificación adecuada de estas mujeres portadoras, se podrá ofrecer un adecuado asesoramiento genético y manejo apropiado. Se han reportado algunas familias con síndrome de X frágil, en las cuales uno de los varones afectados tiene el fenotipo clínico del síndrome de Martin - Bell, sin la evidencia citogenética del

sitio frágil en Xq27.3 (136). Se ha estimado que 1% de los varones afectados podrían no expresar el sitio frágil, aún cuando se expresa en otros miembros de la familia (43). Esta falta de expresión del marcador citogenético, en un individuo miembro de una familia con X frágil podría deberse a una dificultad técnica para su inducción, especialmente con los medios de cultivo utilizados inicialmente como el medio 199. Sin embargo, se ha reportado una familia en la cual a un varón con fenotipo de síndrome de X frágil, se le practicó cultivo de linfocitos bajo distintos métodos de inducción, sin mostrar expresión del cromosoma fra(X). Su madre y dos tíos maternos mostraron, tanto los datos clínicos como citogenéticos del síndrome (120).

El entender la falta de expresión en un pequeño porcentaje de los varones que pertenecen a familias con síndrome de X frágil, ayudaría a comprender la relación entre el cuadro clínico y la anormalidad citogenética (120).

7.3.2.- MUJERES.- El análisis citogenético para mujeres con X frágil, realizado tanto para la detección de mujeres portadoras normales intelectualmente, como para diagnóstico clínico en mujeres con retraso mental, se somete a las mismas consideraciones clínicas. Además presenta la dificultad de que el rango promedio de expresión en mujeres es menor que en varones. Es evidente, que todas las mujeres miembros de una familia con un varón X frágil, deben ser estudiadas, especialmente si la mujer tiene alteraciones de conducta o retraso mental. Sin embargo, los

resultados falsos negativos son comunes en dos tercios de las mujeres portadoras normales intelectualmente y en 10 % de las mujeres que cursan con RM y diagnóstico de síndrome de X frágil. Estos grupos no muestran expresión de fra (X) o tienen una frecuencia de expresión menor de 5 % (43). Para disminuir estos resultados falsos negativos, los laboratorios necesitan analizar 100 células en metafase, considerándose positividad con un índice de expresión de 3 % o mayor y un nivel de confiabilidad de 95% (124).

La detección de portadoras y el diagnóstico de X frágil es aún más complicado, por la posibilidad de tener en los estudios de expresión resultados falsos positivos. Estos resultados, surgen generalmente de los niveles bajos de expresión en las mujeres heterocigotas para el síndrome de X frágil, lo que dificulta su distinción de los niveles bajos vistos en individuos normales.

Estos resultados falsos positivos son de particular interés en el caso aislado de una mujer con retraso mental, sin alteraciones fenotípicas, porque el diagnóstico de X frágil tiene implicaciones importantes para el resto de la familia. Los laboratorios deben establecer criterios mínimos para declarar a un individuo FRAXA (+) (124).

Los niveles elevados de expresión, constituyen una evidencia significativa para el síndrome de X frágil en mujeres, pero una expresión baja o ausente, será de valor limitado tanto para asegurar como para descartar el diagnóstico de síndrome de X frágil. El uso y la interpretación del análisis citogenético para

fra (X), particularmente en mujeres, aún se considera problemático y es necesario mejorar los métodos de estudio (124,153).

7.3.3.- Diagnóstico Citogenético Prenatal.- La posibilidad de diagnóstico citogenético prenatal del síndrome de X frágil, fue mostrada inicialmente en 1981-1982 (154,155). A partir de entonces, un total de 147 embarazos en riesgo potencial han sido estudiados prospectivamente, por medio de amniocentesis (76,156). Aunque, se han encontrado 31 afectados fra (X) (+) y varones como mujeres han sido confirmados citogenéticamente, existen problemas importantes con este estudio (156).

Al igual que los fibroblastos, los amniocitos no muestran una expresión elevada de fra (X) en medio deficiente en ácido fólico y timidina, por lo que se requiere inducción con FUDR, metotrexate, o elevada concentración de timidina (156,157).

El índice de expresión en amniocitos, usualmente menor que en linfocitos, varía notablemente de un laboratorio a otro e incluso entre diferentes métodos de inducción con una misma muestra.

Muchos de los resultados positivos en los estudios de detección prenatal se han basado en una frecuencia de expresión de 1 a 4% (76,156), mientras que otros autores han encontrado un nivel de expresión de fra (X) de 1 a 2 % en cultivos de controles normales (144,156). Varios casos podían haber sido resultados falso negativos, con muestras estudiadas en un sólo laboratorio o empleando un método único de inducción. Hasta el momento se cuenta con dos reportes de diagnóstico incorrecto: uno falso

negativo y el otro falso positivo (76,156).

Sutherland y Baker (149) demostraron que, para aumentar la expresión de fra(X) en cultivo de fibroblastos, deben utilizarse dosis elevadas de timidina, ya que resultó un método de inducción mejor que con FUDR y metotrexate en amniocitos (157). Por otra parte, se ha observado expresión del marcador en cultivos de vellosidades coriónicas, al realizar en un feto masculino un diagnóstico prenatal acertado (158). Sin embargo, la experiencia es muy limitada para determinar, si estas células son mejores que los amniocitos, en la detección del síndrome de X frágil (124,157).

En una de las series de diagnóstico prenatal más grande que se ha publicado, se demostró que los linfocitos de sangre periférica son el tipo celular más adecuado. Webb y colaboradores (142) reportaron 19 embarazos, en los que se practicó detección de fra(X), en muestras de sangre fetal obtenida por fetoscopia. En la mayoría de los casos la amniocentesis fue realizada, para determinar el sexo del producto, y un gran número de éstas se practicaron en productos masculinos. En sus resultados, como era lo esperado, encontraron una expresión mayor en sangre, que en líquido amniótico de muestras tomadas del mismo embarazo (142). El diagnóstico prenatal fue hecho correctamente en 6 varones, que estarían afectados y en 5 varones que no estaban afectados. Esto fue confirmado por estudios de expresión de X frágil, en las muestras de sangre obtenidas de los varones recién nacidos o de los abortos (142). Este estudio, también mostró que el medio 199

como único método de inducción, no es apropiado para un examen de detección de fra (X). Por ejemplo, tres de los siete varones FRAXA (+) en FUDr y metotrexate, fueron negativos en medio 199, lo que podría llevarnos a predicciones falsas negativas (142).

Esto podría deberse, al folato exógeno por la prescripción prenatal de vitaminas orales. Además, en 12 fetos se dió un resultado negativo, aunque en 8 de ellos se observó una expresión citogenética menor de 2 % (142). Esto viene a confirmar que la expresión de fra (X) puede ser observada en frecuencias muy bajas en todos los cromosomas X, pero si el feto está afectado, tendremos un nivel de expresión mayor de 2 % (124,142).

La desventaja del diagnóstico prenatal empleando muestras de sangre periférica, es que resulta limitado por el riesgo tan elevado de pérdida fetal en la fetoscopia en comparación con la amniocentesis. Aunque la toma de muestra de sangre por fetoscopia está asociada con un riesgo de aborto espontáneo de 4 - 5 % (159), en la actualidad se han tratado de implementar nuevos métodos diagnósticos bajo guía ultrasonográfica directa, con un margen menor de pérdida (160,161). Como estas técnicas resultan más accesibles, probablemente se convertirán en el método de elección, para diagnóstico citogenético prenatal de X frágil (161).

En el momento actual, el diagnóstico citogenético prenatal para fra (X) en varones, está considerado como un procedimiento experimental, disponible sólo en algunos centros de investigación

(76). Si la muestra de sangre fetal está disponible, se facilita el estudio para diagnóstico prenatal. Si no se cuenta con esto, se podrá realizar en células de vellosidades coriales o en amniocitos, considerando siempre que en estos tejidos el nivel de expresión es muy bajo o negativo (124).

El diagnóstico prenatal en un feto femenino, resulta más difícil, no sólo por las mismas dificultades técnicas que para los fetos masculinos, sino por la incertidumbre adicional debida a la falta de correlación entre el estado clínico y la expresión citogenética. Considerando que, 10 % de las mujeres con RM y la mayoría de las portadoras intelectualmente normales, carecen de expresión de fra(X) (43), un resultado prenatal negativo no discrimina adecuadamente entre mujeres portadoras, afectadas y no portadoras. Los niveles de expresión citogenética elevados son sugestivos de una mujer afectada, pero un porcentaje significativo de portadoras intelectualmente normales, pueden tener también un nivel de expresión elevado (43). Por lo que la utilidad del diagnóstico prenatal para fetos femeninos, todavía es cuestionable (124).

## 8.- ANALISIS DE LIGAMIENTO EN EL SINDROME DE X FRAGIL Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL LOCUS FRAXA.

En el síndrome de X frágil, citogenéticamente se ha localizado el sitio frágil en Xq27, lo que sugiere que el locus para la enfermedad también se encuentra aquí. Sin embargo, la mejor evidencia para localizar el síndrome de X frágil en esta región, fue obtenida a través de análisis de ligamiento del síndrome con marcadores genéticos en esta región (162). El locus FRAXA está ligado con el de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD), localizado en Xq28, con una fracción de recombinación de 6 % (163). Además empleando fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's) en esta región, se confirmó que las mutaciones en el locus de la enfermedad y las alteraciones del DNA responsables del marcador citogenético están muy cercanamente ligadas (164,165).

En vista de las dificultades para la detección de portadores entre los varones transmisores y entre las mujeres heterocigotas y la incertidumbre en el diagnóstico citogenético prenatal, se ha intentado localizar marcadores más cercanos al locus del síndrome de X frágil para seguir la herencia de esta mutación en las familias. Para ello, se han utilizado numerosos RFLP's de loci proximales y distales al de la enfermedad para estudiar la recombinación en esta región del cromosoma X (7,164).

Algunos de los marcadores empleados con mayor frecuencia y su localización con respecto al sitio frágil Xq27.3 se presentan en la Figura 3 (124,166-169). Los marcadores proximales al locus del

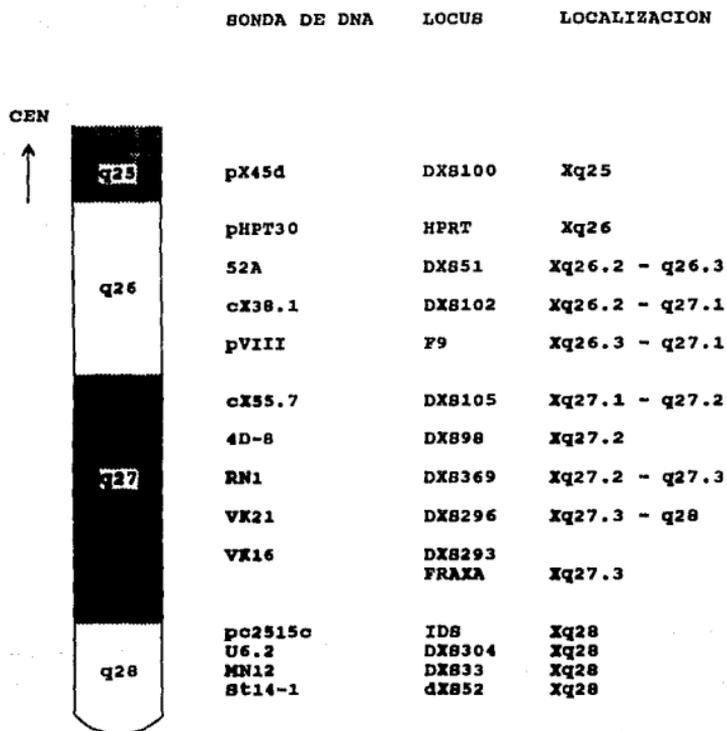


FIGURA 3. ESQUEMA DE LA PORCION DISTAL DEL BRAZO LARGO DEL CROMOSOMA X QUE MUESTRA EL MAPA FISICO DE RESTRICION DEL X-FRAGIL (124).

síndrome de X frágil son el Factor 9 de la coagulación y DXS51 que están fuertemente ligados uno con otro (170,171). Por otra parte, los marcadores distales al locus, tales como Factor 8 de la coagulación, DXS52 y G6PD, también se encuentran fuertemente ligados entre sí (169,171,172). Sin embargo, como grupo están pobremente ligados con el grupo de marcadores proximales y todos estos marcadores muestran una recombinación de 5 a 15 % con el locus de FRAXA (164). Estos resultados, sumados a la observación de que la región Xq27-28 tiene un índice de recombinación promedio elevado en familias control (173), han permitido suponer que no existe linealidad en la frecuencia de recombinación en Xq27-28. Esto se debe a la presencia de "una mancha caliente" (hot spot) para la recombinación, cercana o en el locus FRAXA (174), por lo que, quizá un aumento de recombinación está implicado en la producción de la mutación para el síndrome de X frágil (175,176).

Considerando, que ninguno de los fragmentos de restricción polimórfica (RFLP) está ligado fuertemente al FRAXA, lo más recomendable para propósitos diagnósticos será emplear aquéllos que flanquean al sitio frágil (177,178) .

Desde el punto de vista clínico, es necesario contar con pruebas de ligamiento que estén más cercanas, para aplicarse tanto en diagnóstico prenatal, como en el asesoramiento genético a los portadores de la mutación. Para ello, resultaría de gran utilidad contar con RFLP's que estén a 5 centimorgans o menos de recombinación, para reducir el índice de recombinación, manteniendo uniformidad en la predicción del riesgo (179).

Hasta 1988 las pruebas que habían sido identificadas y bien caracterizadas para detectar loci más cercanos, presentaban un promedio de recombinación de 7 % proximalmente y de 12 % en las distales. Sin embargo, se tenía gran dificultad para encontrar nuevas sondas más cercanas al FRAXA, lo que permitió llegar a la conclusión de que las regiones adyacentes a fra(X) resultaban difíciles de clonar, posiblemente por su elevado índice de recombinación (153).

Algo que no ha sido aún resuelto, es la razón para la heterogeneidad de ligamiento genético en la región proximal, en la que algunas familias fra(X) muestran índices elevados de recombinación entre el locus FRAXA y el del factor 9 (F9), mientras que en otras este índice es menor. Lo que sugiere, que en esta región la recombinación ocurre en forma distinta (167,178).

Posteriormente, con la finalidad de aislar el locus FRAXA, se crearon células somáticas híbridas que contenían la translocación del sitio fra (X) humano al cromosoma X de roedor (180). En 1987, Warren y cols (180) aislaron varias células somáticas híbridas que contenían los cromosomas X con el rearreglo. Los estudios con marcadores de DNA, demostraron que los rearreglos incluían una región muy cercana o bien el sitio fra (X). Se observó fragilidad en el sitio de unión de la translocación X humano-roedor en dos células híbridas, pero en una frecuencia comparativamente menor, que en el cromosoma fra (X) intacto. Sugiriendo, el autor, que la región FRAXA podría contener una secuencia repetitiva, que resulta susceptible de recombinación. Sin embargo, clonar estas

uniones de la translocación ha sido difícil, posiblemente por la naturaleza repetitiva del DNA en esta región (153) .

En 1989, después de muchos esfuerzos se lograron mapear tres sondas cercanas - RN1, VK21, U6.2 - y el locus de Iduronato sulfatasa (IDS) dentro de la zona de 5 % de recombinación con fra (X). La primera prueba identificada, U6.2 (locus DXS304) fue aislada por Dahl y cols (181), detectando RFLPs con numerosas enzimas, en las que todas se encontraron en desequilibrio de ligamiento. Este interesante locus, se localizó distal a fra (X) con un índice de recombinación de 3 %. La prueba U6.2 de 1,103-pb fue secuenciada, encontrando que contiene un gran elemento repetido directo de 121-pb y varios elementos repetidos invertidos pequeños. La presencia de estas secuencias sugiere, que promueven la recombinación (153) . La prueba VK21 es la primera de una serie de pruebas VK, localizadas cercanamente al sitio FRAXA (178) .

Por medio de estudios de ligamiento y de células somáticas híbridas se localizó el locus DXS296, por medio de VK21, aproximadamente a 3 centimorgans distal a fra (X) e inmediatamente proximal al del síndrome de Hunter (deficiencia de Iduronato sulfatasa [IDS]). El mejor orden que ha podido ser determinado es: fra (X)-DXS296-IDS-DXS304, cuando se ha empleado una combinación de análisis de ligamiento, células somáticas híbridas e hibridación *in situ* . La prueba RN1 detecta el locus DXS304, también localizado proximalmente a fra (X) con un índice de 5 % de recombinación (153,173) .

El primer paso hacia la comprensión de la naturaleza de la mutación, es el desarrollo de un mapa físico que abarque el área donde está localizado FRAXA. Entonces, para mapear fragmentos muy grandes de DNA, se empleó la técnica de electroforesis en gel en campos pulsados (PFGE= pulsed field gel electrophoresis) permitiendo determinar su orientación relativa. Esta técnica emplea enzimas de restricción especiales, tales como NotI, las cuales reconocen secuencias de 12 pares de bases de longitud aproximadamente, que se presentan raramente (182). Con este método se pudo realizar el mapa físico de la región distal del cromosoma X localizada entre St14 (DXS52) y DX13 (DXS15), que corresponde a una extensión de 470 Kb de DNA en la que se encuentran distintos loci. En el extremo distal de la región DXS52, por medio de la técnica de PFGE se identificó una región de 1.7 Mb que contiene genes agrupados (cluster gene) que unen a los genes responsables de la ceguera a los colores ligada al X que son: RCP y GCP, además de: MD13, DXS254, G6PD, F8C, DXS115 Y DXYS64 (153).

En el extremo proximal de fra(X) se ha reportado un mapa físico de 1.3 Mb de la región que rodea el locus F9 (183). También, se ha sugerido el ligamiento de 4D-8 (DXS98), cX55.7 (DXS105) Y cX33.2 (DXS105/DXS152) en un fragmento de 400 Kb, basados en el análisis por electroforesis en campos pulsados (PFGE). Otros resultados muestran que DXS105 probablemente se localiza en una región de 600 Kb, que probablemente no está ligada al fragmento de 400 Kb detectado por 4D-8 (DXS98). Por lo tanto, tres regiones físicas de aproximadamente 2.3 Mb han sido definidas en el

extremo proximal de fra(X) (184).

A partir de 1990 se ha logrado un progreso rápido en la caracterización de las secuencias adyacentes al locus FRAXA, con la aplicación de nuevas pruebas para definir cuál es la alteración presente en la mutación. MacKinnon y cols (177), han aplicado y perfeccionado el método de clonación de cromosomas microdisecados en esta región. Como lo indican sus reportes, han logrado una biblioteca de 20,000 clonas que contienen secuencias que incluyen las de la región FRAXA. Además han logrado un conjunto de 14 pruebas con células somáticas híbridas que contienen puntos de ruptura cercanos a fra(X). Las cuales han sido utilizadas para localizar 16 pruebas nuevas en las series VK dentro de una región que debe ser muy cercana al locus fra(X) (153,178).

Así mismo, se han encontrado patrones alterados en los fragmentos de restricción del DNA en los pacientes con X frágil con las pruebas que mapean cerca del sitio frágil Xq27.3. Estas diferencias podrían ser el resultado del bloqueo por la metilación de las secuencias de reconocimiento en estos sitios raros de restricción (182). Vincent y cols (185), estudiaron los patrones de metilación empleando enzimas de restricción que reconocen secuencias ricas en GC, pero que no pueden cortar el DNA si el residuo de Citosina lleva un grupo metilo.

Demostrando que la prueba distal DX5465, con tres enzimas diferentes que raramente cortan en el genoma - BssHII, EagI y SacII- fallaron para producir bandas de tamaño normal en varones afectados (185).

En los varones normales se encuentra una banda de 620 Kb aplicando la enzima BssHII, que está ausente en forma característica en los varones afectados y reemplazada por material en los límites de resolución. En 75 % de los varones afectados, hubo pérdida completa de las bandas normales y en los varones restantes se presentó una banda aparentemente normal de intensidad reducida. Estos resultados mostraron también que los varones transmisores tenían un patrón de bandas normal, pero sus nietos afectados presentaron un alto grado de metilación. La relación entre metilación y la observación de fragilidad no es inmediatamente obvia (185). La metilación de las islas ricas en CpG en el cromosoma X, están asociadas normalmente con la condensación e inactividad génica de cromatina (186). Además las islas CpG son indicativas de la presencia de genes activos, lo que muestra que un gen activo está presente en la región FRAXA. Y que su efecto puede estar modificado por metilación de la isla CpG previa al promotor. Quizá, la mutación inicial interfiera con la correcta disposición del DNA en la arquitectura cromosómica (187). Esto, podría interferir con los cambios subsecuentes en la organización asociada con transiciones entre el estado activo e inactivo (153).

Investigaciones posteriores permitieron aislar específicamente la región metilada afectada, por medio de cromosomas artificiales de levadura (YACs), logrando clonar pruebas más cercanas. Oberlé y cols (188), empleando esta metodología, encontraron que estas diferencias en la metilación podrían estar determinadas por una

sola isla de CpG, que reside en el extremo 5' de un gene que contiene un grupo de sitios de restricción raros (BssHII, SacII, EagI), todos en la vecindad de la prueba Do33 y todos resistentes a la digestión en varones FRAXA (+). Posteriormente, de la subclonación del YAC que contiene esta isla CpG, obtuvieron un fragmento de 7 Kb, que contenía un sitio metilado sensible a EagI. Este fue probado con DNA genómico digerido revelando no solamente diferencias en la metilación, sino también alteraciones en el tamaño del fragmento entre diferentes individuos. Sobre el extremo distal del sitio EagI, la prueba STB12 detectó variación en el tamaño de este fragmento en los varones FRAXA afectados. Este aumento en el tamaño del fragmento ha sido atribuido a una secuencia de inserción o a la amplificación de ésta presente en los individuos FRAXA positivo (153,187-189).

El análisis de las familias, en las que se está segregando el síndrome de X frágil, ha permitido la identificación de patrones generales en la variación del tamaño de la inserción. Los varones transmisores y sus hijas tienen pequeñas inserciones de 150-500 pares de bases (pb). Esto implica que la mutación es heredada de estos varones a sus hijas casi sin cambio, o con una pequeña variación de 200 pb. Sin embargo, en la siguiente generación 80% de los varones FRAXA positivo, muestran un aumento de la banda variante de entre 1.5 y 2.5 Kb. Estas bandas, tan grandes, difieren en tamaño entre los hermanos, lo que da por resultado un patrón heterogéneo atribuible al grado de mutación somática (184).

Recientemente, ha sido posible la identificación de las

secuencias que muestran variabilidad en el tamaño (190). Se emplearon secuencias repetitivas inestables del DNA de X frágil. Verkerek y cols (190) aislaron un gen llamado FMR-1 empleando un cósmido subclonado de un YAC que flanquea al sitio frágil. La selección del gen fue facilitada por el empleo de un RNA mensajero de 4.8 Kb de cerebro humano. El fragmento de 7.4 Kb obtenido con EcoRI contenía al gen FMR-1 llevando secuencias exónicas unidas al extremo distal de la isla CpG. En esta isla se había demostrado previamente la presencia de metilación en pacientes FRAXA (+); además de fragmentos de restricción de longitud variable, cuando el DNA es digerido con EcoRI y probado con pE5.1 (190).

Un fragmento repetido y grande de CCG se une a la isla de CpG a 250 pb de su extremo distal y contiene un exón de FMR-1. Empleando fragmentos de restricción PstI para localizar la región inestable, Kremer y cols (191), la encontraron asociada con una repetición de  $p(\text{CCG})_n$ . Debido a que, las secuencias que flanquean esta repetición son las mismas en todos los individuos y a que los puntos de ruptura de FRAXA se unen dentro de la secuencia repetitiva, ellos concluyen que la variación en el número de copias repetidas del tri-nucleótido, constituye la base molecular para la inestabilidad y la fragilidad observadas en el síndrome de X frágil (192).

En resumen, el síndrome de X frágil parece ser el resultado de dos eventos: uno, el grado de repetición de una secuencia particular (CCG) y dos, el patrón de metilación presente (192).

Existen dos tipos de mutaciones a nivel molecular. Los varones

transmisores y algunas mujeres portadoras (incluyendo a todas las hijas de los varones transmisores) llevan una pequeña inserción de 150-550 pb. Adyacente a esta región se encuentra una isla de CpG; la cual no está metilada en el cromosoma X activo y sí lo está en el X inactivo, exactamente como en las mujeres normales (192).

En estos individuos no existe expresión clínica de la enfermedad y poca o nula inducción citogenética de FRAXA. En cambio, en los individuos afectados la longitud del fragmento repetido insertado es mucho mayor ( 1000-2000 pb o más) y es heterogéneo debido a las mutaciones somáticas. La isla de CpG permanece metilada en el X activo de las mujeres afectadas y también en el único X de los varones afectados, así pues la transición de la premutación a la mutación completa requiere del paso a través de una meiosis femenina para amplificar el fragmento y cambiar la impronta (192).

La detección de fragmentos anormalmente grandes es indicación diagnóstica para el síndrome de X frágil. Tanto el tamaño del fragmento, como la metilación anormal están relacionados con la expresión citogenética y clínica del síndrome. Por lo que, parecería que en un futuro, el diagnóstico por métodos moleculares reemplazará al diagnóstico citogenético (191, 192).

#### 9.- TRATAMIENTO

El manejo de los pacientes con X frágil, requiere de una intervención multidisciplinaria (193).

Todos los varones afectados requieren terapia del lenguaje y

ocupacional, además de asistencia especial en su educación. Ya que sin la aplicación de estas medidas, es posible que la inteligencia presente decline (193).

Con un programa de rehabilitación adecuado, algunos autores han reportado mejoría en la frecuencia y severidad de los rasgos autistas y un mejor desarrollo en habilidades motoras finas. Los problemas de atención en el proceso de aprendizaje son críticos, por lo que deben ser manejados al inicio de los programas de terapia (76,194).

En lo que respecta a tratamiento medicamentoso, hasta el momento no se dispone de uno específico (194). Ya que la depleción de ácido fólico induce la presentación del sitio frágil en los cultivos celulares. La suplementación de ácido fólico ha sido aplicada en una gran variedad de estudios, con el objetivo de mejorar las alteraciones en la conducta y el déficit intelectual. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios. Estudios realizados en estos pacientes para determinar el metabolismo del ácido fólico, han mostrado que éste es normal. Por lo tanto, algunos de los efectos de mejoría reportados, no se consideran específicos para el tratamiento del síndrome (37,76,194).

Se inició un estudio controlado con cinco pacientes con síndrome de X frágil, con edades entre los 5 y 25 años de edad. A los que se administró ácido fólico (250mg/día) o placebo durante 3 meses, seguidos por otros dos períodos cada uno de tres meses con diseño cruzado (diseño ABA) con el medicamento o con el placebo. En los resultados no se encontraron cambios consistentes de C.I.

o en la conducta, relacionados con la terapia (194). Hagerman y cols (195), realizaron un estudio doble-ciego con 25 pacientes. Sin encontrar mejoría significativa en el C.I o en los estudios psicológicos aplicados al grupo. Sin embargo, algunos de los varones prepuberales mostraron discreta mejoría en la conducta y en los resultados de la valoración psicológica (195).

Rosenblatt y cols (196), en un estudio controlado, de dos hermanos gemelos idénticos, no demostraron efecto del ácido fólico en el estado clínico de los pacientes (194).

Por otra parte, la administración de ácido fólico podría afectar el metabolismo de los neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC), en forma similar al efecto de los estimulantes. Ya que, reportes anecdóticos sugieren que el trimetoprim, un antibiótico que altera el metabolismo del ácido fólico, podría dar lugar a la exacerbación de los problemas de conducta en varones afectados, se deberá ser cauto al prescribir este medicamento u otros que interfieran con el metabolismo de los folatos (37).

Por lo anterior, actualmente se considera que el tratamiento debe estar enfocado hacia el control de la sintomatología y de la disfunción neurológica (37).

## B. OBJETIVOS

1.- Detección del sitio frágil en Xq27.3 en varones con RM para fines diagnósticos.

- 2.- Determinar índice de frecuencia del síndrome X frágil en el grupo de pacientes en estudio.
- 3.- Identificación de portadoras a través del diagnóstico de certeza en los afectados.
- 4.- Proponer este estudio dentro de la valoración clínica de todo paciente con RM sin diagnóstico.
- 5.- Asesoramiento genético para las familias afectadas.

### C. JUSTIFICACION

Con este estudio nos propusimos conocer, por medio de la evaluación citogenética, la frecuencia del síndrome de X frágil en sujetos masculinos con RM sin diagnóstico previo ni causa que lo justificara. Debido a que el síndrome de X frágil puede estar asociado con retraso en el desarrollo psicomotor sin otros datos clínicos, sólo fueron incluidos pacientes con RM. Estos resultados han sido comparados con estudios previos para determinar si su frecuencia es similar o diferente a la reportada por otros autores.

En base a su patrón de herencia ligado al X, en los casos fra(X) positivo es posible identificar a las portadoras asintomáticas, madres de los casos índice, para ofrecer un diagnóstico preciso y por consiguiente un asesoramiento genético integral.

La oportunidad de prevenir casos posteriores por la identificación de portadoras entre las mujeres parientes de aquéllos con fra(X)+, añade importancia al diagnóstico de los casos índice a través de la referencia clínica o búsqueda sistemática en todos los niños con RM.

Más aún, evaluando el costo-beneficio de la búsqueda de fra(X) en varones con RM, se ha estimado que el costo de identificar una mujer en riesgo de ser portadora a través del diagnóstico de un varón fra(X) en su familia, fue solamente 3 % del costo del cuidado institucional para un varón afectado hijo de esa mujer portadora. Unicamente por la identificación de las portadoras en las familias de los casos índice puede ofrecerse un apropiado consejo genético y manejo.

## II.- MATERIAL Y METODOS:

Se estudiaron 50 alumnos de la escuela de educación especial No.12, Coordinación 1,SEP; de población mestiza mexicana, del sexo masculino, cuyas edades fluctúan entre los 5 y 17 años de edad, de estrato socioeconómico medio bajo, con deficiencia mental diagnosticada por evaluación psicológica con identificación del área cognitiva implicada, sin daño orgánico cerebral. Se investigó el árbol genealógico para reconocer antecedentes familiares de RM hereditario ligado al "X".

Descripción fenotípica de los individuos, en quienes se realizó estudio citogenético. Por lo que se extrajeron 3 ml de sangre periférica heparinizada, cultivando linfocitos con técnica específica para X Frágil.

### 2. PROCEDIMIENTO.

Técnica para cultivo de linfocitos para cariotipo específica para X FRAGIL.

a).- METODO : MEDIO DEFICIENTE EN ACIDO FOLICO.

I.- Medio 199 o RPMI-1640 deficiente en ácido fólico	100ml
Suero Fetal Bovino	5ml
Penicilina-Estreptomicina [10,000 UI/ml-10 mg/ml]	1ml
L-Glutamina (29.2 mg/ml)	1ml

II.-PROCEDIMIENTO.

- Adicionar 10 ml de medio suplementado por cada tubo.
- Agregar 0.5 ml de Fitohemaglutinina M ( MICROLAB).

- Adicionar de 0.7 - 1.0 ml de sangre completa heparinizada.
- Incubar los tubos a 37.0°C por 96 horas ( 4 Días ).
- Adicionar colchicina a los tubos de cultivo, a una concentración de 0.1 ug. por cada ml de medio contenido en el tubo, una hora antes de cosechar.
- Cosechar como en técnica habitual.
- Preparar laminillas, tefir con Giemsa y revisar al microscopio.
- Contar 50 metafases, revisar si hay gaps o rupturas, específicamente en los cromosomas del grupo C.
- En los casos que se sospecha presencia de X Frágil hacer bandas GTG para confirmarlo.

b).-OTROS MEDIOS DE INDUCCION.

(1).-USANDO INHIBIDORES DE LA TIMIDILATO SINTETASA

I.- Medio RPMI-1640 o McCoy 5A o TC 199	100	ml
Suero Fetal Bovino	25	ml
Penicilina-Estreptomicina (10,000 UI/ml-10 mg/ml).	1.3	ml
L-Glutamina (29.2 mg/ml).	1.3	ml.

II.- PROCEDIMIENTO.

- Colocar 10 ml de medio suplementado a cada tubo.
- Agregar 0.5 ml de Fitoheماغlutinina M (MICROLAB).
- Adicionar de 0.7 a 1.0 ml de sangre periférica heparinizada.
- Incubar a 37.0°C por 72 horas(3 días).
- Agregar 0.1 ml de FUDR de una solución de trabajo de  $1 \times 10^{-5}$  M a cada tubo que contenga 10 ml de medio de cultivo ( a una

concentración final de  $1 \times 10^{-7}$  M) o 0.4 ml de Metotrexate (MTX) de la solución stock a concentración de 0.25 mg/ml a cada 10 ml de medio de cultivo ( para una concentración final de 10 ug/ml).

- Incubar en la obscuridad 24 horas adicionales a 37.0°C
- Adicionar colchicina una hora antes de cosechar.
- Cosecha como en técnica habitual.
- Preparar laminillas, teñir con Giemsa y revisar al microscopio.
- Contar 50 metafases, revisar si hay rupturas o gaps específicamente en los cromosomas del grupo C.
- En los casos que se sospeche la existencia de FRAXA se harán bandas GTG para confirmarlo.

SOLUCION STOCK DE FUDR ( $8.124 \times 10^{-5}$  M):

FUDR	0.1 mg.
Sol. Hank's	5.0 ml.

SOLUCION DE TRABAJO DE FUDR ( $1 \times 10^{-5}$  M):

FUDR (Sol. Stock)	1.0 ml.
Sol. Hank's	8.1 ml.

SOLUCION DE MTX STOCK (0.25 mg/ml):

MTX (2.5 mg/ml)	0.1 ml.
Sol. Hank's	10.0 ml.

### 3. ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD.

El estudio fue realizado con el consentimiento de los padres de los pacientes y de las autoridades del plantel educativo. De acuerdo a la Ley General en Salud, la investigación está clasificada como riesgo mínimo por punción venosa, por lo que se extendió carta de consentimiento informado (ANEXO 1).

### 4. ANALISIS ESTADISTICO

Por tratarse de un estudio descriptivo, sólo fue calculada la frecuencia de los individuos con el Síndrome de X frágil en porcentaje, así como el porcentaje de la expresión citogenética del marcador.



SECRETARÍA  
DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

DEPENDENCIA SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
ELEMENTAL  
SECCIÓN DIRECCIÓN GENERAL DE  
MESA EDUCACIÓN ESPECIAL  
NUMERO DE OFICIO SECRETARÍA PARTICULAR  
EXPEDIENTE 312/0096/91

ASUNTO: Se autoriza estudio

México, D.F. enero 15 de 1991

DRA. SUSANA KOFMAN ALFARO  
JEFE DE SERVICIO  
UNIDAD DE GENÉTICA  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
P R E S E N T E

En respuesta a su escrito, informo a usted que esta Dirección General autoriza la realización del Estudio "Insidencia del Síndrome X", que elaborará la Dra. Elizabeth Cadivich Triana, Residente de Genética en la Unidad bajo su cargo.

Con base en lo anterior, solicito a usted establecer comunicación con la Profra. Abigail Hernández Mejía, Coordinadora de Servicios de Educación Especial No. 1 en el D.F., a los teléfonos 255 20 35 y 203 44 73, a efecto de delimitar los procedimientos a seguir para el citado Proyecto.

Sin otro particular, hago propicia la ocasión para enviarte un respetuoso saludo.

A T E N T A M E N T E

MTR. HUBERTO GALEANA ROMANO  
DIRECTOR GENERAL  
REGISTRADO EN  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
Dirección General de Educación  
Especial

c.c.p.- Q.F.B. ALICIA CERVANTES P.-Jefe de Laboratorio, Unidad Genética.-  
Presente  
PROFRA. ESTHER P. MARMOLEJO SANDOVAL.-Directora Técnica  
LIC. GRACIELA PIRRON CURIEL.-Subdirectora de Planeación  
PROFRA. MIRNA MOLINA AVILES.-Jefe Depto Servicios Escolares  
PROFRA. ABIGAIL HERNANDEZ MEJIA.-Coordinadora de Servicios de  
Educación Especial No. 1 en el D.F.

AL CONFEJAR ESTE OFICIO, CÍTESE LOS  
DATOS CONTENIDOS EN EL CUADRO DEL ANEXO  
SUPERIOR DERECHO.

HGR'DECH'229

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

YO \_\_\_\_\_ COMO EL PADRE O TUTOR DEL NIÑO \_\_\_\_\_, ACEPTO DE FORMA VOLUNTARIA QUE MI HIJO PARTICIPE EN EL ESTUDIO FRECUENCIA DEL SINDROME DE X FRAGIL EN UNA POBLACION DE VARONES CON DEFICIENCIA MENTAL, QUE REALIZARA LA DRA ELIZABETH CADIVICH T EN EL SERVICIO DE GENETICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO, SSa. CUYO OBJETIVO CONSISTE EN CONOCER LA FRECUENCIA DE DICHO PADECIMIENTO YA QUE ESTO PERMITIRA TENER UN MEJOR CONOCIMIENTO ACERCA DE UNA DE LAS CAUSAS DE LA DEFICIENCIA MENTAL.

HEMOS SIDO CONVENIENTEMENTE INFORMADOS ACERCA DEL PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO QUE CONSISTIRA EN LA OBTENCION DE 5 ml DE SANGRE CON MOLESTIAS MINIMAS DEBIDAS A LA PUNCIÓN VENOSA, COMO PUEDE SER LA FORMACION DE UN PEQUEÑO HEMATOMA.

DE IGUAL FORMA ES DE MI CONOCIMIENTO QUE EL HECHO DE REHUSAR EL ESTUDIO NO MODIFICARA LA ATENCION QUE MI HIJO RECIBE EN LA INSTITUCION EDUCATIVA, NI EN EL CASO DE ACUDIR A SOLICITAR ATENCION MEDICA POR MI PARTE EN EL MENCIONADO SERVICIO DE GENETICA. ADEMÁS PUEDO SOLICITAR INFORMACION ADICIONAL, ASI COMO EL DERECHO DE RECIBIR INFORMACION ACERCA DE LOS RESULTADOS DE ESTE ESTUDIO.

NOMBRE: \_\_\_\_\_.

FIRMA: \_\_\_\_\_.

DIRECCION: \_\_\_\_\_.

MEDICO RESPONSABLE: DRA E. CADIVICH T

MEXICO, D.F. A DE \_\_\_\_\_ 1992

### III.- RESULTADOS

De acuerdo a los datos obtenidos en los 50 pacientes estudiados se describen los siguientes resultados:

Las edades de los pacientes variaron entre 5 y 17 años de edad, con un promedio de 11 años.

Con respecto a los antecedentes perinatales, 84 % nacieron por parto eutócico, 12 % por cesárea y 4 % por parto distócico.

Dentro de los antecedentes heredofamiliares para RM, encontramos 14 niños (28%) con este antecedente positivo. De éstos, 8 casos (16 %) mostraron un patrón de herencia ligado al X (Figuras 4: GCJ, CGV, JMB, MGO, IRP y Figura 5: RJM, FRS, MHF). Mientras que 6 pacientes (12 %) (Figuras 4: GZC, IRL, JVD, DRG, JOH, JMB), tuvieron hermanos afectados con RM de grado variable y/o trastornos del aprendizaje, sin otro antecedente familiar para estas alteraciones.

La información sobre coeficiente intelectual global (C.I) y áreas cognitivas alteradas fue obtenida de los estudios realizados en la Escuela de Educación Especial, considerados de acuerdo a los criterios de la OMS, de 1985 como (197):

- 1). RM superficial con un C.I de 50 - 70 (DS 2.0).
- 2). RM moderado con un C.I de 35 - 50 ( DS 3.3 ).
- 3). RM severo con un C.I de 20 - 35 ( DS 4.3 ).

En los pacientes estudiados, 33 (66 %) cursan con RM superficial, 10 (20%) con RM moderado y 7 (14 %) con RM severo (Gráfica I).

La frecuencia de las alteraciones psicológicas fue la siguiente: los trastornos del lenguaje estuvieron presentes en 25 pacientes (50 %), 5 (10 %) cursan con hiperactividad, 19 (38 %) con alteraciones en el aprendizaje y 1 (2 %) con autismo.

Se obtuvo la frecuencia de expresión citogenética del cromosoma marcador fra(X) en los individuos afectados, así como la frecuencia de presentación del síndrome de X frágil en el grupo de varones con RM estudiados.

El marcador citogenético fra(X) estuvo presente en 7 de los pacientes (14 %). Se observó una expresión citogenética mayor de 6 % en sólo 3 de ellos (6 %); en los 4 varones restantes (8 %) la expresión citogenética del marcador fue menor (2 %) (Tabla V).

De acuerdo al método de inducción empleado encontramos diferencias en la frecuencia de expresión citogenética del marcador fra(X), la cual fue mayor cuando se utilizó FUDR con un porcentaje de 46 % y con medio RPMI deficiente en ácido fólico fue de 18 % (Tabla VI)

Con respecto a la expresión de otros sitios frágiles, se encontraron en 17 pacientes con índices variables de expresión, que se describen a continuación: FRA1Ac, FRA1Gc, FRA2Cc, FRA5Cc, FRA6Ec, FRA7Ec, FRA7Ic, FRA9Br, FRA9Dc, FRA10Ec, FRA11Br, FRA11Dc, FRA12Dr, FRA14Cc (Tabla VII).

El sitio frágil más frecuente y con un nivel de expresión mayor fue el sitio frágil común FRA6Ec, en 6 pacientes, con un índice de expresión que varió de 2 a 20 %. El siguiente en frecuencia fue el sitio frágil raro FRA11Br, que se observó en 4 individuos

con índices de expresión de 2 a 20 %. El resto de los sitios frágiles reportados mantuvo índices bajos de expresión (2%).

Con respecto al medio de cultivo empleado, se encontró que el índice de expresión citogenética de los sitios frágiles raros fue mayor en cultivos con adición de FUDR que en medio deficiente de ácido fólico (Tabla VII).

Los datos clínicos más sobresalientes de los pacientes con el marcador citogenético fra(X) se muestran en las Tablas VIII y IX. Encontramos que 5 de los pacientes fueron obtenidos por parto eutócico y 2 por parto distócico. En ellos no se reportan antecedentes de hipoxia neonatal.

El promedio del peso al nacimiento en estos pacientes, fue de 2,975 g, sin embargo, en los 3 pacientes con expresión mayor de 6% fue de 3,033 g (Tabla VIII).

El perímetro cefálico se encuentra dentro de los límites normales reportados para sus edades, aunque los pacientes JAM, OLA, AMR Y MHF están entre la 3a. y 5a. percentilas (Tabla IX).

En cuanto a los rasgos faciales dismórficos se observaron: prognatismo en 4 (57.1 %), pabellones auriculares grandes en 2 (28.5 %) y mala implantación dental en 1 (14.2 %) (Tabla IX).

Las alteraciones musculoesqueléticas presentes fueron: hipotonía en 1 caso (14.2 %), hiperlordosis en 1 individuo (14.2 %), hiperlordosis y escoliosis en 2 (28.5 %), arco longitudinal bilateral ausente en 1 paciente (14.2 %), (Tabla IX).

En todos los casos los genitales fueron normales, aún cuando en este grupo 3 pacientes ya tenían 15 años de edad (Tabla IX).

En este subgrupo considerando los antecedentes heredofamiliares, 3 de ellos tuvieron parientes afectados (Figura 5: RJM, FRS y MHF).

El paciente RJM con un índice de expresión de fra(X) de 30 % tiene un hermano gemelo con RM y rasgos autistas que presentó el marcador con una expresión citogenética de 10 %. También se encontró el marcador en la madre y en la abuela materna con una expresión de 5 y 3 % respectivamente, aunque son clínicamente normales (Figura 5).

Los pacientes LCA, JAM, OLA y AMR no tuvieron antecedentes familiares de RM (Figura 5). Desafortunadamente no fue posible realizar el estudio citogenético en las madres de estos pacientes para afirmar si eran o no portadoras.

El paciente FRS, que pertenece al subgrupo con expresión citogenética de fra(X) de 2 % tiene el antecedente de 4 primos hermanos por línea materna con RM, no obstante éstos no presentaron positividad para fra(X) (Figura 5).

El paciente MHF, con una frecuencia de expresión de fra(X) de 2%, tiene además una hermana con antecedente de lento aprendizaje y estereotipias y otra hermana con RM. La madre presenta tartamudeo y refirió dificultad para el aprendizaje, sin embargo, el estudio para fra(X) en todas ellas fue negativo (Figura 5).

Considerando los estudios de C.I realizados sólo en estos

pacientes, se encontró: RM severo en 1 (14.2 %) con un C.I de 30; RM moderado en 3 (42.8 %) y RM superficial en 3 (42.8 %).

Con respecto a las alteraciones de la conducta se reporta lo siguiente: sólo en el paciente RJM encontramos autismo (14.2 %), en los pacientes LCA, OLA y AMR (42.8 %) retraso severo del lenguaje, en MHF (14.2 %) trastorno severo del lenguaje. Los pacientes JAM y FRS cursan con deficiencia en el aprendizaje (28.5 %), y los pacientes LCA y OLA (28.5 %) presentan estereotipias (Tabla X).



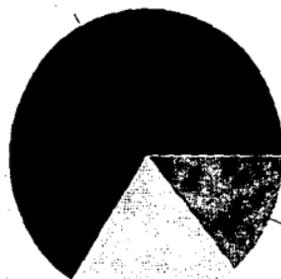
FOTOGRAFIA I:R) CARIOTIPO 46,XY, fra(X)(q27.3). EN EL RECUADRO SE MUESTRAN DIFERENTES MANIFESTACIONES DEL CROMOSOMA X-FRAGIL.

# GRAFICA I.

## GRADO DE RETRASO MENTAL.

RM SUPERFICIAL

66



RM SEVERO

14

RM MODERADO

20

Figura 4. ARBOLES GENEALOGICOS DE  
LOS PACIENTES FRAPq NEGATIVO.

■ RM

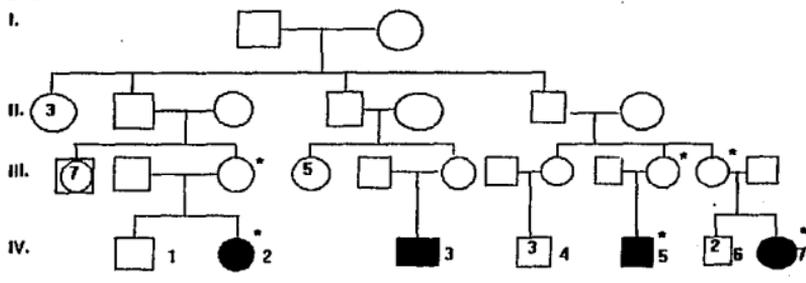
□ TARTAMUDEO

□ TRAST LENGUAJE

□ TRAST APRENDIZAJE

[\*] SE REALIZO EL  
ESTUDIO CITOGENETICO.

1.- GCJ



1.- GCJ.

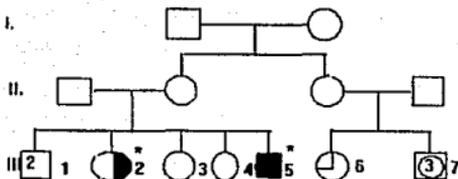
IV.2: RM superficial, crisis de ausencias. Retraso severo del lenguaje.

IV.3: RM superficial, retraso severo del lenguaje

IV.5: RM superficial, retraso severo del lenguaje

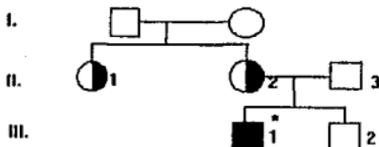
IV.7: RM superficial, hiperactividad

2.- GZC.



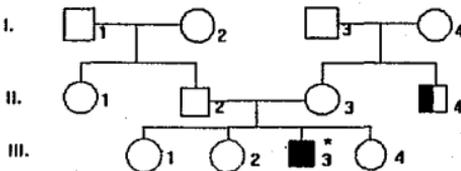
- III.3: Trastorno del aprendizaje.
- III.5: RM superficial, trastorno del aprendizaje.
- III.6: Síndrome de Down.

3.- CGV.



- II.1: Trastorno del aprendizaje
- II.2: Trastorno del lenguaje
- III.3: RM moderado, trastorno del aprendizaje.

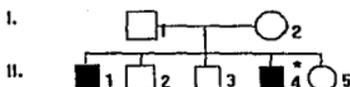
4.-JMB



- II.4: Trastorno severo del lenguaje
- III.3: RM moderado

FIGURA 4

5.- IRL



II.4: RM superficial, tartamudeo, estereotipias

6.- JVD

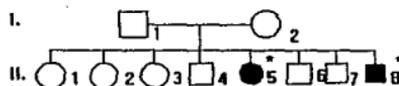


II.2: Trastorno severo del lenguaje

II.3: RM superficial

II.5: RM superficial, trastorno severo del lenguaje, estereotipias.

7.- DRG

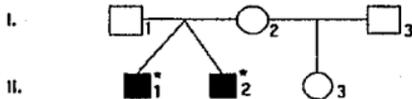


II.5: RM moderado

II.8: RM severo

FIGURA 4

8.- JOH.



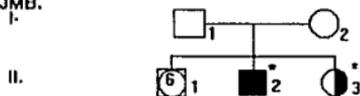
II.1: RM superficial  
II.2: RM superficial

9.- MGO.



I.3: Tartamudeo  
II.1: RM superficial, hiperactividad

10. JMB.



II. 2: RM leve, hiperactividad.  
II. 3: Trastorno severo del aprendizaje.

FIGURA 4

11.- IRP.

I.

II.

III.

I.2: RM

I.3: RM

II.2: RM

II.3: RM

III.1: RM superficial

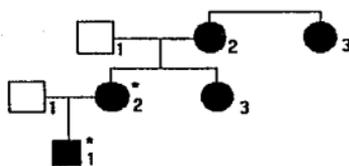


FIGURA 5

ARBOLES GENEALOGICOS DE LOS  
PACIENTES FRA(X) POSITIVO.

■ RM

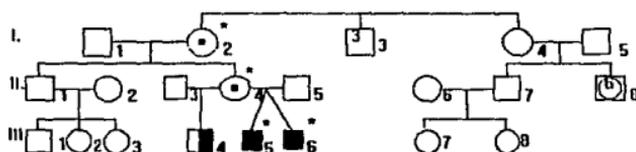
□ TARTAMUDEO

□ TRAST LENGUAJE

□ TRAST APRENDIZAJE

(\*) SE REALIZO EL  
ESTUDIO CITOGENETICO.

1.- RJM



I.2: Portadora, fra(X) 3 %.

II.4: Portadora, fra(X) 5%.

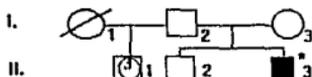
III.4: Trastorno del aprendizaje.

III.5: RM moderado, autista, hiperactivo  
estereotipias, fra(X) 30 %.

III.6: RM superficial, rasgos autistas,  
estereotipias, fra(X) 10%.

FIGURA 5

2.- LCA.



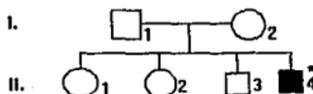
II.3: RM moderado, estereotipias, trastorno del lenguaje  
fra[?] 16 %.

3.- JAM.



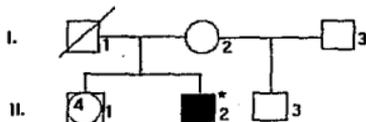
II.3: RM moderado, hiperactividad, incoordinación neuromotora  
fra[?] 8 %.

4.- OLA



II.4: RM moderado, trastorno del aprendizaje  
fra[?] 2%.

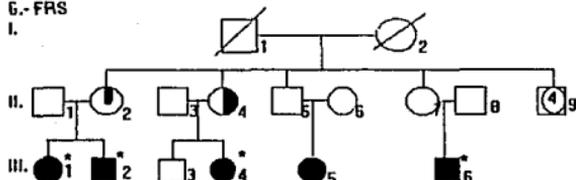
5.- AMR.



II.2: RM superficial, retraso severo del lenguaje,  
fra[?] 2%.

FIGURA 5

6.- FRS



II.2: Estereotipias

II.3: Deficiencia en el aprendizaje

III.1: RM superficial, deficiencia del aprendizaje, fra[ $\times$ ] negativo

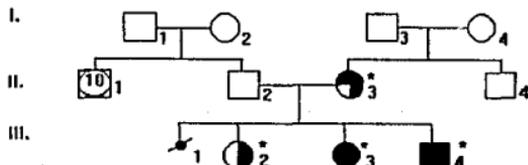
III.2: RM superficial, deficiencia del aprendizaje, fra[ $\times$ ] negativo

III.4: RM superficial, incapacidad total para el aprendizaje, fra[ $\times$ ] negativo.

III.5: RM superficial, deficiencia del lenguaje.

III.6: C.I. límite, deficiencia del aprendizaje requiriendo educación especial, fra[ $\times$ ] 2%.

7.- MHF.



II.3: Tartamudeo, dificultad para el aprendizaje, fra[ $\times$ ] negativo.

III.2: Lento aprendizaje, estereotipias, fra[ $\times$ ] negativo.

III.3: RM superficial, incapacidad para el aprendizaje, fra[ $\times$ ] negativo.

III.4: RM severo, retraso severo del lenguaje, fra[ $\times$ ] 2%.

TABLA V.

FRECUENCIA DE PRESENTACION DE FRA(X).

PACIENTES		% EXPRESION	
No	%	FRA(X)	CITOGENETICA
43	86	(-)	...
4	8	(+)	< 2
3	6	(+)	> 2
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>		

TABLA VI.

PRESENTACION DE FRAXA DE ACUERDO AL METODO DE INDUCCION				
PACIENTE	RPMI* n.C	FuDR* n.C	TOTAL n.C	EC %
RJ	6	24	30	30
LC	4	12	16	16
JA	4	4	8	8
OL	4		4	4
AM		2	2	2
FR		2	2	2
MH		2	2	2

n.C= número de células FRAXA (+).  
 RPMI= medio deficiente en ácido fólico.  
 EC % = porcentaje de expresión citogenética.  
 \*.- Se analizaron 50 células por método de inducción,  
 en total 100 por cada individuo.

TABLA VII.

EXPRESION DE OTROS SITIOS FRAGILES

PACIENTE	SITIO	FRAGIL	EC
No	RARO	COMUN	(%)
1		FRA1A	2
2		FRA1G	2
2		FRA2C	2
1		FRA5C	2
6		FRA6E	2-20
1		FRA7E	2
2		FRA7I	2
1	FRA9B		2
1		FRA9D	2
1		FRA10E	2
4	FRA11B		2-20
1		FRA11D	2
1	FRA12D		2
1	FRA14C		2

EC=expresión citogenética.

Localización cromosómica: (79)

FRA1A: 1p36	FRA9B: 9q32
FRA1G: 1q25.1	FRA9D: 9q22.1
FRA2C: 2p24.2	FRA10E: 10q25.2
FRA5C: 5q31.1	FRA11B: 11q23.3
FRA6E: 6q26	FRA11D: 11p14.2
FRA7E: 7q21.2	FRA12D: 12q24.13
FRA7I: 7q36	FRA14C: 14q24.1

TABLA VIII.

VARONES FRAXA (+) Y ANTECEDENTES PERINATALES.

PAC.	EC %	PARTO	P N
RJ	28	0	3,000
LC	16	0	2,900
JA	8	0	3,200
OL	2	0	2,700
AM	2	1	2,500
FR	2	0	3,250
MH	2	1	3,250

PARTO: eutócico=0; distócico= 1.  
 PN: peso al nacimiento en gramos.

TABLA IX.

DATOS CLINICOS EN VARONES FRAXA (+)

S	EC%	EDAD AÑOS	PC	CLIN 1	CLIN 2	GENITALES
RJ	30	6	52	Prognatismo	Hiperlordosis Hipotonía	0
LC	16	15	54	PA grandes Baja impl	Hiperlordosis Escoliosis	0
JA	8	15	53	Prognatismo		0
OL	2	15	53	Prognatismo		0
AM	2	12	52		Hiperlordosis	0
FR	2	8	52	PA grandes	Hiperlordosis Escoliosis	0
MH	2	9	53	Prognatismo		0

S= sujetos.  
 EC= expresión citogenética.  
 PA = pabellones auriculares

PC= perímetro cefálico  
 en cm.  
 Baja impl= baja implantación.

TABLA X.

RELACION ENTRE E.C, C.I. Y ALTERACIONES PSICOLOGICAS

S	E.C%	C.I	ALTERACIONES PSICOLOGICAS
RJ	30	37	AUTISMO
LC	16	45	ESTEREOTIPIAS.RETRASO SEVERO DEL LENGUAJE.
JA	8	71	DEFICIENCIA EN APRENDIZAJE.
OL	2	46	ESTEREOTIPIAS. RETRASO SEVERO DEL LENGUAJE.
AM	2	55	RETASO SEVERO DEL LENGUAJE.
FR	2	75	DEFICIENCIA EN APRENDIZAJE
MH	2	30	TRASTORNO SEVERO DEL LENGUAJE.

S= sujetos

E.C= % expresión citogenética.

C.I= coeficiente intelectual.

#### IV.- DISCUSION.

Las formas de RM ligadas al cromosoma X son responsables de aproximadamente 25 a 50 % de todos los casos de RM. Una proporción significativa, alrededor de 40 % de éstos, corresponden al síndrome de X frágil, considerándolo como la forma de retraso mental hereditario más común (1, 23-25).

Desde 1938, Penrose (3) había sugerido la existencia de una proporción de 25 % mayor de varones con respecto a las mujeres con RM, debido a la presencia de formas de RM ligadas al X no reconocidas. De éstas, la forma de RM inespecífico ligado al X (MRX) descrito por Lehrke (2) es la forma más frecuente. Está caracterizado por RM de moderado a severo, con un patrón de herencia ligado al X y no muestra alteraciones fenotípicas características. Su frecuencia en la población con RM es de 12 a 25 %. Por otra parte, existe una forma de RM con patrón de herencia autosómico recesivo, sin otros datos clínicos asociados que representa 8 % de los casos con RM (1).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio 16 % de los pacientes presentaron un patrón de herencia ligado al X (Figuras 4: GCJ, CGV, JMB, MGO, IRP ; 5: RJM, FRS y MHF). En 12 % encontramos uno o varios hermanos afectados con RM y/o trastornos del aprendizaje, sin antecedentes en generaciones previas, por lo que no fue posible determinar con exactitud un patrón de herencia específico.

Los estudios citogenéticos para diagnóstico de X frágil realizados en varones en instituciones para deficientes mentales han

mostrado índices de prevalencia de 2 a 9% (24,27). Varios autores han tratado de establecer la frecuencia del síndrome en diferentes poblaciones de varones con RM, como son en ingleses, suecos, italianos, hawaianos, sudafricanos y australianos, encontrando una incidencia de 1 a 7 % en individuos sin diagnóstico previo (24,27-32). La frecuencia del síndrome de X frágil en este grupo de 50 varones con RM fue de 6 %. Este estudio concuerda con lo reportado por diferentes autores en estudios realizados en otros grupos étnicos. En nuestro país, hasta el presente estudio, se desconocía cual era la frecuencia del síndrome, por lo que resultan de interés los datos obtenidos en esta población de individuos, aún cuando el número de pacientes estudiados es pequeño con respecto a los estudios realizados. Sin embargo, los datos obtenidos nos permiten inferir que la frecuencia del síndrome en nuestra población es similar a la reportada para otros grupos.

La ausencia de características clínicas del padecimiento en el período neonatal inmediato, dificulta la identificación de estos pacientes tempranamente. Sólo se ha mencionado que el peso suele ser algo mayor al promedio (33-37).

En nuestros datos, encontramos que el valor promedio del peso al nacimiento para todo el grupo fue de 3,040 g, mientras que en los varones con fra(X) fue de 3,033 g. Considerando que el promedio para varones en población general es de 3,480+/- 480 g (198) , el peso al nacimiento de los niños afectados no fue mayor que el de la población general.

El fenotipo característico se instala en forma progresiva, así por ejemplo, el aumento del perímetro cefálico (>pc:75), el frontal y los pabellones auriculares prominentes e hipotonía aparecen durante la primera infancia. En cambio, el prognatismo y el macroorquidismo se presentan en la pubertad en más de 80 % de los afectados. Otras anomalías observadas en los pacientes tales como : paladar alto, estrabismo, miopía, pectus excavatum, dilatación de la base aórtica, prolapso de la válvula mitral, hiperlaxitud articular de manos y pie plano, se observan en 20 a 60% (35-42). Sin embargo, existe un grupo de pacientes en quienes las alteraciones fenotípicas características, no están presentes y el diagnóstico se realiza por un estudio citogenético al demostrar el marcador fra (X) con un índice de expresión >6 % (1).

En nuestros varones fra (X) el perímetro cefálico se encontró dentro del límite normal para sus edades, entre las percentilas 3 y 50.

Los datos clínicos característicos del síndrome tales como: prognatismo, pabellones auriculares grandes de implantación baja, hipotonía, escoliosis e hiperlordosis, estuvieron presentes con mayor frecuencia en los pacientes con fra(X) que en el resto del grupo. La hipotonía sólo se observó en el par de gemelos estudiados.

En los casos diagnosticados como síndrome de X frágil en base a su expresión citogenética , encontramos correlación positiva entre aquellos con un mayor índice de expresión de fra(X)

y mayor número de datos clínicos asociados (Casos RJM y LCA).

Sin embargo en la mayoría de los estudios realizados en varones, no se ha demostrado correlación entre el nivel de expresión citogenética y el fenotipo del síndrome (43).

En el grupo estudiado no se observaron clínicamente alteraciones neurológicas, debido en gran parte a que la mayoría reciben tratamiento medicamentoso para manejar crisis de ausencia, crisis convulsivas, conducta autista, hiperactividad y trastornos de la atención .

En los pacientes con síndrome de X frágil informados en la literatura se encuentra como dato común el retraso mental de severidad variable aún dentro de los miembros de una misma familia. El C.I está entre 20-60, con una media de 30-45 (46-48). Existen alteraciones en la conducta, que se consideran útiles en el diagnóstico tales como, movimientos estereotipados de manos y contacto visual pobre con una frecuencia de 60 y 90 % respectivamente. El patrón del lenguaje también se encuentra alterado en aquellos con RM moderado o limítrofe. Presentando tartamudeo, lenguaje rápido de escaso contenido, frases cortas, repetitivas y ecolalia. Los pacientes con RM severo o profundo, con frecuencia no desarrollan el lenguaje (49-52). Los problemas de atención, en la mayoría de los casos se asocian con hiperactividad, la cual es más notable durante la etapa prepuberal (37,46).

Existe una estrecha asociación entre este síndrome y el autismo, habiéndose reconocido que aproximadamente 5.3-15.7 % de los pacientes autistas son positivos para fra(X) (53-57).

En nuestro grupo, la evaluación del C.I y alteraciones psicológicas demostró mayor severidad en aquellos pacientes con mayor expresión citogenética del marcador fra(X) (Tabla X).

El patrón de herencia del síndrome de X frágil se considera actualmente como dominante ligado al X, de penetrancia incompleta y modificado por el patrón de inactivación del X (124). Sherman y cols (43,44) afirmaron que el patrón de herencia representa una forma única dentro de la genética humana. En el que se postula, que los descendientes de las madres portadoras tienen una incidencia de RM de 40 % para los varones y 16 % para las hijas.

De acuerdo a los antecedentes heredofamiliares de RM, la familia del paciente RJM (Figura 5), en la que fue posible estudiar al hermano gemelo (III.5), a la madre (II.4) y a la abuela materna (I.2), se demuestra el patrón de herencia propuesto por Sherman (43). Sin embargo, el tío materno (II.1) tiene tres hijos aparentemente sanos (III.1,2,3), pero estos no fueron revisados. Si considerásemos este dato cierto, la condición clínica de II.1 podría corresponder a la de un varón transmisor que hubiera recibido la mutación como una pequeña inserción del fragmento repetido (CCG), que no es suficiente para lograr la expresión clínica de la enfermedad (192). Y que a su vez, lo mismo esté ocurriendo en sus hijas (III.2,3) quienes tendrían también la condición clínica de portadoras. O bien, que II.1 hubiese heredado de su madre el cromosoma X normal.

En los pacientes LCA y JAM el antecedente familiar de RM es negativo (Figura 5), pero debido a las características

moleculares de fra(X) es posible que las madres de ambos sean portadoras de esta alteración; desafortunadamente el estudio citogenético no pudo ser realizado en ellas. Sin embargo, es importante recordar que en estudios citogenéticos de familias donde se presenta un caso esporádico de un varón con síndrome de X frágil, se encuentran otros miembros de la familia que llevan la mutación. Esto indica, que la mayoría de los casos aislados son heredados y no resultado de una mutación de novo en el probando (133). La interpretación que se ha dado a estos datos, es que la mutación inicial en el transmisor no es capaz de causar RM. Por lo tanto, la expresión clínica del padecimiento podría requerir de un segundo evento, que ocurre durante la meiosis femenina para hacer el RM clínicamente manifiesto en los descendientes (24,127,134,135). Laird (121) ha propuesto una hipótesis interesante para explicar esta mutación. El sugiere que la mutación fra(X), resulta de una mutación que localmente bloquea la reactivación completa de un cromosoma X inactivo. Propone que este síndrome resulta de una inactividad transcripcional continua del gen o genes en Xq27, inactividad que resulta por el bloqueo local de la reactivación que normalmente ocurre previa a la ovogénesis. Un cromosoma fra (X) mutado ha resultado a través del paso de un ciclo de inactivación y de reactivación incompleta. Se sabe que el patrón de metilación del DNA está implicado en la inactivación del X. Una alteración de la secuencia de bases a gran escala, podría ser la base para los patrones alterados de metilación.

En este estudio encontramos , cuatro pacientes con una expresión de fra(X) de 2 %, lo que no es suficiente para confirmar el

diagnóstico de X frágil, por lo que sería conveniente considerar en los pacientes FRS y MHF los hallazgos del árbol genealógico. El paciente FRS (Figura 5), tiene 4 primos hermanos (III.1-5) por línea materna afectados con RM y cariotipo normal. En este caso se plantean dos posibilidades: uno, que se trate de un síndrome de RM inespecífico ligado al X, o bien, que sea un síndrome de X frágil con baja expresión clínica y citogenética, debido a la heterogeneidad del padecimiento.

En el caso de la familia del paciente MHF (Figura 5), encontramos RM en III.3 y deficiencia en el aprendizaje en III.2, tartamudeo y dificultad para el aprendizaje en II.3 (Figura 5). Sin embargo, no encontramos expresión de fra(X) en ellas, únicamente en el propósito, sin embargo, tampoco en este caso podemos descartar la presencia del síndrome de X frágil.

#### V. CONCLUSIONES.

La frecuencia del síndrome de X frágil en nuestro estudio fue de 6 %, que es similar a la reportada para otros grupos étnicos. Este dato constituye un antecedente importante para el diagnóstico de la enfermedad en nuestra población y manejo subsecuente de los pacientes y para la búsqueda intencionada de portadores, ya que se puede inferir que su frecuencia en población general probablemente sea similar a la reportada en otras. Su importancia se refuerza si consideramos la necesidad de otorgar asesoramiento genético oportuno en las familias afectadas a través de la detección de portadores.

Analizando los resultados observamos que, la frecuencia de pacientes con RM con antecedentes heredofamiliares es de 28 %, de éstos 16% presentó un patrón de herencia ligado al X, lo que concuerda con lo reportado en la literatura. Los datos subrayan la importancia de realizar un estudio genético completo en todos los casos de RM para determinar su diagnóstico.

En el síndrome de X frágil la presencia de rasgos fenotípicos característicos sin el marcador citogenético y presencia de éste sin los datos clínicos, nos permite sugerir la conveniencia de incorporar este estudio en su evaluación diagnóstica. Por otra parte detección oportuna de portadoras de fra(X) permitirá ofrecer un asesoramiento genético adecuado. En los casos de los pacientes que mostraron una expresión citogenética de fra (X) de 2%, en quienes no se puede descartar la presencia del síndrome, deberán ser cultivados nuevamente bajo otras técnicas de inducción para X frágil antes de emitir un diagnóstico definitivo.

Los estudios de evaluación clínica para diagnóstico en casos de RM deben incluir: antecedentes heredofamiliares acerca de RM, peso al nacimiento, desarrollo psicomotor, somatometría, tamaño testicular, descripción fenotípica, pruebas de C.I, evaluación neurológica y estudio citogenético con técnica habitual y con técnica de inducción para X frágil.

El avance que en la actualidad han tenido las técnicas de biología molecular han permitido lograr un mayor conocimiento

acerca de los mecanismos de producción del síndrome de X frágil entre el grupo de RM ligados al X , permitiendo la elaboración de estrategias más eficientes para su comprensión y diagnóstico.

## VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- GLASS I A. X linked mental retardation. J Med Genet 28:361-371,1991.
- 2.- LEHRKE R. A theory of X-linkage of major intellectual traits. Am J Ment Defic 76:611-619, 1972.
- 3.- PENROSE LS. A clinical and genetic study of 1 280 cases of mental defect ( special report series no. 299). Medical Research Council. London, England. 1938.
- 4.- TURNER G, JACOBS P: Marker(X) linked mental retardation. Adv Hum Genet. 13:83-90,1983.
- 5.- TURNER G, TURNER B: X-linked mental retardation. J Med Genet 11:109-113,1974.
- 6.- BUNDEY S, THAKE A, TODD J. The recurrence risks for mild idiopathic mental retardation. J Med Genet 26: 260-266, 1989.
- 7.- NUSSBAUM AL, LEDBETTER D H: Fragile X syndrome: a unique mutation in man. Annu Rev Genet 20:109-145,1986.
- 8.- BROWN WT, JENKINS EC, KRAWCZUN MS, WISNIEWSKI K, RUDELLI R, COHEN IL Y COLS. The fragile X syndrome. Ann NY Acad Sci 477:129-150,1986.
- 9.- HERBST DS. Non-specific X-linked mental retardation I. A review with information from 24 new families. Am J Med Genet 7: 443-460, 1990.
- 10.- TURNER G: Historical overview of X-linked mental retardation. In Hagerman RJ, Mc Bogg PM, (eds): The fragile X syndrome: Diagnosis, Biochemistry and Intervention, Dillon, CO, Spectra Publishing, 1-15, 1983.
- 11.- LEHRKE RG: X- linked mental retardation and verbal disability. Birth Defects X:1-100, 1974.
- 12.- MARTIN JP, BELL J :A pedigree of mental defect showing sex linkage. J Neurol Neurosurg Psychiatry 6:154-157, 1943.

- 13.-RICHARDS BW, SYLVESTER PE, BROOKER C. Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. J Ment Defic Res 25: 253-256, 1981.
- 14.-LUBS HA: A marker X chromosome. Am J Hum Genet 21:231-244,1969.
- 15.-SUTHERLAND GR:Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science 197:265-266,1977.
- 16.-GIRAUD F, AYME S, MATTEI JF, MATTEI MG:Constitutional chromosomal breakage. Hum Genet 34:125-136, 1976.
- 17.-HARVEY J, JUDGE C, WIENER S: Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. J Med Genet 14:46-50,1977.
- 18.-VERMA RS, BABU A: Human chromosomes. Manual of basic techniques . Pergamon press, 116-124, 1989.
- 19.-SUTHERLAND GR, MATTEI JF.Report of the committee on cytogenetic markers HGM 10. Cytogenet Cell Genet 48:503-512, 1989.
- 20.-OPITZ JM, HOLT MC, SPANO LM: Bibliography on X-linked mental retardation and related subjects I. Am J Med Genet 17:62-70, 1984.
- 21.-OPITZ JM, HOLT MC, SPANO LM: Bibliography on X-linked mental retardation and related subjects II.Am J Med Genet 21:719-722,1985.
- 22.-OPITZ JM, HOLT MC, SPANO LM: Bibliography on X-linked mental retardation and related subjects III. Am J Med Genet 23:69-83,1986.
- 23.-OPITZ JM: Editorial comment: On the gates of hell and a most unusual gene. Am J Med Genet 23:1-10, 1986.
- 24.-WEBB TP, BUNDEY SE, THAKE AJ, TODD J:Population incidence and segregation ratios in the Martin Bell syndrome.Am J Med Genet 23:573-580, 1986.
- 25.-TURNER G, ROBINSON H, LAING S, PURVIS-SMITH S: Preventive screening for the fragile X syndrome. N Engl J Med 315:607-609,1986.
- 26.-WINTER RM:Population genetics implications of the premutation hypothesis for the generation of the fragile X mental retardation gene. Hum Genet 75:269-271,1987.

- 27.-MERYASH DL: Perception of burden among at-risk women of raising a child with fragile-X syndrome. Clin Genet 36:15-23, 1989.
- 28.-BLOOMQUIST HK, GUSTAVSON KH, HOLMGREN G, NORDENSON I, SWEINS A: Fragile site X chromosomes and X-linked mental retardation in severely retarded boys in a northern Swedish county. A prevalence study. Clin Genet 21: 209-214, 1982.
- 29.-SANFILIPPO S, RAGUSA RM, MUSUMECI S, NERI G: Fragil X mental retardation: prevalence in a group of institutionalized patients in Italy and description of a novel EEG pattern. Am J Med Genet 23: 589-596, 1986.
- 30.-VENTER PA, HOF JO, COETZEE DJ: The Martin Bell syndrome in South Africa. Am J Med Genet 23:597-601, 1986.
- 31.-GUSTAVSON K-H, BLOMQUIST H, K:SON HB, HOLMGREN G: Prevalence of the fragile X syndrome in mentally retarded boys in a Swedish country. Am J Med Genet 23:581-586, 1986.
- 32.-JACOBS PA, MAYER M, ABRUZZO MA: Studies of the fragile (X) syndrome in populations of mentally retarded individuals in Hawaii. Am J Med Genet 23:567-571, 1986.
- 33.-SUTHERLAND GR, HECHT F, MULLEY JC, GLOVER TW, HECHT BK: The fragile X: physical phenotype. In fragile sites on human chromosomes. New York, Oxford University Press, 95-112, 1985.
- 34.-BUTLER MG, MANGRUM T, GUPTA R, SINGH DN: A 15-item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. Clin Genet 39: 347-354, 1991.
- 35.-LOESH ZD, SCOTT D: Application of the anthropometric discriminant functions in estimation of carrier probabilities in Martin-Bell syndrome. Clin Genet 36:145-151, 1989.
- 36.-TURNER G, DANIEL A, FROST M: X-linked mental retardation macroorchidism, and the Xq 27 fragile site. J Pediatr 96:837-841, 1980.
- 37.-CHUDLEY AE, HAGERMAN RJ: Fragile X syndrome. J Pediatr 110:821-831, 1987.
- 38.-HAGERMAN RJ, SMITH ACM, MARINER R: Clinical features of the fragile X syndrome. In Hagerman RJ, McBogg PM (eds): The fragile X syndrome: Diagnosis, Biochemistry, and Intervention. Dillon, CO, Spectra Publishing, 53-71, 1983.
- 39.-OPITZ JM, WESTPHAL JM, DANIEL A: Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin Bell syndrome. Am J Med Genet 17:101-110, 1984.

- 40.-HAGERMAN RJ, VAN HORSEN K, SMITH ACM, MC GAVRAN L: Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 17:111-122, 1984.
- 41.-HAGERMAN RJ, SYNHORST DP: Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 17:123-128, 1984.
- 42.-LOEHR JP, SYNHORST DP, WOLFE PR, HAGERMAN RJ: Aortic root dilatation and mitral valve prolapse in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 23:189-196, 1986.
- 43.-SHERMAN SL, MORTON NE, JACOBS PA, TURNER G: The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann J Hum Genet* 48:21-37, 1984.
- 44.-SHERMAN SL, JACOBS PA, MORTON NE, FROSTER-ISKENIUS U, HOWARD PEEBLES PN, NIELSEN KB, PARTINGTON MW, SUTHERLAND GR, TURNER G, WATSON M: Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 69:289-299, 1985.
- 45.-SOUDEK D, PARTINGTON MW, LAWSON JS: The fragile X syndrome I: familial variation in the proportion of lymphocytes with the fragile site in males. *Am J Med Genet* 17: 241-248, 1984.
- 46.-CHUDLEY AE, KNOLL J, GERRARD JW, SHEPEL L, MC GAHEY E, ANDERSON J: Fragile (X) X-linked mental retardation I: relationship between age and intelligence and the frequency of expression of the fragil (X)(q28). *Am J Med Genet* 14:699-703, 1983.
- 47.-SUTHERLAND GR, HECHT F, MULLEY JC, GLOVER TW, HECHT BK: The fragile X: intelligence, behaviour and treatment. In *fragile sites on Human Chromosomes*. New York, Oxford University Press, 113-130, 1985.
- 48.-SUTHERLAND GR: Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects and cytogenetics. *Am J Med Genet* 31:136-146, 1979.
- 49.-CURFS LMG, BORHGRAEF M, WIEGERS A, SCHREPPERS-TIJDINK GAJ, FRYNS JP: Strengths and weaknesses in the cognitive profile of fra (X) patients. *Clin Genet* 36:405-410, 1989.
- 50.-HANSON DM, JACKSON AW, HAGERMAN RJ: Speech disturbances (cluttering) in mildly impaired males with the Martin Bell/fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 23:195-206, 1986.
- 51.-JACOBS P, GLOVER TW, MAYER M, FOX P, GERRARD JW, DUNN HG, HERBST DS: X-linked mental retardation: a study of seven families. *Am J Med Genet* 7:471-489, 1980.

- 52.-CURFS LMG,SCHREPPERS- TIJDINK G, WIEGERS A, BORGHGRAEF M, FRYNS JP: Intelligence and cognitive profile in the fra (X) syndrome: a longitudinal study in 18 fra (X) boys. J Med Genet 26:443-446, 1989.
- 53.-COHEN IL, SUDHALTER V, PFADT A, JENKINS EC, BROWN WT,VIETZE PM: Why are autism and the fragile-X syndrome associated? conceptual and methodological issues. Am J Hum Genet 48: 195-202, 1991.
- 54.-HAGERMAN RJ, JACKSON AW, LEVITAS A, RIMLAND B, BRADEN M:An analysis of autism in fifty males with the fragile X syndrome. Am J Med Genet 23:359-369,1986.
- 55.-BROWN WT,JENKINS ED, COHEN IL, FISH GS, WOLF-SCHEIN EG, GROSS A, WATERHOUSE L, FEIN D, MASON-BROTHERS A, RITVO E, RUTTENBERG BA, BENTLEY W, CASTELLS S: Fragile X and autism: a multicenter survey. Am J Med Genet 23:334-352, 1986.
- 56.-NIELSEN KB: Diagnosis of the fragile X syndrome ( Martin Bell syndrome): clinical findings in 27 males with the fragile site at Xq28. J Ment Defic Res 27:211-224,1983.
- 57.-WAHLSTROM J,GILBERG C, GUSTAVSON K-H, HOLMGREN G:Infantile autism and the fragile X. A swedish multicenter study.Am J Med Genet 23:403-416, 1986.
- 58.-FROSTER-ISKENIUS U, MC GILLIVRAY BC,DILL FJ, HALL JG, HERBST DS: Normal male carriers in the fra (X) form of X-linked mental retardation ( Martin - Bell syndrome) . Am J Med Genet 23:619-630,1986.
- 59.-WOHRLE D, FRYNS JP, STEINBACH P: Fragile X expression and X inactivation. Hum Genet 85:659-672, 1990.
- 60.-FROSTER-ISKENIUS U,SCHULZE A, SCHWINGER E: Transmission of the marker X syndrome trait by unaffected males: conclusions from studies of large families. Hum Genet 67:419-432,1984.
- 61.-HOWARD-PEEBLES PN,FRIEDMAN JM: Unaffected carrier males in families with fragile X syndrome. Am J Med Genet 37:956-960,1985.
- 62.-VOELCKLEL MA, PHILIP N, PIQUET C, PELLISSIER MC,OBERLE I, BIRG F, MATTEI MG, MATTEI JF: Study of a family with a fragile site of the X chromosome at Xq27-28 without mental retardation. Hum Genet 81: 353-362, 1989.
- 63.-TURNER G, BROOKWELL R, DANIEL A, SELIKOWITZ M, ZILIBOWITZ M: Heterozygous expression of X-linked mental retardation and X chromosome marker fra (X)(q27). New Eng J Med 303:662-667,1980.

- 64.-HAGERMAN RJ, CHUDLEY AE, KNOLL JH ET AL: Autism in fragile X females. Am J Med Genet 23: 265-276,1986.
- 65.-FISHBURN J, TURNER G, DANIEL A, BROOKWELL R. The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. Am J Med Genet 14:713-716,1983.
- 66.-VOGEL F, CRUSIO WE, KOVAC C, FRYNS JP, FREUND M: Selective advantage of fra(X) heterozygotes. Hum Genet 86:25-32,1990.
- 67.-BORGHGRAEF M, FRYNS JP, VAN DER BERGHE H: The female and the fragile X syndrome: data on clinical and psychological findings in 7 fra (X) carriers. Clin Genet 37:341-353,1990.
- 68.-FRYNS J-P: The female and the fragile X: a study of 144 obligate carrier females. Am J Med Genet 23:157-162,1986.
- 69.-REISS AL, FEINSTEIN C, TOOMEY KE. Psychiatric disability associated with the fragile X chromosome. Am J Med Genet 23: 393-396, 1986.
- 70.-VOULLAIRE LE, WEBB GC, LEVERSHA M: Fragile X testing in a diagnostic cytogenetics laboratory. J Med Genet 26:439-446,1989.
- 71.-WALDSTEIN G, MIERAU G, AHMAD R, THIBODEAU SN, HAGERMAN RJ, CALDWELL S: Fragile X syndrome: skin elastin abnormalities in Gilbert EF, Opitz JM (eds): Genetic aspects of developmental pathology: Birth Defects 23 (1): 103-108, 1987.
- 72.-JOHANNISSON R, REHDER H, WENDT V, SCHWINGER E: Spermatogenesis in two patients with the fragile X syndrome I: Histology: light and electron microscopy. Hum Genet 76:141-146, 1987.
- 73.-CANTU JM, SCAGLIA H, MEDINA M, GONZALEZ-DIDDI M, MORATO T, MORENO ME, PEREZ - PALACIOS G: Inherited congenital normofunctional testicular hyperplasia and mental deficiency. Hum Genet 33 :23-32, 1976.
- 74.-BERKOVITZ GD, WILSON DP, CARPENTER NJ, BROWN TR, MIGEON CJ: Gonadal function in men with the Martin Bell (fragile X) syndrome. Am J Med Genet 23:227-240, 1986.

- 75.-JENKINS ED, BROWN WT, BROOKS J, DUNCAN CJ, RUDELLI RD, WISNIEWSKI HM: Experience with prenatal fragile X detection. *Am J Med Genet* 17:215-220, 1984.
- 76.-TURNER G, OPITZ JM, BROWN WT, DAVIES KE, JACOBS PA, JENKINS EC, MIKKESEN M, PARTINGTON MW, SUTHERLAND GR: Conference report: second international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* 23:11-29, 1986.
- 77.-RUDELLI RD, BROWN WT, WISNIEWSKI K, JENKINS EC, LAURE-KAMIONOWSKA M, CONNELL F: Adult fragile X syndrome, clinicopathological findings. *Acta Neuropathol* 67:289-294, 1985.
- 78.-REISS AL, FREUND L, TSENG JE, JOSHI PK: Neuroanatomy in fragile X females: the posterior fossa. *Am J Hum Genet* 49: 279-287, 1991.
- 79.-SUTHERLAND GR: Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Med Genet* 31:125-135, 1979.
- 80.-FITCHETT M, SEABRIGTH M: Deleted X chromosomes in patients with the fragile X syndrome. *J Med Genet* 20:280-288, 1983.
- 81.-HARRISON CJ, JACK EM, ALLEN TD, HARRIS R: The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet* 20:291-294, 1983.
- 82.-SUTHERLAND GR, HECHT F, MULLEY JC, GLOVER TW, HECHT BK: Biochemistry of the fragile site expression. In fragile sites on human chromosomes. New York, Oxford University Press, 80-92, 1985.
- 83.-SUTHERLAND GR, LEDBETTER DH. Report of the committee on cytogenetic markers. *HGM 10. Cytogenet Cell Genet* 51: 452-458, 1989.
- 84.-DANIEL A, EKBLOM L, PHILLIPS S: Constitutive fragile sites 1p31, 3p14, 6q26 y 16q23 and their use as controls for false-negative results with the fragile (X). *Am J Med Genet* 18:483-489, 1984.
- 85.-GLOVER TW, BERGER C, COYLE J, ECHO B: DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* 67:136-142, 1984.
- 86.-YUNIS JJ, SORENG AL: Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226:1199-1204, 1984.
- 87.-SUTHERLAND GR, PARSLOW MI, BAKER E: New classes of common fragile sites induced by 5-azacytidine and BrdU. *Hum Genet* 69: 233-242, 1985.

- 88.-DANIEL A: Clinical implications and classification of the constitutive fragile sites. Am J Med Genet 23:419-427, 1986.
- 89.-HECHT F, HECHT BK: Fragile sites and breakpoints in constitutional rearrangements II. Amniocentesis. Clin Genet 26: 169-173, 1984.
- 90.-SHABTAI F, HART J, KLAR D, HALBRECHT I: Familial fragile site found at the cancer breakpoint (1)(q32): inducibility by distamycin A concomitance with fragile (16)(q22). Hum Genet 73:232-234, 1986.
- 91.-SUTHERLAND GR, BAKER E: Effects of nucleotides on expression of the folate sensitive fragile sites. Am J Med Genet 23:409-417, 1986.
- 92.-NUSSBAUM RL, WALMSLEY RM, LESKO JG, AIRHART SD, LEDBETTER DH: Thymidylate synthase-deficient Chinese hamster cells: A selection system for human chromosome 18 and experimental system for the study of thymidylate synthase regulation and fragile X expression. Am J Med Genet 37:1192-1198, 1982.
- 93.-HARDEN DG, KLINGER HP (eds): ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Published in collaboration with Cytogen Cell Genet. Basel, Karger, 1985.
- 94.-YUNIS JJ, SORENG AL, BOWE AE: Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. Oncogenes 1:59-69, 1987.
- 95.-HECHT F, HECHT BK: Fragile sites and chromosomes breakpoints in constitutional rearrangements II. Spontaneous abortions, stillbirths and newborns. Clin Genet 26:174-177, 1984.
- 96.-GARCIA-SAGREDO JM, SAN ROMAN C, GOMEZ MEG, LLEDO G: Fragile chromosome 16 (q22) causes a balanced translocation at the same point. Hum Genet 65:211-213, 1983.
- 97.-VOULLAIRE LE, WEBB GC, LEVERSHA MA: Chromosome deletion at 11q23 in an abnormal child from a family with inherited fragility at 11q23. Hum Genet 76:202-206, 1987.
- 98.-LEBEAU MM: Chromosomal fragile sites and cancer - specific rearrangements. Blood 67:849-856, 1986.
- 99.-GOLLIN SM, PERROT LJ, GRAY BA, KLETZEL M: Spontaneous expression of fra (11)(q23) in a patient with Ewing's sarcoma and t(11;22)(q23;q11). Cancer Genet Cytogenet 20:331-337, 1986.
100. SIMMERS RN, SUTHERLAND GR, WEST A, RICHARDS RI: Fragile sites at 16q22 are not at the breakpoint of the chromosomal rearrangement in AMMoL. Science 236:92-94, 1987.

101. GLOVER TW: FudR induction of the X chromosome fragile site: Evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am J Hum Genet* 33:234-242, 1981.
102. TOMMERUP N, POULSEN H, NIELSEN KB: 5-Fluoro-2'-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet* 18:374-376, 1981.
103. SUTHERLAND GR, BAKER E, FRATINI A: Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am J Med Genet* 22:433-443, 1985.
104. BJURSELL G, REICHARD P: Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 248:3904-3912, 1973.
105. COLLINS ARS, DOWNES CS, JOHNSON RT: Introduction: An integrated view of inhibited repair. In Collins A, Downes CS, Johnson RT, (eds): *DNA repair and its inhibition*, London, Nucleic Acids Symposium Series, vol 1, 1-12, 1984.
106. GLOVER TW, COYLE-MORRIS J, MORGAN R: Fragile sites: overview, occurrence in acute nonlymphocytic leukemia, and effects of caffeine expression. *Cancer Genet Cytogenet* 19:141-146, 1986.
107. ABRUZZO MA, PETTAY D, MAYER M, JACOBS PA: The effects of caffeine on fragile X expression. *Hum Genet* 73:20-22, 1986.
108. LEDBETTER DH, AIRHART SD, NUSSBAUM RL: Caffeine enhances fragile (X) expression in somatic cell hybrids. *Am J Med Genet* 23:445-460, 1986.
109. ROBERTS JJ: Mechanism of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents. In Collins A, Downes CS, Johnson RT (eds): *DNA repair and its inhibition*. London, Nucleic Acids Symposium Series, vol 13, 193-215, 1984.
110. LAU CC, PARDEE AB: Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2942-2955, 1982.
111. PAINTER RB, YOUNG BR: Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7315-7319, 1980.
112. HITTLEMAN WN: Prematurely condensed chromosomes: A model system of visualizing effects of DNA damage, repair and inhibition at the level of chromosome structure. In Collins A, Downes SC, Johnson RT (eds): *DNA repair and its inhibition*. London, Nucleic Acids Symposium Series, vol 13, 341-347, 1984.

113. PHEAR G, NALBANTOGLU J, MEUTH M: Next-nucleotide effects in mutations driven by DNA precursor pool imbalances at the aprt locus in Chinese hamster ovary cells. Proc Natl Acad Sci USA 84: 4450-4458, 1987.
114. RICHARDS RG, SOWERS LC, LASZLO J, SEDWICK WD: Occurrence and consequences of deoxyuridine in DNA. Adv Enzyme Regul 22:157-163, 1984.
115. GOULIAN M, BLEILE B, TSENG BY: The effect of methotrexate on levels of dUTP in animal cells. J Biol Chem 255:10630-10638, 1980.
116. KRUMDIECK CL, HOWARD PEEBLES PN: On the nature of folic acid sensitive fragile sites on human chromosomes: An Hypothesis. Am J Med Genet 16:23-32, 1983.
117. TOMMERUP N: Induction of the fragile X on BrdU-substituted chromosomes with direct visualization of sister chromatid exchanges on banded chromosomes. Hum Genet 81:377-383, 1989.
118. OBERLE G, ZANKL M, ZANKL H: The expression of the fragile X chromosomes in members of the same family at different times of examination. Hum Genet 61:254-260, 1982.
119. RHOADS FA, OGLESBY AC, MAYER M, JACOBS PA: Marker X syndrome in an oriental family with probable transmission by a normal male. Am J Med Genet 12:205-212, 1982.
120. LEDBETTER DH, LEDBETTER SA, NUSSBAUM RL: Implications of the fragile X expression in normal males for the nature of the mutation. Nature 324: 161-163, 1986.
121. LARID CD, LAMB MM, THORNE JL: Two progenitor cells for human oögonia inferred from pedigree data and the X-inactivation imprinting model of the fragile-X syndrome. Am J Hum Genet 46:696-719, 1990.
122. SVED JA, LARID CD: Population genetic consequences of the fragile-X syndrome, based on the X-inactivation imprinting model. Am J Hum Genet 46:443-455, 1990.
123. SCHAAP TAMAR: The role of recombination in the evolution of the fragile X mutation. Hum Genet 82:79-86, 1989.
124. SUTHERLAND GR, MULLEY JC: Diagnostic molecular genetics of the fragile X. Clin Genet 37:2-11, 1990.
125. TUCKERMAN E, WEBB T, BUNDEY SE: Frequency and replication status of the fragile X, fra(X)(q27-28), in a pair of monozygotic twins of markedly differing intelligence. J Med Genet 22:85-91, 1985.

126. UCHIDA IA, JOYCE EM: Activity of the fragile X in heterozygous carriers. Am J Med Genet 34:286-293, 1982.
127. UCHIDA IA, FREEMAN VCP, JAMRO H, PARTINGTON MW, SOLTAN HC: Additional evidence for fragile X activity in heterozygous carriers. Am J Med Genet 35: 861-868, 1983.
128. PAUL J, FROSTER-ISKENIUS U, MOJE W, SCHWINGER E: Heterozygous female carriers of the marker-X-chromosome: IQ estimation and replication status of fra(X)(q). Hum Genet 66:344-350, 1984.
130. KNOLL JH, CHUDLEY AE, GERRARD JW: Fragile(x) X-linked mental retardation II. Frequency and replication pattern of fragile (X)(q28) in heterozygous. Am J Med Genet 36:640-649, 1984.
131. NIELSEN KB, TOMMERUP N, POULSEN H, JACOBSEN P, BECK B, MIKKELSEN M: Carrier detection and X-inactivation studies in the fragile X syndrome. Cytogenetic studies in 63 obligate and potential carriers of the fragile X. Hum Genet 64:240-253, 1983.
132. FRYNS JP, KLECZKOWSKA A, KUBIEN E, PETIT P, VAN DEN BERGHE H: Inactivation pattern of the fragile X in heterozygous carriers. Hum Genet 65:400-401, 1984.
132. CARPENTER NJ, LEICHTMAN LG, SAY B: Fragile X-linked mental retardation. A survey of 65 patients with mental retardation of unknown origin. Am J Dis Child 136:392-401, 1982.
133. JACOBS PA, SHERMAN S, TURNER G, WEBB T : The fragile (X) syndrome: the mutation problem. Am J Med Genet 23:611-623, 1986.
134. HOWELL RT, MC DERMOTT A: Replication status of the fragile X chromosome, fra(X)(q27), in three heterozygous females. Hum Genet 62:282-284, 1982.
135. ROCCHI M, ARCHIDIACONO N, RINALDI A, FILIPPI G, BARTOLUCCI, SANNIO FANCELLO G, SINISCALCO M: Mental retardation in heterozygotes for the fragile-X mutation: evidence in favor of an X inactivation-dependent effect. Am J Hum Genet 46: 738-743, 1990.
136. OPITZ JM, SUTHERLAND GR: Conference report: International Workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. Am J Med Genet 17:5-94, 1984.
137. MC KUSICK VA: Mendelian inheritance in man, 7th ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, p 1417, 1986.
138. FROSTER - ISKENIUS U, HALL JG, CURRY CJR: False negative results in patients with fra (X)(q) mental retardation taking oral vitamin supplements (Letter to the editor). N Engl J Med 316:1093-1095, 1987.

139. BROWN WT, JENKINS EC, FRIEDMAN E, BROOKS J, COHEN IL, DUNCAN C, HILL AL, MALIK MN, MORRIS V, WOLF E, WISNIEWSKI K, FRENCH JH: Folic acid therapy in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 17:289-299, 1984.
140. SUTHERLAND GR, HECHT F, MULLEY JC, GLOVER TW, HECHT BK: Tissue culture factors in fragile site expression. In *fragile sites in human chromosomes*. New York, Oxford University Press, 59-64, 1985.
141. FROSTER-ISKENIUS U, BODEKER K, OEPEN T, MATTHES R, PIPER U, SCHWINGEWER E: Folic acid treatment in males and females with fragile (X) syndrome. *Am J Med Genet* 23:273-281, 1986.
142. WEBB TP, RODECK CH, NICOLAIDES KH, GODSEN CM: Prenatal diagnosis of the fragile X syndrome using fetal blood and amniotic fluid. *Prenat Diagn* 7:203-205, 1987.
143. DEARCE MA: Tables for the cytogenetic study of fragile X Chromosomes for diagnosis purposes. *Clin Genet* 24:320-329, 1983.
144. JENKINS ED, BROWN WT, BROOKS J, DUNCAN CJ, SANZ MM, SILVERMAN WP, LELE KP, MASIA A, KATZ E, LUBIN RA, NOLIN SL: Low frequencies of apparently fragile X chromosomes in normal control cultures: a possible explanation. *Exp Cell Biol* 54:40-49, 1986.
145. MARLHENS F, AL ACHKAR W, AURIAS A, COUTURIER J, DUTRILLAUX AM, GERBAULT-SEREAU M, HOFFSCHIR F, LAMOLIATTE E, LEFRANCOIS D, LOMBAR M, MULIERIS M, PRIEUR M, PROD'HOMME M, SABATIER L, VIEGAS-PEQUIGNOT E, VOLOBOUEV V, DUTRILLAUX B: The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adults controls. *Hum Genet* 73:290-297, 1986.
146. TOMMERUP N, NIELSEN KB, MIKKELSEN M: Marker X chromosome induction in fibroblasts by FUDR. *Am J Med Genet* 9:263-267, 1981.
147. FONATSCH C: A simple method to demonstrate the fragile X chromosome in fibroblasts. *Hum Genet* 59: 186-191, 1981.
148. MATTEI MG, MATTEI J-F, VIDAL I, GIRAUD E: Expression in lymphocyte and fibroblast culture of the fragile X chromosome: A new technical approach. *Hum Genet* 50:166-169, 1981.
149. SUTHERLAND GR, BAKER E: Induction of fragile sites in fibroblasts. *Am J Med Genet* 38: 573-575, 1986.
150. SUTHERLAND GR: Heritable fragile sites on human chromosomes I: factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 31:125-135, 1979.

151. POPOVICH BW, ROSENBLATT DS, COOPER BA, VEKEMANS M: Intracellular folate distribution in cultured fibroblasts from patients with the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 35:869-873, 1983.
152. JACOBS PA, HUNT PA, MAYER M, WANG J-C, BOSS GR, ERBE RW: Expression of the marker (X)(q28) in lymphoblastoid cell lines. *Am J Med Genet* 34: 552-557, 1982.
153. BROWN WT. Invited editorial: The fragile X: progress toward solving the puzzle. *Am J Hum Genet* 47: 175-180, 1990.
154. JENKINS EC, BROWN WT, DUNCAN CJ, BROOKS J, YISHAY MB, GIORDANO FM, NITOWSKY HM: Feasibility of fragile X chromosome prenatal diagnosis demonstrated. *Lancet* 2:1292-1296, 1981.
155. SHAPIRO LR, WILMOT PL, BRENHOLZ P, LEFF A, MARTINO M, HARRIS G, MAHONEY MJ, HOBBS JC: Prenatal diagnosis of fragile X chromosome. *Lancet* 1:99-103, 1982.
156. JENKINS EC, BROWN WT, WILSON MG, LIN MS, ALFI OS, WASSMAN ER, BROOKS J, DUNCAN CJ, MASIA A, KRAWCZUN MS: The prenatal detection of the fragile X chromosome: Review of recent experience. *Am J Med Genet* 23: 297-302, 1986.
157. SUTHERLAND GR, BAKER E, PURVIS-SMITH S, HOCKEY A, KRUMINS E, EICHENBAUM SZ. Prenatal diagnosis of the fragile X using thymidine induction. *Prenat Diagn* 7:197-200, 1987.
158. TOMMERUP N, SONDERGAARD F, TONNESEN T, KRISTENSEN M, ARVEILER B, SCHINZEL A: First trimester prenatal diagnosis of a male fetus with fragile X. *Lancet* 1:870, 1985.
159. International Fetoscopy Group Special Report: The status of fetoscopy and fetal tissue sampling. *Prenat Diagn* 4:79-92, 1984.
160. DAFFOS F, CAPELLA-PAVLOVSKY M, FORESTIER F: Fetal blood sampling via the umbilical cord using a needle guided by ultrasound: Report of 66 cases. *Prenat Diagn* 3:271-277, 1983.
161. HOBBS JC, GRANNUM PA, ROMERO R, REECE EA, MAHONEY MJ: Percutaneous umbilical blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 152:1-5, 1985.
162. PATTERSON M, BELL M, KRESS W, DAVIES KE, FROSTER-ISKENIUS U: Linkage studies in a large fragile X family. *Am J Hum Genet* 4: 684-688, 1988.
163. FILIPPI G, RINALDI A, ARCHIDIACONO N, ROCCHI M, BALASZ I, SINASCALCO M: Brief report: Linkage between G6PD and fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 15:113-114, 1983.

164. GOODFELLOW PN, DAVIES KE, ROPERS H-H: Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes. Eighth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 40:296-305, 1985.
165. DAVIES KE: DNA studies of X-linked mental retardation associated with a fragile site at Xq27. *Am J Med Genet* 23:633-640, 1986.
166. MATTEI MG, BAETEMAN MA, HELIG R, OBERLE I, DAVIES K: Localization by in situ hybridization of the coagulation factor IX gene and of two polymorphic DNA probes with respect to the fragile X site. *Hum Genet* 69:327-331, 1985.
167. OBERLE I, HEILIG R, MOISAN JP, KLOEPFER C: Fragile-X mental retardation syndrome with two flanking polymorphic DNA markers. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1016-1020, 1986.
168. PURRELLO M, ALHODEFF B, ESPOSITO D, SZABO P, ROCCHI M, SINASCALCO M: The human genes for hemophilia A and hemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3. *EMBO J* 4:725-728, 1985.
169. PURRELLO M, STEVENSON RE, SAUL RA, MANDEL J-L, SINASCALCO M: The common RFLP detected by probe St14 is located between the loci for the fragile X syndrome and G6PD. *Am J Med Genet* 37: A171, 1985.
170. DRAYNA D, DAVIES K, HARTLEY D, MANDEL J-L, CAMERINO G: Genetic mapping of the human X chromosome by using restriction fragment length polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2836-2841, 1984.
171. DRAYNA D, WHITE R: Genetic linkage map of the human X chromosome. *Science* 230:753-758, 1985.
172. HYLAND VJ, FERNANDEZ KEW, CALLEN DF, MC KINNON RN, BAKER E, FRIEND K, SUTHERLAND GR: Assignment of anonymous DNA probes to specific intervals of human chromosomes 16 and X. *Hum Genet* 83:61-66, 1989.
173. HARTLEY DA, DAVIES KE, DRAYNA D, WHITE RL, WILLIAMSON R: A cytological map of the human X chromosome-evidence for nonrandom recombination. *Nucleic Acids Res* 12:5277-5281, 1984.
174. SZABO P, PURRELLO M, ROCCHI M, ARCHIDIACONO N, ALHADEFF B: Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X-site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7855-7857, 1984.
175. NUSSBAUM RL, AIRHART SD, LEDBETTER DH: Recombination and amplification of the pyrimidine-rich sequences may be responsible for initiation and progression of the Xq27 fragile site: an hypothesis. *Am J Med Genet* 23:715-721, 1986.

176. PEMBREY ME, WINTER RM, DAVIES KE: A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am J Med Genet* 21:709-718, 1985.
177. MC KINNON RN, HIRST MC, BELL MV, WATSON JEV, CLAUSSEN U, LUDECKE HJ, SENGER G, HORSTHEMKE B, DAVIES KE: Microdissection of the Fragile X Region. *Am J Hum Genet* 47:181-186, 1990.
178. SUTHERS GK, HYLAND VJ, CALLEN DF, OBERLE I, ROCCHI M, THOMAS NS, MORRIS CP, SCHWARTZ CE, SCHMIDT M, ROPERS HH, BAKER E, OOSTRA BA, DAHL N, WILSON PJ, HOPWOOD JJ, SUTHERLAND GR: Physical mapping of new DNA probes near the fragile X mutation (FRAXA) by using a panel of cell lines. *Am J Hum Genet* 47:187-195, 1990.
179. LEDBETTER SA, LEDBETTER DH: A common fragile site at Xq27: theoretical and practical implications. *Am J Hum Genet* 42:694-702, 1988.
180. WARREN ST, ZHANG F, LICAMELI GR, PETERS JF: The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of the fragile sites. *Science* 237: 420-423, 1987.
181. DAHL N, HAMMARSTROM-HEEROMA K, GOONEWARDENA P, WADELIUS C, GUSTAVSON K-H, HOLMGREN G, VAN OMMEN GJB, PETTERSSON U: Isolation of a DNA probe of potential use for diagnosis of the fragile-X syndrome. *Hum Genet* 82:216-218, 1989.
182. DOBKIN CS, BROWN WT. Pulsed field gradient-gel studies around the fragile site. *Am J Med Genet* 30:593-600, 1988.
183. SOOD R, MULLIGAN LM, POON R, WHITE BN, HOLDEN JJA: Genetic mapping of two new DNA markers in Xq26-q28 relative to the fragile-X syndrome locus. *Am J Hum Genet* 47:395-399, 1990.
184. BELL MV, HIRST MC, NAKAHORI Y: Physical mapping across the fragile X syndrome. *Cell* 64: 861-872, 1991.
185. VINCENT A, HEITZ D, PETIT C, KRETZ C, OBERLE I, MANDEL JL: Abnormal pattern detected in fragile X patients by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature* 349: 624-625, 1991.
186. DAVIES K: Breaking the fragile X. *Nature* 351: 439-440, 1991.
187. CRAIG I: Methylation and the fragile X. *Nature* 349:742-743, 1991.
188. OBERLE I, ROUSSEAU F, HEITZ D, KRETZ C, DEVYS D, HANAUER A, BOUE J, BERTHEAS MF, MANDEL JL: Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252:1097-1100, 1991.

- 189.HALL GJ: Genomic imprinting: review and a relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 46: 857-873, 1990.
- 190.VERKEREK AJMH, PIERETTI M, SUTCLIFFE JS, FU Y-H, KUHL DPA: Identification of a gene (FMR-1) containing a CCG repeat coincident with a brakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65:905-918, 1991.
- 191.KREMER EJ, PRITCHARD M, LYNCH M, YU S, HOLMAN K, BAKER E, SUTHERLAND GR ET AL. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 252:1711-1714, 1991.
- 192.WEBB T. Fragmenting the fragile X. *Current Biol* 1 (5): 293-295, 1991.
- 193.LEVITAS A, BRADEN M, VAN NORMAN K: Treatment and intervention. In Hagerman RJ, Mc Bogg PM (eds): *The Fragile X Syndrome: Diagnosis, Biochemistry, and Intervention*. Dillon, CO, Spectra Publishing, 201-228,1983.
- 194.BROWN WT, COHEN IL, FISH GS, WOLF-SCHEIN EG, JENKINS VA, MALIK MN, JENKINS EC: High dose folic acid treatment of fragile (X) males. *Am J Med Genet* 23:263-271, 1986.
- 195.HAGERMAN RJ, JACKSON AW, LEVITAS A, BRADEN M, MC BOGG P, KEMPER M, MCGRAVAN L, BERRY R, MATUS I, HAGERMAN PJ: Oral folic acid versus placebo in the treatment of males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 23:241-248, 1986.
- 196.ROSENBLATT DS, DUSCHENES EA, HELLSTROM FV, GOLICK MS, VEKEMANS MJJ, ZEESMAN SF, ANDERMANN E: Folic acid blinded trial in identical twins with fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 37: 543-552, 1985.
- 197.WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nature of the problem. Mental retardation: meeting the challenge. WHO offset publication 86: 8-12, 1985.
- 198.RAMOS GALVAN R. Somatometría pediátrica. *Arch Inv Clin* 6: 601-645, 1975.