



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES



IZTACALA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL
SÍNDROME X FRÁGIL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA

ARACELI HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ASESOR

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Los Reyes Iztacala, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Dedicatoria

Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía. Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia.

A mi hijo

Jesús Jonatán: gracias por comprender que a veces no había tiempo para que estuviéramos juntos, como tanto me gusta, pero sabes una cosa te quiero mucho.

A mis padres

Salvador y Teo: gracias por confiar en mí, y darme una segunda oportunidad.

A mis hermanos

Erika: por tenerme tanta paciencia, comprensión y darme ese pequeño gran empujón que me hacía falta.

Alberto: gracias por tus pláticas, que me levantaron el ánimo de seguir adelante.

Finalmente a

Carlos: por el apoyo brindado que me diste.

Gracias a todos ustedes, por su apoyo, paciencia y comprensión que me brindaron y por compartir mis metas y mis sueños.

Agradecimientos

Teoría es cuando se sabe todo y nada funciona; práctica, cuando todo funciona y nadie sabe por qué.

Dr. Diego Arenas: gracias por su asesoramiento en la realización de este trabajo, por su apoyo y amistad durante todo este tiempo además de la comprensión que me brindo cuando lo necesitaba.

A los sinodales: Por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

M. en C. Martha Salcedo Álvarez

Dr. Ramon Víctor Moreno Torres

M. en C. Ma. Eugenia Heres Pulido

M. en C. Irma Elena Dueñas García

A mis Maestros del Laboratorio: por los consejos, comentarios y recomendaciones en alguna etapa de la realización de este trabajo, así como resolver mis grandes dudas.

Dra. Carolina Barrientos: gracias Dra. por el apoyo que me brindo durante la estancia en el laboratorio.

Dr. Normand García: gracias por los consejos y regaños que me ayudaron mucho.

Dra. Rosenda Peñalosa

QFB. Mario Flores

QFB J. Antonio Cervantes

Técnico: Antonio Rivera

M. en C. Laura Castañeda

M. en C. Alejandro Monsalvo

A mis compañeros de la Unidad de Genética:

Rubén, Ángeles, Elda, José, Sócrates, Ulises, Ignacio, Abraham, Carmen, Pilar, Alma, José Luis, Aldo, y a todos los demás, por los momentos de alegría y desesperación que pasamos juntos.

A mis compañeros de La FES

Max, Sara, Erika, Gustavo, Nadia, Ricardo, Jonathan, Carmen, Bianca, Diego, Rosita, Natalia, Farid, Mario.

Al COMECyT: por el apoyo económico brindado para la terminación de la tesis, en diciembre del 2008.

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS, y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Diego Julio Arenas Aranda.

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Síndrome X frágil	4
Definición	4
Herencia	5
Manifestaciones clínicas	7
Gen <i>FMR1</i>	8
Expansión de los repetidos CGG	10
Proteína <i>FMRP</i>	12
Premutación	14
Diagnóstico del Síndrome X frágil	15
Antecedentes	23
Justificación	26
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
1 Elaboración de la sonda molecular para la hibridación Southern	28
1.1 Diseño de la sonda	28
1.2 Diseño de los oligonucleótidos para la sonda	29
1.3 Extracción de DNA a partir de sangre periférica usando SDS y NaCl	30
1.4 Electroforesis en geles de agarosa	30
1.5 Síntesis de DNA para la sonda	31
1.6 Purificación del fragmento de PCR en gel de agarosa	32
1.7 Restricción del fragmento de 1212 de DNA	33
1.8 Marcaje de la sonda	33
2. Doble restricción de DNA genómico de alto peso molecular de individuos a estudiar	34

3. Análisis de DNA genómico de pacientes con SXF mediante hibridación Southern	34
4. Diagnóstico molecular del SXF en varones	37
4.1 Pacientes	37
4.2 Aislamiento de RNA total	37
4.3 Determinación del transcrito del gen <i>FMR1</i> por RT-PCR	38
RESULTADOS	40
1. Elaboración de la sonda.....	40
1.1. Diseño de la sonda	40
1.2. Características de los oligonucleótidos.....	41
1.3. Amplificación del fragmento de la sonda molecular.....	41
1.4. Purificación de la sonda.....	43
1.5. Restricción con la enzima PstI.....	44
2. Determinación del transcrito del gen <i>FMR1</i> por RT-PCR.....	45
2.1. Obtención de RNA total, a partir de individuos varones con historia clínica compatible con el SXF.....	45
2.2. Diagnóstico molecular en pacientes varones con el SXF.....	48
3. Prueba de la sonda con pacientes con SXF mediante Hibridación Southern.....	51
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	73
ABREVIATURAS	79

RESUMEN

El Síndrome del cromosoma X Frágil (SXF) es considerado como la primera causa de retraso mental hereditario. Éste es causado por una mutación que se encuentra en el gen *FMR1* situado en el sitio X frágil (Xq27.3) la cual consiste en una expansión del trinucleótido CGG ubicada en la región 5' sin traducir, del exón 1 del gen *FMR1*; la población normal posee entre 5/50 repetidos CGG; en portadores se incrementan a 50/200 repetidos y en afectados hay 200/1000 o más repetidos, lo que desencadena hipermetilación, que silencia el gen que no produce a la proteína FMRP. Ésta regula la producción de proteínas cerebrales y se localiza en la sinapsis neuronal y su pérdida altera la plasticidad sináptica implicada en el aprendizaje y la memoria. Se han diseñado una serie de técnicas moleculares para el diagnóstico de estos pacientes, entre las que se incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), síntesis de cDNA (RT-PCR), análisis inmunohistoquímico e hibridación Southern. Ésta última es frecuentemente utilizada para visualizar el tamaño de las secuencias repetidas en personas portadoras y afectadas. Se aisló una sonda molecular para el diagnóstico del SXF con la técnica de hibridación Southern. Ésta se obtuvo por PCR convencional, utilizando DNA de un varón clínicamente sano; se verificó la identidad de la sonda mediante la enzima de restricción PstI y para la hibridación el DNA se cortó con las enzimas EcoRI y EagI, esta última sensible a la metilación. Se hibridó con la sonda molecular marcada con ³²P por oligos al azar, y se hizo la identificación de portadores y personas con SXF de ambos sexos. Se realizó el diagnóstico a varones utilizando RT-PCR, a partir de sangre periférica de posibles portadores

del síndrome. La concentración e integridad se verificó por geles de agarosa y espectrofotometría. Se obtuvo el diagnóstico de una mujer portadora y un niño con la mutación completa del SXF por hibridación Southern. Se ha corroborado la exclusión del síndrome en 10 pacientes varones con retraso mental idiopático por síntesis de cDNA. La sonda podrá ser usada para el diagnóstico del SXF y el número de repetidos en familias en riesgo.

INTRODUCCIÓN

El genoma humano contiene 23, 279 genes distintos que codifican proteínas y se localizan en 23 pares de cromosoma (Assembly and Genebuild, Mayo 2009). Estos genes diferentes representan secuencias de DNA exclusivas que existen en copias únicas. Además de las secuencias únicas, existen secuencias repetidas de DNA no codificante de varios tipos, se estima que corresponde al 20-40% del DNA genómico total. Estas secuencias repetidas se dividen en dos clases principales: secuencias escasamente repetitivas y secuencias altamente repetitivas (Cabrera y Herráez, 2001). El DNA altamente repetitivo también se denomina DNA satélite, está formado por unidades de pequeño tamaño (2-50 pb), repetidas en tándem entre miles y un millón de veces (Baynes y Dominiczak, 2005).

Las secuencias escasamente repetitivas se distribuyen a lo largo de todos los cromosomas, con un número de repeticiones no muy elevado (entre 10^2 y 10^4); se subdividen en dos categorías: DNA minisatélite y DNA microsatélite y constituyen conjuntamente entre el 5-15% del genoma. El DNA minisatélite, está formado por repeticiones de 10 a 65 pb, ricas en GC, agrupadas en tándem formando bloques relativamente grandes, distribuidos por todo el genoma y con elevado polimorfismo. El DNA microsatélite, está constituido por repeticiones inferiores a 7 pb que se presentan agrupadas en tándem y en bloques de hasta 50 repeticiones, distribuidos de forma dispersa por el genoma. Dentro de esta categoría, los repetidos de tres nucleótidos (trinucleótidos) están cerca de regiones codificantes de algunos genes y la alteración en el número de trinucleótidos repetidos puede ocasionar enfermedades genéticas (Cabrera y Herráez, 2001)

En el genoma humano se han caracterizado cuatro grupos de repetidos de trinucleótidos: CGG/GCC, CAG/GTC, CTG/GAC y GAA/CTT relacionados con diez enfermedades genéticas, donde la alteración es la expansión de sus repeticiones. Algunas están relacionadas con sitios frágiles en los cromosomas y cuando se encuentran expandidas pueden existir hasta 2000 o más copias de la secuencia repetida. Un ejemplo son las secuencias CGG/GCC, que por lo regular se localizan en las regiones no codificadoras de distintos genes, y cuando se expanden por arriba de 55 repetidos, se asocian con sitios frágiles del cromosoma. El número de repetidos en personas no afectadas es variable, sin embargo, para CGG se han caracterizado al menos siete sitios frágiles en los cromosomas humanos, los cuales son visibles citogenéticamente como un adelgazamiento en regiones específicas de los cromosomas en metafase (Arenas y cols., 1999, Marquis y cols., 1995).

SÍNDROME X FRÁGIL

DEFINICIÓN

El Síndrome X frágil (SXF) es el síndrome genético hereditario más frecuente, causante de retraso mental en humanos, que afecta principalmente a varones (Verkerk y cols., 1991). Su nombre se deriva del sitio frágil característico en la banda Xq27.3 (Figura 1) que se visualiza como una constricción secundaria en Xq28, y que se debe a una mutación del gen *FMR1* localizado en esta región (Acevedo y cols., 1996). Los últimos estudios acerca de la prevalencia del síndrome estiman que su frecuencia en la población general es de 1/4000 en

ANTECEDENTES

La información relacionada con el diagnóstico del SXF en individuos sanos y afectados es un tema estudiado en muchas poblaciones del mundo. En lo que respecta a población mexicana, los estudios realizados son pocos y principalmente se han obtenido de población mestiza de Jalisco. El SXF en México es aun subdiagnosticado aunque en otras partes el mundo se realizan varias pruebas moleculares, como rutina cotidiana de todos los pacientes que presentan retraso mental (Ramos, 2001 y Verkerk y cols., 1999).

Díaz en 1991, realizó el primer reporte relacionado con el gen *FMR1* en población mexicana; incluyó en su estudio a individuos de población mestiza del estado de Jalisco, entre los cuales se encontraban 18 individuos afectados con el SXF, pertenecientes a 10 familias mexicanas con 40 miembros de primero y segundo grado que contaban con diagnóstico citogenético y como grupo control 76 individuos sin antecedentes de retraso mental. Mediante las técnicas de PCR y Southern determinaron el número de repetidos CGG y el estatus de metilación del gen *FMR1* en alelos normales, con premutación y con mutación completa (Díaz y cols., 1995).

De acuerdo a los resultados de los estudios citogenéticos en familias, la mitad de los varones afectados y ninguna de las mujeres portadoras o afectadas presentaron el sitio frágil. Este alto porcentaje de individuos no diagnosticados por la prueba enfatizó la necesidad de contar con un método alternativo para el análisis molecular en pacientes con X frágil e individuos sanos.

Los modelos de bandeo obtenidos mediante Southern blot en muchos de los individuos incluidos en su estudio mostraron mosaicismo. Por otra parte, sus resultados en gemelos monocigotos discordantes están de acuerdo con las observaciones y la propuesta de la participación de la metilación en la patología del síndrome. En ambos gemelos se observaron bandas con más de 200 repetidos de CGG característicos de la mutación completa, lo cual les permitió asumir que se generó la hipermetilación de este fragmento y la inactivación del gen *FMR1*, sin embargo el resultado es que solamente uno de los gemelos manifestó el retraso mental.

Pérez en 1999, implementó el diagnóstico molecular en pacientes con historia clínica compatible con el síndrome de X frágil en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional s.XXI. Mediante RT-PCR evaluaron la presencia o ausencia del transcrito del gen *FMR1* a partir del RNA total de pacientes con retraso mental. Se analizaron 18 pacientes de sexo masculino que se clasificaron en tres grupos de acuerdo a los antecedentes clínicos. El resultado del análisis mostró que únicamente uno de los individuos fue positivo al diagnóstico, mientras los otros diecisiete presentaron el transcrito de *FMR1*. Aunque la muestra poblacional de su estudio es baja, la incidencia del SXF en la población estudiada fue de 5% (1/18 pacientes). Estos resultados sugirieron que la incidencia del SXF en población mexicana es baja, o que al igual que en otras poblaciones exista un subdiagnóstico de la enfermedad como consecuencia del bajo porcentaje de individuos que acuden a la clínica para ser diagnosticados.

Rosales y cols., en 2005, determinaron las frecuencias alélicas de los repetidos de CGG y el status de metilación de las islas CpG y del gen *FMR1* en una muestra de la población mexicana que incluía individuos mestizos del estado de Jalisco. Esta muestra estaba conformada por 129 individuos no relacionados entre sí, e incluyó 83 individuos sanos (38 varones y 45 mujeres) y 46 pacientes varones con retraso mental (30). La metodología que utilizaron les permitió realizar la amplificación del fragmento de repetidos CGG mediante PCR para alelos normales y de premutación, pero no así para alelos con mutación completa. Para determinar el status de metilación del gen, realizaron una segunda reacción de PCR que consistió en realizar una modificación al DNA con un tratamiento con bisulfito de sodio previo a la reacción de PCR, debido a que permite la conversión de residuos de citosinas desmetilados a uracilos evitando la formación de estructuras secundarias de fragmentos de alto contenido de CG.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia médica de este padecimiento, desde los años 70 se han desarrollado técnicas de diagnóstico precisas y necesarias para identificar la presencia de mutaciones del gen *FMR1* en pacientes con el diagnóstico clínico de X frágil. En México es muy difícil que se realice el diagnóstico molecular, por lo que muchos de los pacientes con un diagnóstico clínico probable no reciben la confirmación del mismo.

Dado que las diversas técnicas nos proporcionan diferente información y solo algunas de ellas son útiles en la determinación de la premutación y del número de repetidos, es necesario realizar técnicas como la hibradación Southern, ya que nos permite determinar si está alterado el número de repetidos presentes en el extremo 5', además del estado de metilación del gen *FMR1*.

Además de confirmar el diagnóstico, también es necesario detectar a las mujeres con premutación. El conocer la mutación y premutación en individuos afectados facilita detectar a portadores con X frágil y por tanto en poder informar el riesgo de enfermedades asociadas y alteraciones en el gen *FMR1* durante el asesoramiento genético. Ya que en nuestro país es difícil obtener las sondas sintetizadas, fue necesario diseñarla y probarla en una muestra de la población mexicana para poder ofrecer un método de diagnóstico preciso para las familias con datos clínicos de esta patología.

OBJETIVO GENERAL:

- 1.- Desarrollar una sonda para el diagnóstico molecular del SXF, para emplearse en la técnica de hibridación Southern, en una muestra de la población mexicana.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Diseñar y estandarizar una sonda molecular para la hibridación Southern, que detecte el número y estado de metilación de los repetidos CGG del gen *FMR1*.
- 2.- Evaluar la funcionalidad de la sonda elaborada en una familia afectada con el SXF.
- 3.- Determinar la presencia o ausencia del transcrito del gen *FMR1*, en individuos varones con diagnóstico clínico compatible con X Frágil.

MATERIALES Y MÉTODOS

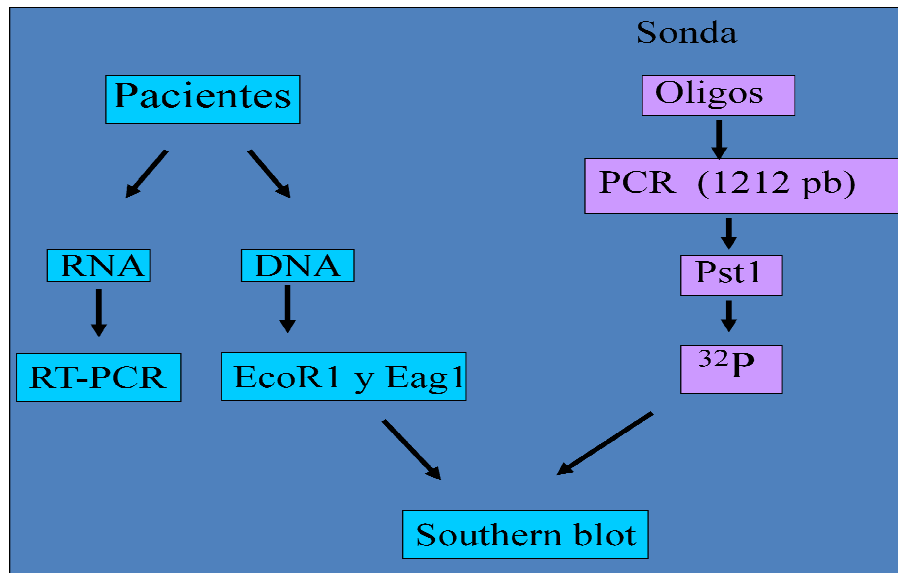


Fig. 8. Diagrama de la metodología. Se muestran los diferentes tipos de metodología utilizados para la elaboración de la hibridación Southern

1. ELABORACIÓN DE LA SONDA MOLECULAR PARA LA HIBRIDACIÓN SOUTHERN

1.1 Aislamiento de la sonda

Para la construcción de la sonda molecular, se buscó la secuencia completa del gen *FMR1* en la base de datos del *Gen Bank*, se localizaron los sitios de corte de *EcoR1* y *Eag1*, entre la isla CpG y el primer intrón del gen. En esa región se aisló la sonda molecular para la identificación de este padecimiento (Figura 9).

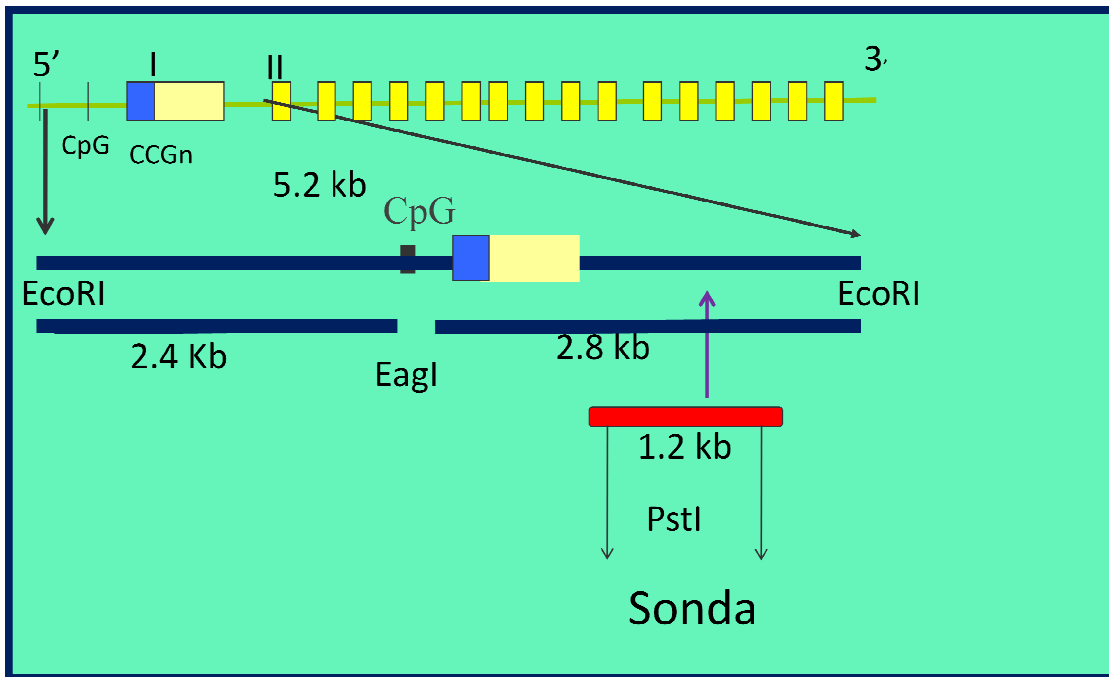


FIG. 9. DISEÑO DE LA SONDA. Se muestran los sitios de corte de EagI y EcoRI y la región de donde se aisló la sonda. Modificado de Tarletón (32).

1.2 Diseño de los oligonucleótidos para la sonda

A partir de la secuencia del gen *FMR1* (Homo sapiens fragile X mental retardation 1 (FMR1) on chromosome X, 2002) se buscaron dos sitios de corte de la enzima de restricción (PstI), ubicados después de la región del intrón I (Figura 9), se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de la sonda, aproximadamente 50 pb antes y después, corriente arriba y abajo respectivamente, de los sitios de corte de PstI. Con el programa Oligo versión 4.1 se diseñaron los oligonucleótidos introduciendo la secuencia dada por Gen Bank del gen *FMR1* con clave de acceso L29074 L38501 VERSION L29074.1, tomando en cuenta las características de diseño de un oligonucleótido como temperatura, número de nucleótidos, porcentaje de GC, y se mandaron a sintetizar en invitrogen.

1.3 Extracción de DNA a partir de sangre periférica usando SDS y Cloruro de Sodio (Pérez, 1998)

Se tomaron 5 ml de sangre periférica de un individuo con diagnóstico clínico SXF varón, en un tubo que contenía EDTA al 0.5% (pH = 7.6) ya que no debe usarse heparina porque inhibe la acción de las enzimas de restricción. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Con una pipeta se tomó la capa de leucocitos (interfase o capa blanca de la superficie del paquete), sin importar que hubiera eritrocitos contaminantes y se pasó a un tubo estéril de 15 mL. Se agregaron al tubo aproximadamente 10 a 14 mL de solución de lisis de eritrocitos (RCLB, Tris 10 mM pH=7.6, MgCl 5 mM y NaCl 10 mM). Se mezcló con Vórtex (2 - 3 min) se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante, teniendo cuidado de no eliminar la pastilla de leucocitos; este paso se repitió al menos dos veces más, hasta que quedó blanca.

Se resuspendió la pastilla en NaCl 5 mM agitando fuertemente con Vórtex, y se agregó SDS al 10% agitando el tubo y se adicionaron 308 µl de NaCl saturado, se centrifugó 30 min a 15, 000 rpm a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante y se procedió hacer la extracción fenólica (25:24:1 fenol: cloroformo:isoamílico) extrayendo la región acuosa superior. Se precipitó el DNA con solución de isopropanol, o 2 volúmenes de etanol. Se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en 500 µl de agua desionizada esterilizada.

1.4. Electroforesis en geles de Agarosa (Perez 1998)

Una vez obtenido el DNA se corroboró su integridad y pureza. En una cámara electroforética cerrada herméticamente, se agregó agarosa 0.8%, previamente fundida en TBE 1X (0.089 M de Tris-borato, EDTA al 0.05 M y 0.08 M de ácido

bórico), con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) hasta alcanzar un grosor adecuado. Una vez polimerizada la agarosa, se cubrió con la solución de corrida TBE 1X. Se mezclaron 2 µl. de colorante de corrida (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de cianol xileno y 30% de glicerol) y la muestra del ácido nucleico que se depositó en el pozo del gel. Se aplicó a la cámara electroforética una corriente eléctrica de aproximadamente 100 V durante 60 min. Una vez terminada la electroforesis, se observó el gel en un transluminador de UV de onda corta y se tomó una fotografía con el analizador de imágenes.

1.5 SÍNTESIS DE DNA PARA LA SONDA

A partir del DNA obtenido del individuo clínicamente sano, se realizó la PCR que se llevó al cabo con buffer 1X (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5% *Tween* 20 y 0.5% Nonidet-P40), 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmol de oligonucleótidos previamente diseñados (ver sección 1.2 de este capítulo), 200 ng de DNA, 1.5 U de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 20 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador, bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguida de 45 ciclos de 95°C durante 1 min. y 53°C durante 30 seg., 72°C durante 1 min. y una extensión final de 10 min a 72°C. Una vez terminada la amplificación, una alícuota se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1.5% a 100 V durante 4 h para determinar la presencia del fragmento esperado de 1212 pb. Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 1 o 2 Kb.

1.6. PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE PCR EN GEL DE AGAROSA

Una vez separados los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (banda de 1212 pb) se procedió a purificar la banda del gel con el Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, cortándola y colocándola en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y registrando el peso. Por cada 10 mg de gel de agarosa cortado se adicionaron 10 µl de buffer de disolución de gel, esto fue incubado a 60 °C por 15 min hasta hacer una mezcla homogénea.

Se colocaron 600 µl de la mezcla en las columnas para instalarse en tubos de colecta de 2 mL. La mezcla se incubó 1 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 x g durante 30 s. Posteriormente se desecharon los residuos del gel de agarosa del tubo de colecta y se colocó nuevamente el cartucho. A éste se le agregaron 500 µl del buffer de lavado y se centrifugó 16000 x g durante 30 s, desechando el tubo de colecta y pasando la columna a un tubo Eppendorf. Se añadieron a la columna 10 µl de buffer de dilución al centro de la membrana, incubándose 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 16000 x g durante unos 10 min para obtener la pastilla del fragmento esperado.

Posteriormente se determinó la concentración y el grado de pureza del fragmento de 1212 pb por espectrofotometría utilizando 1 µl de la muestra, determinando la densidad óptica a 260 nanómetros. Para establecer el grado de pureza de la solución, se tomó en cuenta el cociente de 260/280 nanómetros que debe de ser de 1.8. Una vez terminado el proceso de purificación, 1 µl se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 80 V durante 2 h para determinar la

presencia del fragmento esperado de 1212 pb. Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 1 ó 2 Kb.

1.7. RESTRICCIÓN DEL FRAGMENTO DE 1212 DE DNA

Una vez definida la concentración de DNA genómico a restringir, se mezclaron 500 ng con las soluciones buffer 1X (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 1 mM Ditiotritol con pH 7.9), enzima de restricción Pst1 (40,000 u/ mL) y se ajustó a un volumen de 20 µl con agua desionizada estéril. Se incubó la muestra 4 h a 37 °C para activar la enzima y se inactivó durante 30 min. a 80 °C en un termociclador. Después de la restricción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1.5% a 80 V durante 4 h para determinar la presencia del fragmento esperado de 1000 pb aproximadamente. Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 1 ó 2 Kb.

1.8. MARCAJE DE LA SONDA

A un tubo Eppendorf se adicionaron 25 ng de DNA a marcar, 15 µl de agua desionizada esteril y se desnaturalizó a 95 °C por 2 min. A esto se adicionaron 500 µM de dNTPs (A, T y G, 500 µM en 1 mM de Tris-HCL (pH 7.5)), 2.5X de *Random Primers* (125 mM de Tris-HCl (pH 6.8), 12.5 mM de MgCl₂, 25 mM 2-mercaptoetanol, 150 µl/mL *random* octámeros), 50 µCi de desoxicitosina 5' (P³² - α) trifosfato (dCTP), aforando a un volumen de 49 µl, se mezcló con una microcentrífuga en frío. Se adicionó 1 µl de *Klenow Fragment* (40 U/ µl *Klenow fragment* en un buffer de 50 mM KPO₄ (pH 7.0), 100 mM KCl, 1mM DTT y 50 % de glicerol (v/v), se centrifugó de 15 a 30 s para ser incubado a 37 °C por 10 min. Se

adicionaron 5 µl de buffer stop (0.5 M EDTA (pH 8.0)) para detener la reacción. La sonda marcada se precipitó con ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril.

2. DOBLE RESTRICCIÓN DE DNA GENÓMICO DE ALTO PESO MOLECULAR DE INDIVIDUOS A ESTUDIAR (SINDEN 1999)

Una vez estandarizadas las condiciones de la doble restricción se procedió hacer la digestión en las muestras de un individuo sano y dos pacientes. La concentración de DNA genómico a restringir fue de 10 µg, se agregó buffer 1X (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Ditiotritol, pH 7.9), 50 U de la enzima EagI sensible a la metilación, 80 unidades de EcoRI y se aforó con agua estéril a 50 µl. Se centrifugó la muestra unos segundos en una microcentrífuga y la mezcla se incubó a 37 °C por 4 h, y se inactivó a 65 °C por 30 min. Se centrifugó la muestra con 2 volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en 20-30 µl de agua desionizada estéril.

3. ANÁLISIS DE DNA GENÓMICO DE PACIENTES CON SXF MEDIANTE HIBRIDACIÓN SOUTHERN (SINDEN 1999)

Una vez terminada la restricción se separaron los productos mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8% sin bromuro de etidio, utilizando geles grandes (14 X 12 cm), y corriendo los productos durante 24 h a bajo voltaje (17 V). Después de terminar la electroforesis se tomó una fotografía con el analizador de imágenes. Se puso el gel en una palangana que contenía una solución

depurinizadora (0.25 M de HCl concentrado). Esta solución cubrió completamente el gel, se agitó la solución con el gel a temperatura ambiente durante 15 min, se eliminó la solución y se repitió lo anterior. Se eliminó la solución despurinizadora y se lavó el gel con agua destilada unos segundos. Se eliminó el agua destilada y se agregó la solución desnaturalizante (1.5 M de NaCl y 0.5 M de NaOH), la cual debía cubrir completamente el gel, se incubó 30 min a temperatura ambiente con agitación. Se eliminó la solución desnaturalizante y se lavó con agua destilada unos segundos. Se agregó la solución neutralizante (1.5 M NaCl, 0.5 de Tris- HCl pH=7.2 y EDTA 1,mM), cubriendo todo el gel. Se incubó 15 min a temperatura ambiente con agitación. Se repitió este paso una vez más, se eliminó la solución neutralizante y se preparó la transferencia.

A una palangana se agregó 1 L de solución de transferencia 10X de SSPE (3.6 M NaCl, 0.2 M de NaH_2PO_4 y 0.02 M de EDTA pH=7.7). Se puso una esponja sobre la solución, permitiendo que ésta quedara completamente impregnada de la solución. Sobre la esponja se pusieron 3 papeles Whatman 3 mm, previamente impregnados con la solución de transferencia. Los papeles se pusieron uno sobre otro y el tamaño fue aproximado al del gel. Se puso el gel sobre los papeles Whatman. Los pozos se orientaron hacia los papeles. Se colocó la membrana de nylon Hybón N sobre el gel cuidando que la membrana fuera del mismo tamaño del gel y se impregnó con la solución de transferencia. Sobre la membrana se pusieron 3 papeles Whatman de 3 mm, previamente impregnados con la solución de transferencia. Se puso un grupo de sanitas sobre los papeles Whatman, hasta alcanzar una altura de aproximadamente 5 cm. Las sanitas deben tener un

tamaño aproximado del gel y no deben tocar la solución de transferencia. Se puso sobre la sanitas un peso de 1 Kg aproximadamente. Se permitió la transferencia del DNA del gel a la membrana, al menos durante 16 h y después de la transferencia se separó cuidadosamente el sistema.

La membrana se lavó con 2 X de SSPE (3.6 M NaCl, 0.2 M de NaH_2PO_4 y 0.02 M de EDTA pH=7.7) y se dejó secar a temperatura ambiente de 10-20 min. Con la finalidad de verificar la transferencia se retiñó el gel con bromuro de etidio. Se fijó el DNA de la membrana con UV en un *cros-linker* con 312 o 365 nm, 8 min. Posteriormente se incubó con 50 mL de solución de prehibridación (DNA de salmón 0.20 mg, NaH_2PO_4 (pH=6.5) 49 mM, 5X de solución de Denharts (BSA al 0.1%, Ficoll al 0.1% y polivinilpiridolina al 0.1%), 16 h a 65 °C. Se desnaturalizó la sonda por calentamiento a 94 °C por 5 min y se adicionó a la solución de prehibridación. La mezcla se incubó al menos 12 h. a 65 °C. Después de la incubación se eliminó la solución de hibridación. Se lavó la membrana en condiciones de astringencia media (2X de SSPE), rápidamente se desechó la solución y se dio otro lavado igual de 15 min. Se realizaron lavados sucesivos en otras condiciones (1X de SSPE, SDS al 1%) tantas veces como fue necesario hasta que la membrana sonó de manera específica de 150 a 200, en la escala 1X de un contador *Geiger*.

Se dejó secar la membrana entre dos sanitas, a temperatura ambiente se metió la membrana a una bolsa de plástico transparente y se expuso a una placa autorradiográfica en un cassette con pantalla intensificadora, durante 5-10 días, finalmente se rebeló la placa en un STORM 860 y se analizó el patrón.

4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SXF A VARONES

(Perez, 1998)

4.1. PACIENTES

Ocho pacientes fueron referidos de la consulta externa del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional s.XXI con diagnóstico clínico de retraso mental en forma rutinaria y otros dos pacientes provenían del Hospital General de México, de ellos las muestras ya venían procesada en cDNA* .

4. 2. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

Se utilizaron 2.5 mL de sangre periférica que se sometieron a centrifugación diferencial en un gradiente de *Ficoll hypaque* 2:1 a 1500 rpm por 30 min. Los linfocitos se separaron de la interfase con una micropipeta de 200 µl y fueron lisados inmediatamente con 1000 µl de isotiocianato de guanidina (trizol), agregando 200 µl de cloroformo y agitando fuertemente para ser incubados a 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C retirando la fase acuosa, que fue precipitado con isopropanol helado 1:1, y se sometió a centrifugación a 160,000 rpm durante 20 min. Posteriormente se realizó un lavado con etanol 75%, y se secó boca abajo el Eppendorf, no más de 10 min. Finalmente se resuspendió en 20 µl de agua con dietil pirocarbono (DEPC) o en agua libre de RNasas y se almacenó a -70° C hasta su uso. Posteriormente se determinó la concentración y el grado de pureza del ARN por espectrofotometría, determinando la densidad óptica a 260 nanómetros. Para establecer el grado de pureza de la solución de RNA se tomó en cuenta el cociente de 260/280 nanómetros que debe de ser de 2.0. La integridad del RNA se

determinó por electroforesis en geles de agarosa 2% a 60 V durante 2 h, para lo cual se lava previamente la cámara electroforética con NaOH a 10 N.

4.3. DETERMINACIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN *FMR1* POR RT-PCR (Perez, 1998)

El RT-PCR se llevó al cabo con el Kit de *promega Impront II*, transcriptasa reversa, en RNA de sangre periférica de pacientes varones con X Frágil. Se utilizó un 1 µg de RNA para sintetizar la primera cadena de cDNA y 0.5 µg de oligo dt, en un volumen final de 5 µl, ajustando con agua DEPC libre de RNAsas. Se realizó incubando por 5 min a 70 °C e inmediatamente se colocó en hielo (4 °C) para adicionar la siguiente mezcla. Se agregó buffer 1X, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 5 mM, inhibidor de ribonucleasas, RNAsin 20 U, 1 µl de transcriptasa reversa y se ajustó con agua DEPC a un volumen total de 15 µl. Se juntó con la mezcla anterior y posteriormente se incubó a 25 °C por 5 min., luego 42 °C por 1 h para el alineamiento y síntesis, y finalmente a 70 °C para la inactivación de la enzima. El producto de la primera cadena de cDNA se utilizó para producir la segunda cadena mediante PCR. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos en la misma reacción, uno para ampliar una región del RNAm del gen *FMR1* que corresponde a un fragmento de 146 pb con los oligonucleótidos 4924 (5'TAG CTA ACC ACC AAC AGC AAG GC 3') y 4925 (5'AAC TGG CAG CCT GAT AGG CAG ATT C 3'), y otros para una región del gen HPRT (del inglés Hipoxantin *Phosforibosil transferase*) como control positivo, produciendo un fragmento de 387 pb correspondiente a los oligonucleótidos 244 (5'AAT TAT GGA CAG GAC TGA ACG T 3') y 243 (5'CGT GGG GTC CTT TTC ACC AGC3').

La reacción de PCR se llevó al cabo con buffer 1X (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0.5% *Tween* 20 y 0.5% Nonidet-P40), $MgCl_2$ 1.5 mM, 100 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos, 7 μ l de cDNA, 1.5 U de Taq DNA polimerasa, y se ajustó a un volumen final de 20 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 28 ciclos a 94 °C durante 1 min., 55 °C durante 1 min y 1 min 45 s a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72°C. Una vez terminada la amplificación, el producto se sometió a electroforesis en geles de agarosa 1.5% a 100 V durante 30 min para determinar la presencia o ausencia del transcrito del gen *FMR1* (banda de 146 pb). Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 50 o 100pb.

RESULTADOS.

1. ELABORACIÓN DE LA SONDA

1.1. DISEÑO DE LA SONDA

Para aislar la sonda molecular se buscaron los sitios de restricción de Pst1 (5'CTGCAG3') que se encontraron en las posiciones 14457 y 15533 (1076 pb) y a partir de esta región se diseñaron los oligonucleótidos que permitieran amplificarla, ubicados en la posición 14406-14427 (*forward*) y 15597-15618 (*reverse*) con 21 nucleótidos cada uno, como se muestra en la Figura 10 y la Tabla 3.

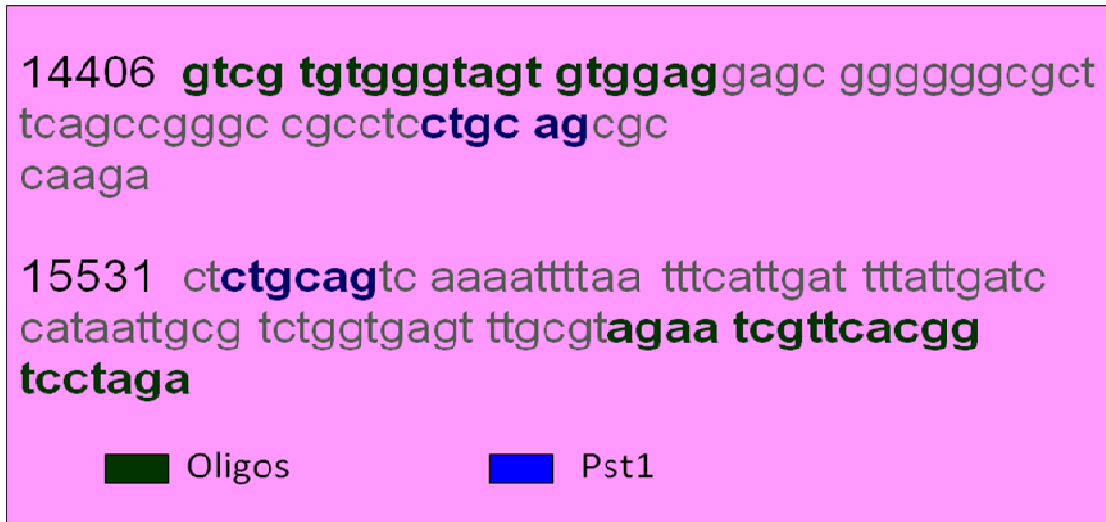


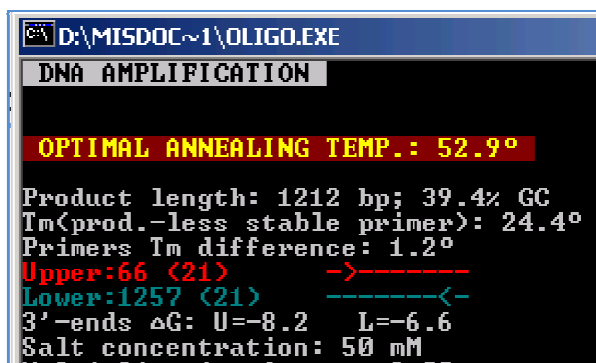
FIG. 10. SECUENCIA DE LA REGIÓN QUE SE AMPLIFICARA PARA LA SONDA. Se muestra en verde la posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la sonda molecular, y en azul el sitio de corte de Pst1 que fue utilizado para identificar la sonda molecular.

TABLA 3. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA SONDA MOLECULAR.

	Oligonucleótidos
<i>Forward</i>	5'gtcgtgtggg tagtgtgga g 3'
<i>Reverse</i>	5'agaatcgttc acggtcctag a 3'

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Una vez obtenido los oligonucleótidos en el programa Oligo versión 4.1, se procedió a ver si las características eran adecuadas, evaluando que el porcentaje de GC fuera menor al 50%, como fue de 39% se consideró óptimo. La diferencia de temperatura entre un oligonucleótido y otro debe de ser menor a 2.0 °C y éste fue de 1.2 °C. La temperatura de alineación para los oligonucleótidos fue de 52.9 °C y la longitud del producto fue de 1212 pb como se muestra en la Figura 11.



```
D:\MISDOC~1\OLIGO.EXE
DNA AMPLIFICATION
OPTIMAL ANNEALING TEMP.: 52.9°
Product length: 1212 bp; 39.4% GC
Tm(prod.-less stable primer): 24.4°
Primers Tm difference: 1.2°
Upper:66 (21)  ->-----
Lower:1257 (21)  -----<-
3'-ends ΔG: U=-8.2  L=-6.6
Salt concentration: 50 mM
```

FIG. 11. RESULTADOS DEL PROGRAMA OLIGO VERSIÓN 4.1. Se muestran las características de los oligonucleótidos de: temperatura de alineamiento, fragmento esperado y porcentaje de GCs.

1.3 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE LA Sonda MOLECULAR

Se extrajo DNA de sangre periférica de un varón no afectado con SXF y se obtuvo una concentración de 37 ng/ µl y una pureza de 1.7 a una absorbancia de 260/280 (Tabla 4 y Figura 12).

Tabla 4. CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO AISLADO DE UNA MUESTRA DE LINFOCITOS DE UN VARÓN SANO.

DNA de varón sano	ng/ μ l	Absorbancia 260/280
S ₁	37	1.73

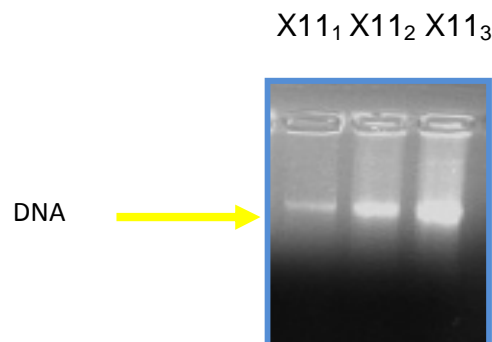


FIG. 12. DNA GENÓMICO AISLADO DE UN INDIVIDUO VARÓN NO AFECTADO POR EL SXF. Se observa en el gel la integridad del DNA genómico. X11 = varón sano

Una vez realizada la electroforesis, para verificar la integridad del DNA (Figura 12) se amplificó la sonda molecular mediante PCR. Con los gradientes de Mg, para ver cuál era la concentración óptima, se encontró que ésta era de 1.5 mM. El producto de PCR corrido en un gel de agarosa 1.5% demostró un producto de 1212 pb (Figura 13).

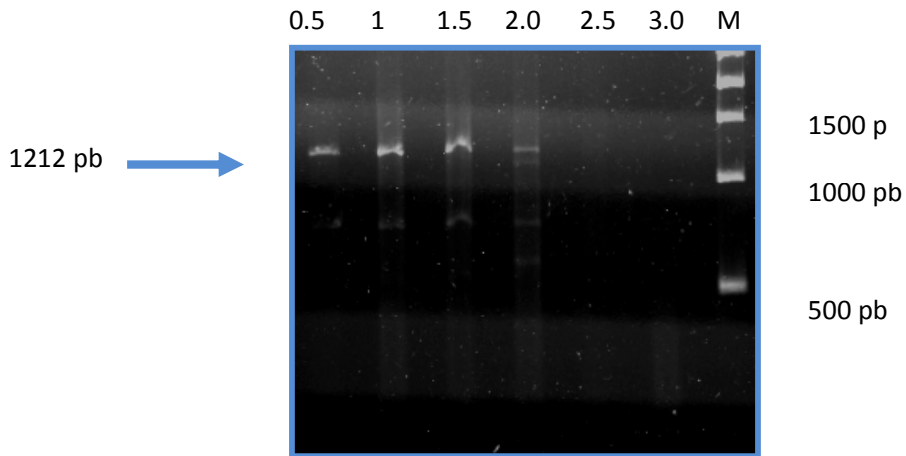


FIG. 13 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE LA SONDA MOLECULAR DEL GEN *FMR1*. PCR convencional de un fragmento de 1212 pb a diferentes concentraciones de Mg. (M) marcador de peso molecular de 1 Kb. (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 = concentración mM de Mg .

1.4 PURIFICACIÓN DE LA SONDA

La integridad del fragmento se verificó mediante electroforesis con una alícuota de 1 μ l en un gel de agarosa 1% en TBE 1X, el cual fue visible y estuvo íntegro. El fragmento esperado de 1212 pb se muestra en la Figura 14. Se cuantificó la muestra y se obtuvo un rendimiento de 32 ng/ μ l con una pureza óptima de 1.8 por absorbancia 260/280, como se muestra en la Tabla 5.

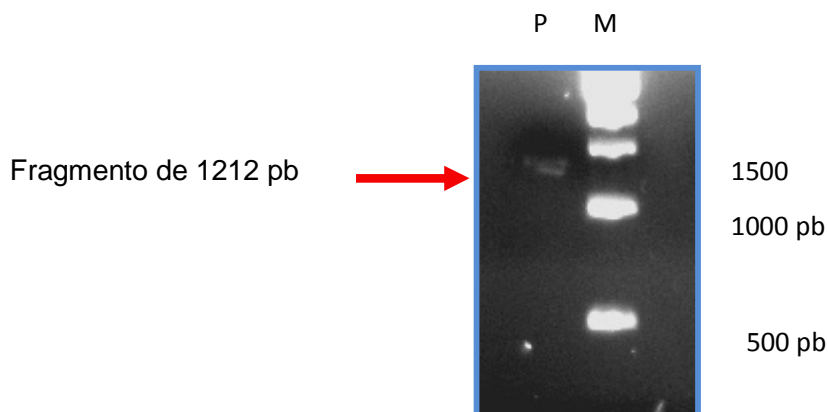


FIG. 14. PURIFICACIÓN DE LA SONDA. Se observa un fragmento íntegro de la sonda de 1212 pb (P). (M) marcador de 1 Kb.

Tabla 5 CUANTIFICACIÓN DEL PURIFICADO DE LA SONDA MOLECULAR

Purificado	ng/ μ l	Pureza 260/280 Absorbancia
P	32	1.8

1.5. RESTRICCIÓN CON LA ENZIMA PstI

Con el producto purificado se realizó la restricción con la enzima PstI; la electroforesis en gel de agarosa mostró una restricción parcial, pero con esto se verificó que la sonda molecular era la adecuada porque se distingue un fragmento de 1212 y otro de 1190 pb (Figura 15).

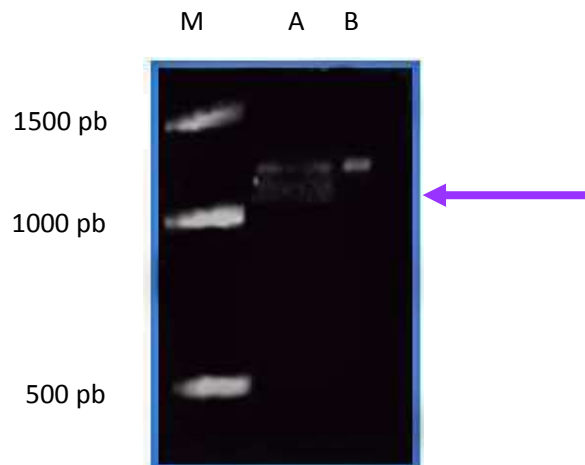


FIG. 15. RESTRICCIÓN DEL FRAGMENTO DE LA SONDA MOLECULAR DEL GEN *FMR1*. Carril A: la restricción con la enzima PstI produjo 2 fragmentos, uno de 1212 pb. y otro de 1190 pb. Carril B: se observa el fragmento de 1212 pb sin cortar con la enzima PstI.

El marcaje del fragmento amplificado se hizo con P^{32} teniendo las precauciones debidas y monitoreando con un contador *Geiger*; Se realizó la búsqueda de pacientes varones con el SXF por síntesis de cDNA y se hizo la hibridación con las muestras de DNA de los individuos a estudiar.

2 DETERMINACIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN *FMR1* POR RT-PCR

2.1 OBTENCIÓN DE RNA TOTAL, A PARTIR DE INDIVIDUOS VARONES CON HISTORIA CLÍNICA COMPATIBLE CON EL SXF.

Las concentraciones de RNA total obtenidas de acuerdo a la metodología 4.2, fueron óptimas en promedio de 500-1000 ng/μl, con una pureza de 1.7 a 2.

Tabla 6 CUANTIFICACIÓN DEL RNA ROTAL DERIVADO DE PACIENTES VARONES CON RETRASO MENTAL

Paciente	ng/μl	Pureza 260/280
X1	1770	2.2
X2	505	1.78
X3	508	1.98
X4	940	2.12
X5	1674	1.86
X6	108.8	2.2
X7	111	2.1
X8	1596	2.3
X9	*-----	-----
X10	*-----	-----

Estos RNAs no mostraron en su mayoría degradación después de la extracción y pudieron ser utilizados sin problemas, para la síntesis de la primera cadena de cDNA (Tabla 6 y Figuras 16 a la 23).

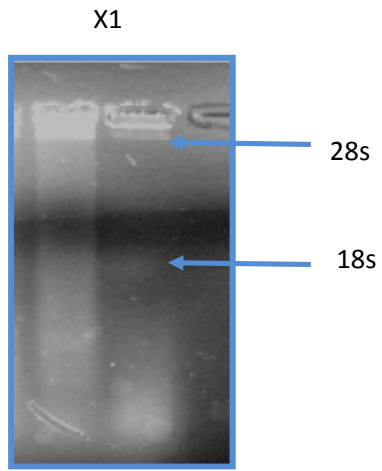


Fig. 16

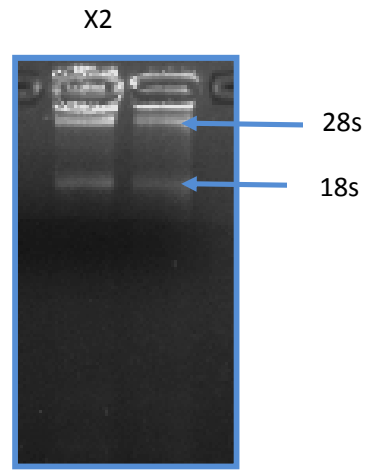


Fig. 17

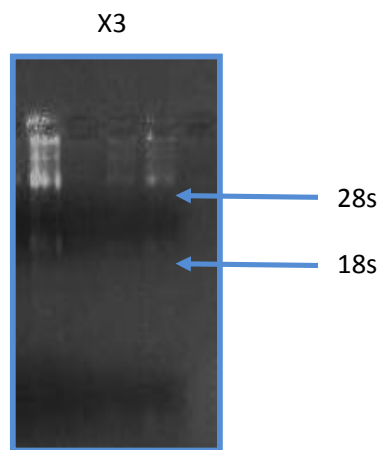


Fig. 18

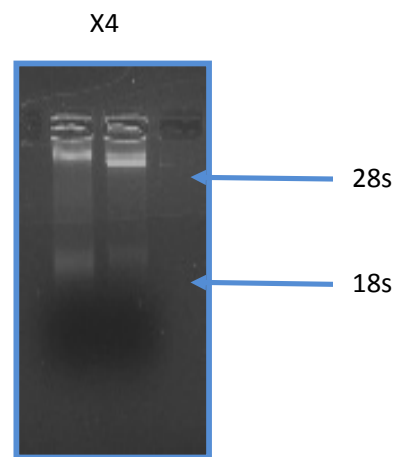


Fig. 19

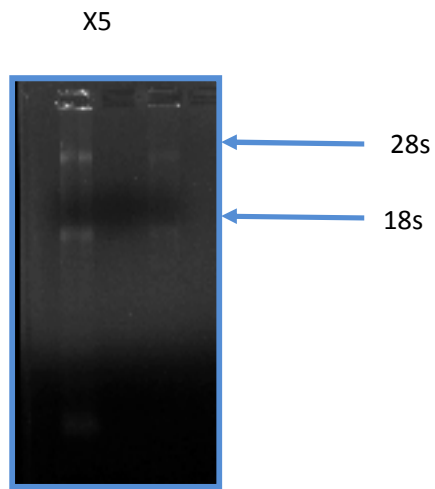


Fig. 20

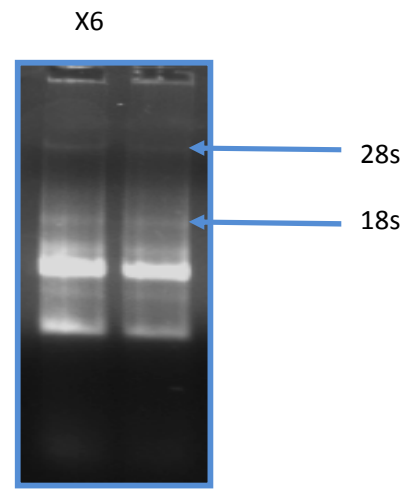


Fig. 21

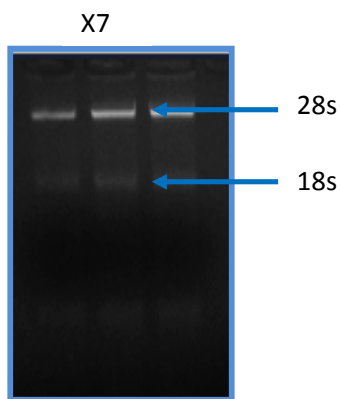


Fig. 22

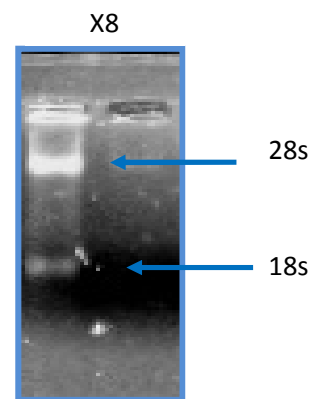


Fig. 23

FIG. 16-23. RNA TOTAL DERIVADO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE INDIVIDUOS VARONES CON RETRASO MENTAL. Se observa la integridad del RNA total (carriles X1-X8 corresponden a pacientes con retraso mental).

2.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN PACIENTES VARONES CON EL SXF.

Con la finalidad de determinar la presencia del RNAm en personas sanas y la ausencia del mensajero en individuos varones con SXF, se realizó RT-PCR como se describe en métodos 4.3. Al realizar RT-PCR no se encontró a ningún paciente con retraso mental que presentara el SXF, porque todos los pacientes varones presentaron el transcrito del gen *FMR1* de 146 pb; con el control positivo interno, el transcrito de *HPRT* de 387 pb, se corroboró que la amplificación se llevó al cabo correctamente.

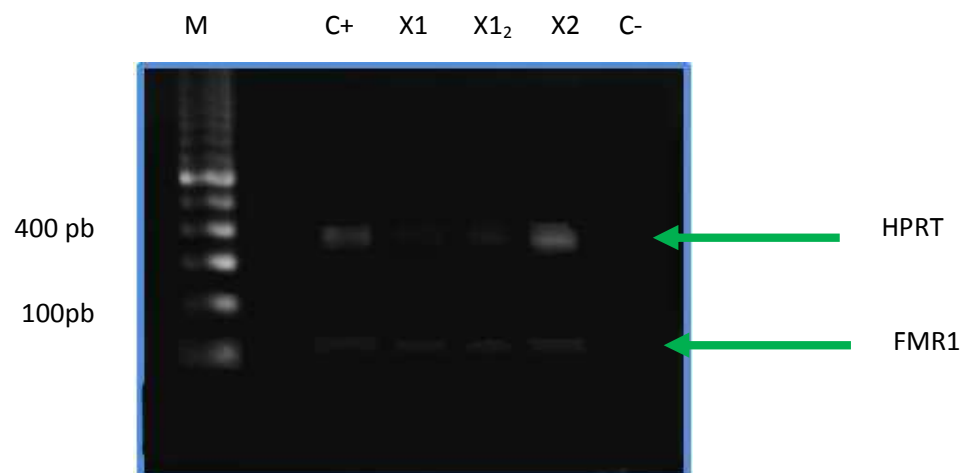


Fig. 24

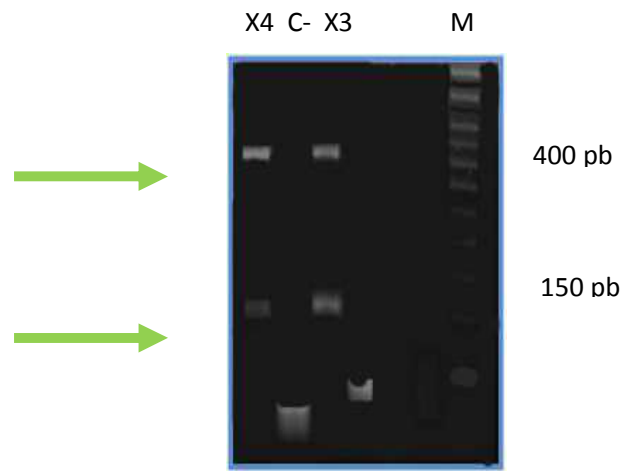


Fig. 25

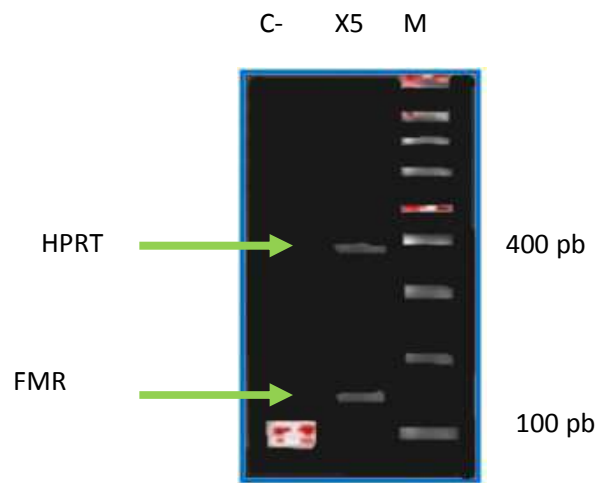


Fig. 26

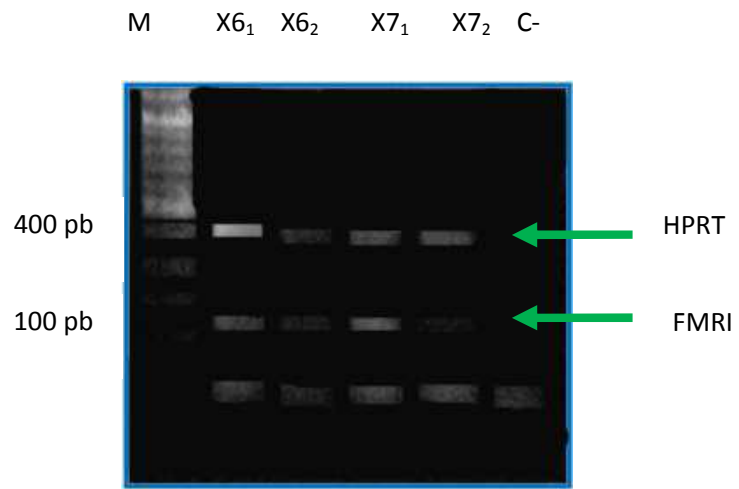


Fig. 27

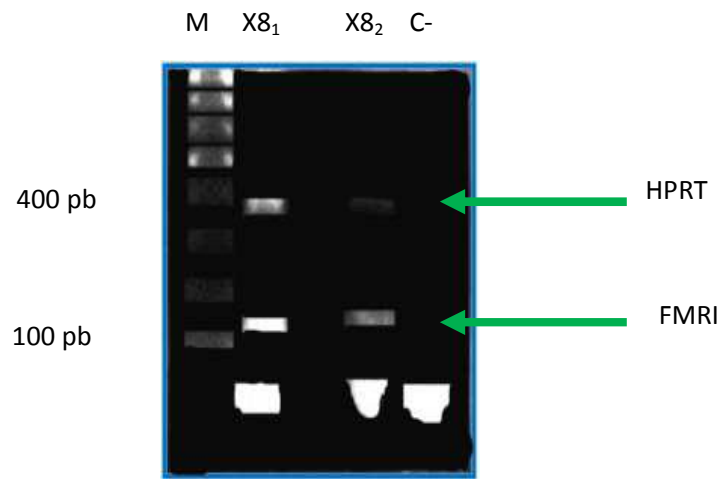


Fig.28

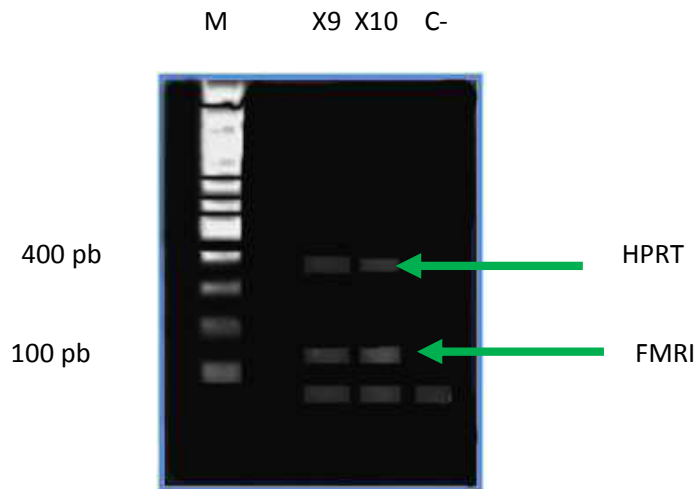


Fig. 29

FIGS. 24-29. TRANSCRITO DEL GEN *FMR1* EN INDIVIDUOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE RETRASO MENTAL. RT-PCR de *FMR1* con 146 pb y de *HPRT* como control interno con un peso molecular de 388 pb. (M) Marcador de peso molecular, (C+) persona sana varón, (X1-X10) pacientes y (C-) control negativo.

Los 10 pacientes presentaron el transcrito del gen *FMR1* como se muestra en las Figuras 24-29, lo cual indicó que ninguno de ellos presentaba el SXF, por lo que se procedió a buscar pacientes con diagnóstico del síndrome y con sus muestras se realizó la hibridación Southern.

3 PRUEBA DE LA SONDA CON PACIENTES X FRÁGIL MEDIANTE HIBRIDACIÓN SOUTHERN

Se hizo el estudio en pacientes que ya habían sido diagnosticados con el SXF. Se encontró una familia afectada, siendo la madre portadora de la premutación y un hijo varón afectado con retraso mental por X frágil, a los que se invitó a participar en el diagnóstico utilizando la hibridación Southern. Se extrajo el DNA de las muestras de los miembros de la familia mencionada y a una persona sin datos

clínicos de SXF. Se cuantificó el DNA y se obtuvieron rendimientos con promedio de 200 ng/μl y una pureza de 1.7 (Tabla 6).

La alícuota se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1% con TBE 1X, para observar la integridad la cual fue buena (Figura 30) por lo que pudo ser utilizada para la doble digestión.

Tabla 7 CUANTIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO PARA LA HIBRIDACIÓN SOUTHERN.

DNA	Cuantificación ng/μl	Pureza 260/280
S1 Mujer portadora	150.58	1.71
S2 Niño con X frágil	168.71	1.75
S3 Mujer sana.	436.43	1.9



FIG. 30. DNA GENÓMICO UTILIZADO EN LA HIBRIDACIÓN SOUTHERN. En todos los casos el DNA se observa íntegro. (S1) mujer portadora. (S2) niño con SXF. (S3) mujer sana.

Con la doble digestión se buscaron los sitios repetidos introduciendo la secuencia del gen en el que se encontró el sitio de corte para EcoR1 (5'GAATTC3') en la región 11114 y 16342 originando un fragmento de 5.2 Kb, dentro de este fragmento se buscó el sitio de restricción con la enzima sensible a la metilación

Eag1 (5'CGGCCG3'), que cortó en la posición 13371 formando dos fragmentos uno de 2.4 Kb y otro de 2.8 Kb (Figura 31).

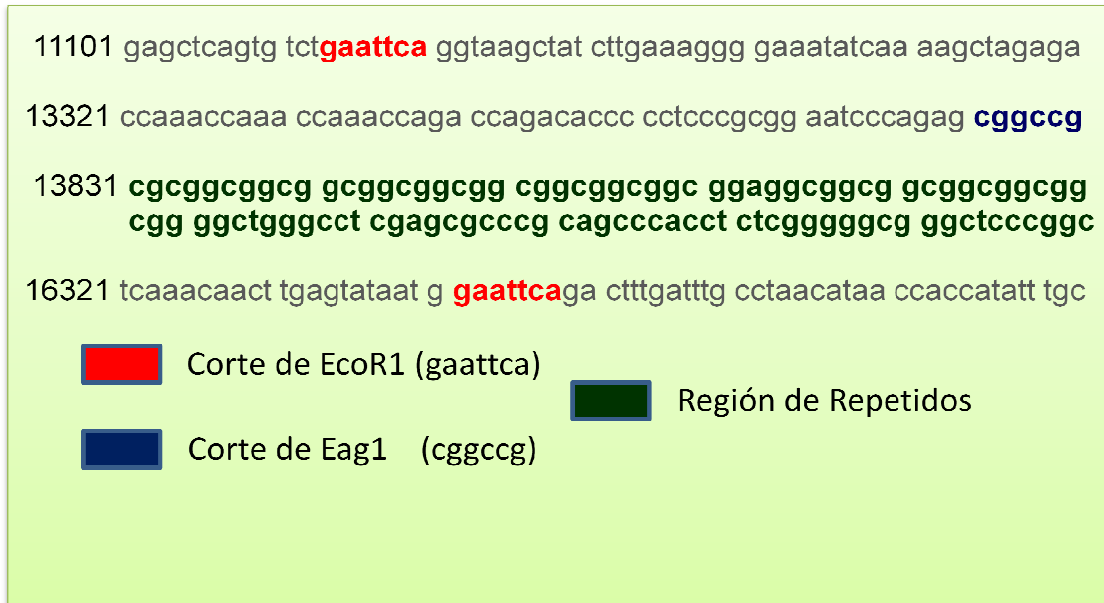


FIG. 31. SITIOS DE CORTE EN LA SECUENCIA DEL GEN *FMR1*. Se muestra la posición de los sitios de corte de EcoR1 en rojo y la de Eag1 en azul marino.

Se analizó primero al DNA de la mujer sana. Para esto se hizo la doble digestión con EcoR1 y Eag1 observando los resultados en un gel de agarosa 0.8% (Figura 32).

Se analizó el patrón de bandas de la placa de hibridación Southern, en la cual se encontraron dos bandas, la de menor peso era un fragmento de 2.8 Kb que corresponde al gen *FMR1* del cromosoma X activo de la mujer, lo cual se esperaba por que Eag1 corta al no estar metilado el promotor del gen *FMR1*.

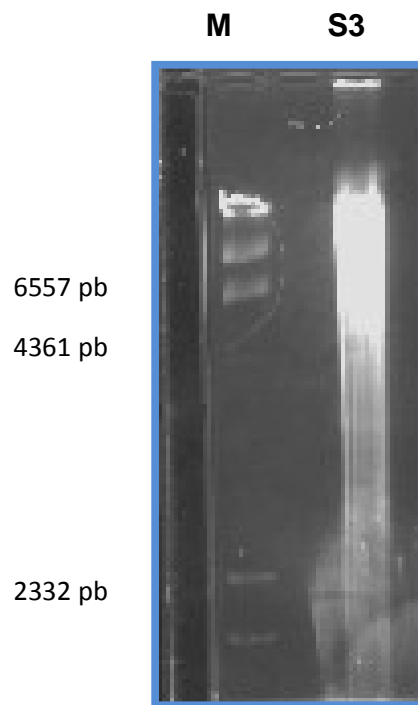


FIG. 32. PATRÓN DE DNA GENÓMICO HUMANO CON DOBLE DIGESTIÓN DE ENZIMAS Eag1 Y EcoR1. Restricción del DNA genómico humano, (S3) producto de la restricción utilizado 10 µg de DNA genómico de una mujer sana. (M) marcador de peso molecular, Lambda Hind III. Se indica el tamaño de las bandas en pares de bases.

La banda de mayor tamaño corresponde a un fragmento de 5.2 Kb que equivale al gen del cromosoma X inactivo ya que Eag1 no corta dentro de este fragmento que hizo EcoR1 por estar metilado lo cual indica que la persona está sana, (ver Figuras 6 y 33).

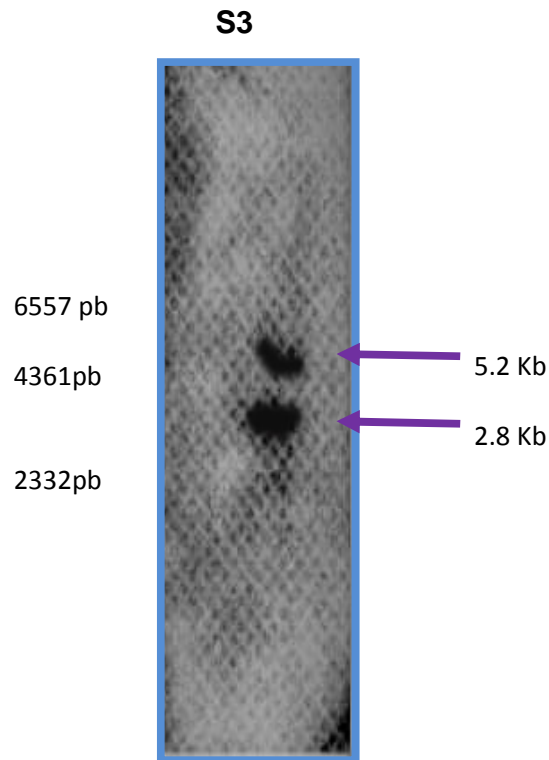


FIG. 33. PATRÓN DE BANDAS DE LA HIBRIDACIÓN SOUTHERN CON LA SONDA EN UNA MUJER SANA. Se observan dos bandas una de 5.2 y otra de 2.8 Kb (S3).

Una vez probada la sonda en la mujer sana, se procedió a realizarlo en el niño ya diagnosticado con el SXF y a la mamá, con sospecha de ser portadora de la mutación del SXF. Los resultados de la doble digestión de 10 µg de DNA genómico de estos dos individuos se muestran en la Figura 34.

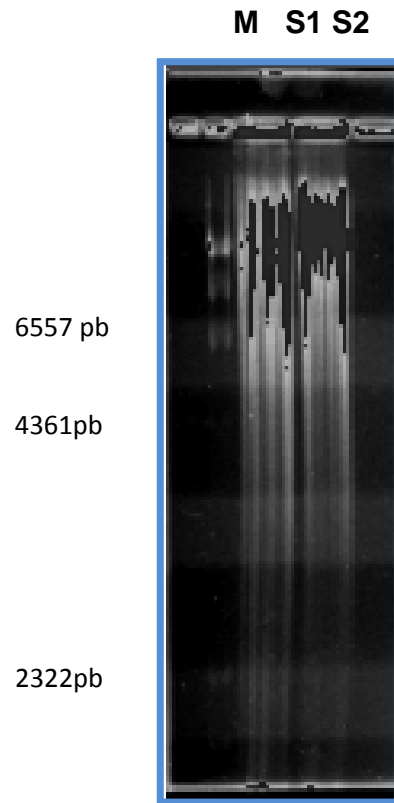


FIG. 34. DOBLE DIGESTIÓN DE ENZIMAS EcoR1 Y Eag1 DE DNA GENÓMICO HUMANO. DNA genómico de una mujer portadora (S1) y un niño (S2) que presenta el SXF. (M) Marcador de peso molecular, lambda HindIII. Se indica el tamaño de las bandas en pares de bases.

El DNA se hibridó con la sonda diseñada para corroborar su funcionalidad (Figura 35). El carril S1 muestra el patrón de bandas de la mujer portadora, con 4 bandas de 2.8, 3.7, 5.2, y 6.1 Kb. La presencia de la banda de 2.8 Kb indica que no está metilada esa región y por lo tanto se infiere que se transcribe y que hay un número de repetidos menor a 200 CGG; la banda de 3.7 Kb indica que es portadora de la mutación, pero también presenta otra banda por arriba de 5.2 Kb, lo que indica que el cromosoma X inactivo también presenta un incremento en el número de repetidos de CGG, por lo tanto transmitirá la mutación a todos sus hijos y pudieran ser afectadas sus hijas.

El carril S2 corresponde al niño afectado con el síndrome, (Figura 35), no existe la banda de 2.8 Kb, lo que indica que el número de repetidos está alterado, pero hay un barrido por arriba de 5.9 Kb, lo que indica que el gen de *FMR1* está metilado porque Eag1 no lo cortó, y por lo tanto no se transcribe el gen *FMR1* y no hay proteína. De esta forma se corroboró el diagnóstico previo por hibridación Southern, y se confirmó que la sonda molecular funcionó adecuadamente.

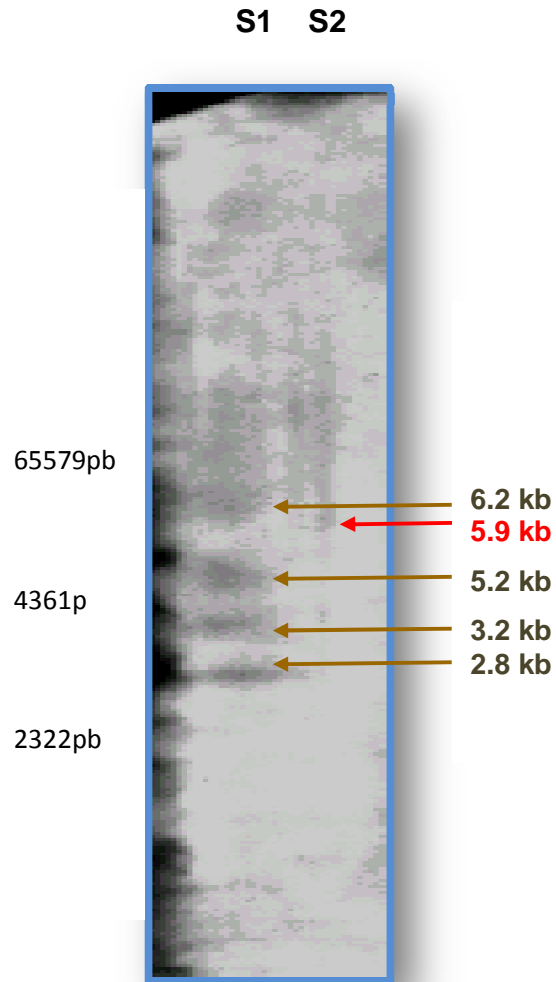


FIG. 35. HIBRIDACIÓN SOUTHERN CON DNA GENÓMICO HUMANO, UTILIZANDÓ LA SONDA. Las bandas de 2.8 y 5.2 Kb corresponde al alelo normal en el X activo e inactivo. Las bandas de 3.2 kb y de 6.2 indican un incremento en el número de repetidos en el caso de la mujer (S1), mientras el niño (S2) presenta la mutación completa. Las flechas doradas indican a bandas de S1 y la roja a las de S2.

DISCUSION

El SXF es la causa más común de retraso mental hereditario, ocasionada en su mayoría por la expansión de los trinucleótidos repetidos CGG en la región 5' sin traducir del exón 1 del gen *FMR1*, seguida de hipermetilación en las islas CpG del promotor, provocando así que no se transcriba el gen y de como resultado la ausencia de la proteína FMRP, que tiene varias funciones importantes en las conexiones neuronales. La correlación entre el número de repetidos CGG y el fenotipo del SXF, ha permitido de cierta manera el diagnóstico entre individuos afectados y portadores de la enfermedad.

Como las características y la frecuencia de signos clínicos son variables, el diagnóstico clínico de certeza no es posible, el diagnóstico citogenético es un método incompleto y poco confiable, que solamente permite detectar sitios frágiles en 55% de las mujeres portadoras y existe la posibilidad de diagnosticar falsos positivos (Mientjes y cols., 2005), el diagnóstico definitivo de personas sospechosas, requiere de la medición del tamaño de repetidos mediante pruebas moleculares, tal y como mencionan Díaz Gallardo y cols. (Acevedo y cols., 1996 y Hmadcha y cols., 1998). La hibridación Southern es la técnica más utilizada para el diagnóstico ya que permite visualizar en forma directa el tamaño de las secuencias repetidas, tanto en individuos con la premutación como con la mutación completa, así como el estatus de metilación en ambos sexos (Brouwer y cols., 2007, Perez, 1998 y Sambrook y Russell., 2001).

En México se desconoce la frecuencia del SXF, pero se cree que es similar a la de otras poblaciones europeas, sin embargo se ha reportado que esta enfermedad

esta subdiagnosticada ya que se expresa de una forma variable principalmente en mujeres. Dado que las pruebas de PCR solo sirven para diagnosticar a varones con la mutación, se hizo una sonda molecular para el gen *FMR1*, la cual podrá utilizarse en la hibridación Southern.

En la actualidad hay una gran variedad de sondas moleculares en todo el mundo para su diagnóstico, como la sonda StB12-3 que se aisló en la región CpG (Lantigua, 1997) que hibrida con el DNA y permite detectar de manera confiable y directa los estados de metilación sobre el DNA, lo que no es posible con otras técnicas. En México no se utiliza debido a que es difícil de conseguirla sonda molecular y la mayoría de los individuos con sospecha clínica de X frágil no tienen acceso al diagnóstico molecular o cuentan con uno en forma parcial, por lo que era necesario ampliar las herramientas para el diagnóstico molecular, lo cual implicaba una gran aportación para el diagnóstico del SXF en México. Aquí se presenta la detección del SXF con alta sensibilidad y especificidad mediante el análisis directo del DNA con la sonda molecular diseñada, que permite el diagnóstico de la enfermedad, así como su exclusión. Se elaboró la sonda con un tamaño de 1212 pb como se explica en métodos 1, a partir de la secuencia obtenida en *Gen Bank*, se identificó el sitio de corte para Pst1 (5'-CTGCAG-3') localizado en las posiciones 14456 y 15534. Se diseñaron los oligonucleótidos para esta región y se procedió a amplificar el segmento correspondiente a partir del DNA de un varón clínicamente sano. Debido a que sólo tiene un cromosoma X, nos aseguramos que la región que se amplificó correspondía a este cromosoma. Posteriormente se purificó el fragmento de 1212 pb con un rendimiento de 32 ng/ μ l, el cual fue bueno ya que al colocar 1 μ l de la muestra en el gel de agarosa se

observaba muy bien el fragmento (ver Figura 14) además, para el marcaje de la sonda molecular con P^{32} solo se necesitaron 25 ng. El producto purificado se sometió a restricción con la enzima Pst1, para reconocer si era el fragmento que se necesitaba, y se observó en el gel de agarosa al 1.5%, que Pst1 hizo un corte de restricción parcial en el purificado (ver Figura 15). En la restricción se distinguieron dos fragmentos, uno de 1212 pb que corresponde al fragmento sin restringir y otro de 1190 pb correspondiente al fragmento restringido. Con esto se corroboró que el fragmento purificado correspondía a la región de interés y por lo tanto era el adecuado para realizar el Southern.

En el presente trabajo la metodología utilizada para extraer DNA genómico a partir de sangre periférica de los individuos afectados y de una persona no afectada por el SXF, fue adecuada ya que en promedio se obtuvieron concentraciones de 20 μ g con una pureza de 1.7 a partir de de 4 mL o menos de sangre. Aunque fue difícil la toma de muestra del niño afectado con X frágil debido a su edad y al retraso mental, y a que la cantidad extraída de sangre fue muy poca, se pudo extraer el DNA íntegro y en cantidad suficiente con la metodología utilizada (ver Figura 30). La importancia de tener un buen rendimiento de DNA es que el Southern ocupa grandes cantidades de DNA, por que al hacer la transferencia del gel a la membrana se pierde un gran parte, ya que no se transfiere.

Una vez que analizamos el DNA procedimos a realizar el Southern que permite estudiar el tamaño de la expansión (CGGn) y el estado de metilación de la isla CpG adyacente al gen *FMR1*, lo que no permite la técnica de PCR, que se utiliza para determinar el número exacto de repeticiones CGG, siempre y cuando no

sean los alelos demasiado grandes porque se amplifican mal o no se amplifican por completo, lo que origina falsos negativos. La metilación de la isla CpG del promotor del gen *FMR1* no puede estudiarse por un PCR convencional y la técnica de Southern sí permite su estudio, aunque requiere de grandes cantidades de DNA (Handa y cols., 2005) por lo que la calidad y cantidad de DNA debe de ser buena (Ramos, 2001). A pesar de que varios investigadores optan por el PCR porque requiere poco DNA y poco tiempo, a diferencia del Southern que toma una semana y media, estas pruebas siempre deben de ir acompañadas por otras para obtener un buen diagnóstico y no dar falsos negativos (Pintado y Moron, 2001). Además, varios investigadores se han concentrado en mejorar las técnicas de amplificación del triplete CGG por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a realizar estudios por inmunohistoquímica en raíces de cabello (Rosales y Barros, 2003), sin embargo, hasta la actualidad no hay otro método tan preciso como la hibridación Southern. El Southern se realizó de acuerdo a la metodología descrita, se sometió a una doble digestión el DNA de tres individuos (Figuras 32 y 34): un varón afectado por el SXF (S2) y la madre de este (S1), y finalmente una mujer clínicamente sana sin antecedentes para X frágil o retraso mental (S3). La madre y el paciente con SXF fueron contactados, ya que el niño había sido diagnosticado con este padecimiento anteriormente, se supuso que la madre era la portadora de la premutación por no estar afectada con retraso mental, y al hacer la prueba con la sonda molecular diseñada fue posible corroborar ese diagnóstico.

Si bien el método directo de hibridación con sondas genómicas a partir de Southern es el más usado, también presenta dificultades técnicas que lo hacen muy largo y laborioso, y sus dificultades de interpretación son muchas. Entre las

primeras dificultades se encuentran, las fallas de digestión y la ausencia de visibilidad de las bandas en la placa (Ramos y cols., 2006). Primero se realizó la prueba en una mujer clínicamente sana S3, para probar si la sonda molecular funcionaba y además poderla utilizar como control, debido a que la muestra de DNA de sangre periférica de los pacientes alcanzaba para una sola prueba y había que cuidar la muestra.

En la hibridación Southern (Figura 33) se presenta el patrón de bandas que corresponde a una mujer sana (S3), en el que observamos 2 bandas, una de 5.2 Kb y otra de 2.8 Kb, lo cual se debe a que la mujer tiene dos cromosomas X, uno activo (2.8 kb) y otro inactivo de (5.2 kb), mientras que en un hombre veríamos un solo cromosoma, el cual siempre está activo (2.8 kb). El patrón de bandas indicó que no está metilado un alelo del gen porque *EagI* lo cortó y que en efecto corresponde a una mujer sin el SXF, este primer ensayo nos mostró que la sonda elaborada funcionaba correctamente (Brouwer y cols., 2007 y Ramos, 2001). Una vez analizado el patrón de bandas de la primera mujer sana, se procedió a realizar la prueba con el niño afectado (S2) y la mamá del niño (S1 de la Figura 35). El análisis de la placa de los dos pacientes demostramos que el niño tiene el gen *FMR1* totalmente metilado en la isla CpG, porque la enzima *EagI* no cortó y sabemos que esta enzima es sensible a la metilación, observando un barrido a partir de 5.9 Kb. El no observar la banda de 2.8 Kb (Figura 35), indicó el aumento en el número de repetidos por arriba de 200, de hecho un barrido corresponde a fragmentos de diversos tamaños, en los que no podemos determinar el número exacto de repetidos en cada uno de ellos, pero sí se demostró que corresponden a

fragmentos con la mutación completa. La metilación del gen *FMR1* explica el fenotipo X frágil en el niño.

En la madre del paciente con SXF, de la que se sospechaba que era portadora de la premutación, se obtuvieron 4 bandas (ver carril S1 de la Figura 35), lo que no se observó en el control mujer sana (S3) Figura 33 con dos bandas, una de 2.8 y otra de 5.2 Kb, lo cual fue el primer indicio para afirmar que la mujer S1 es portadora de la mutación. La banda de 2.8 Kb corresponde al alelo normal del cromosoma X activo por lo que el gen se transcribe, la banda de 5.8 Kb corresponde al alelo normal del cromosoma X inactivo que está metilado, sin embargo arriba de las dos bandas aparecen otras bandas de 3.2 y 6.2 Kb que indican mayor número de repetidos CGG en el gen *FMR1* asociados a la mutación. Con esta evidencia podemos decir que la madre del niño con el SXF, es portadora de la mutación y por esta razón la transmitió a su hijo.

La razón por la cual es importante determinar la premutación es que los varones con premutación se consideran transmisores, tienen un CI normal y transmiten la premutación a sus hijas. Entre ellas la probabilidad de que aparezcan síntomas del síndrome es del 50% y estos son menores y se les considera portadores, ya que los hijos de estas portadoras pueden adquirir la mutación completa con una probabilidad del 80% como es el caso que presentamos de la mujer S1, así que es importante como indicador de salud pública determinar la proporción de premutados y medir la posible incidencia del síndrome en futuras generaciones.

El tamaño exacto de los repetidos no se obtuvo debido al tamaño del gel (12X14 cm), que no permite medir el número de repetidos con precisión, por lo que se seguirá trabajando hasta estandarizar las condiciones óptimas para obtener en forma precisa y acertada este dato.

Al analizar las placas de las Figuras 33 y 35, nos dimos cuenta que la sonda funcionó perfectamente, aunque falta estandarizar algunos pequeños detalles,. Entre ellos se encuentra que las bandas no salgan tan difusas, por lo que se sugiere modificar los tiempos de lavados que permita obtener una placa que no salga tan oscura, y hacer la electroforesis en geles de mayor tamaño, que permitan la medición de los números de repetidos.

En la búsqueda de pacientes con SXF se estudió un total de 10 pacientes del sexo masculino, a los cuales se les realizó el diagnóstico mediante RT-PCR con el cual se obtiene RNA total de posibles afectados (ver Figuras 16-23). La metodología utilizada en el presente trabajo para extraer RNA total de individuos varones con retraso mental, fue adecuada ya que en promedio se obtuvieron concentraciones de 500-1000 ng/ μ l por cada 2 mL de sangre (Tabla 6). El RNA obtenido no mostró degradación y se pudo utilizar para sintetizar la primera cadena de cDNA. Este método tiene la ventaja de ser más barato, en comparación con otros métodos de extracción de RNA, como los métodos de extracción por Kits comerciales.

Posteriormente se utilizó la técnica de PCR a partir del cDNA (Figuras 24-29), para amplificar una región del transcrito del gen *FMR1* y dar un diagnóstico preciso en varones afectados, pero no en portadores; éste es un método muy rápido y

eficiente si se compara con otras metodologías como la PCR, que es difícil de amplificar por contener una región rica en secuencias CG en donde ocurre la mutación, formando estructuras secundarias, y nos permite excluir el diagnóstico de X frágil y no someterlos a otras pruebas (Perez, 1998 y Tarleton, 2000).

El RT-PCR mostró varias ventajas en comparación con otros protocolos. Por ejemplo, trabajamos con cDNA de muestras frescas de leucocitos. Puede usarse en laboratorios donde hagan diagnósticos moleculares, evaluando la expresión de *FMR1* en pacientes varones que se cree que son clínicamente positivos con el SXF (Felix y cols., 2006) por lo cual en el laboratorio utilizamos este método como diagnóstico clínico rutinario para los que presentan el fenotipo X frágil.

Al realizar la prueba molecular RT-PCR no se encontró a ninguna persona con el SXF porque tienen el transcrito del gen *FMR1* de 146 pb el cual se contrastó con el control positivo interno del transcrito del gen *HPRT* de 387 pb que corrobora que la amplificación del molde de cDNA se llevó a cabo correctamente. Esto demostró que el fenotipo no se debía a alteraciones en este gen y que al menos en esta población hay que ampliar los criterios clínicos para el diagnóstico. A las familias de estos pacientes se les informó que no presentan el SXF y por lo tanto no tienen riesgo de las enfermedades asociadas a este gen.

Perez Herrera, en 1999, realizó el diagnóstico por RT-PCR a 18 pacientes de sexo masculino, el resultado del análisis mostró que únicamente uno de los individuos fue positivo al diagnóstico, mientras los otros presentaron el transcrito del gen *FMR1* (Perez, 1998). Aunque en ese estudio la muestra poblacional es baja, la incidencia del SXF fue de 5% (1/18), en este estudio la muestra de 10 pacientes

es muy pequeña, y si comparamos la frecuencia del 5%, se requeriría una muestra más grande (al menos de 20 pacientes) para tener probabilidades de encontrar un paciente positivo. Si tomamos la incidencia en la población general de afectados por retraso mental por X frágil que es de 1/100, necesitaríamos una muestra de 100 para encontrar un paciente con el síndrome.

También debemos de tomar en cuenta que en México no se conoce la frecuencia real del SXF; aunque se cree que es similar a otras poblaciones y que está subdiagnosticado, puede existir la posibilidad de que su frecuencia sea menor comparada con otras poblaciones o que los datos fenotípicos puedan tener variaciones en los pacientes de origen mexicano.

Otra de las causas de no haber detectado pacientes, se podría deber a que se incluyó en el estudio a individuos con retraso mental sin un tamizaje previo para otras etiologías de retraso mental, por lo que hay que establecer criterios más estrictos que elevarían la posibilidad de encontrar más pacientes positivos. Uno de estos criterios podría ser el de buscar antecedentes familiares de alteraciones neuro-psiquiátricas o de falla ovárica prematura en mujeres, ya que para que se presente la mutación en un individuo es necesario que exista la premutación en la madre.

CONCLUSIONES

1. Se corroboró la funcionalidad de la sonda molecular diseñada por lo que se podrá realizar el diagnóstico molecular a familias completas que tengan el riesgo de presentar el SXF y patología asociada a la premutación del gen, tanto en varones como en mujeres, y determinar la frecuencia del síndrome en nuestra población.
2. Es necesario realizar primero la prueba de RT-PCR como diagnóstico de rutina en varones con retraso mental a fin de evitar hacer la prueba Southern a todos los pacientes que lleguen a cualquier unidad.
3. Se seguirá estandarizando la prueba para obtener el número de repetidos lo más preciso, ya que en esta primera prueba no se logró por el tamaño del gel, pero la sonda molecular cumplió el objetivo de servir como una prueba de diagnóstico en un futuro.
4. Se diagnosticó la mutación presente en la madre del individuo afectado, lo cual permitió informar adecuadamente sobre el riesgo que tiene en el caso de riesgo reproductivo para X frágil. Esto permitirá tomar las medidas preventivas adecuadas como planear su vida reproductiva. Además se le informó del riesgo que tiene para enfermedades asociadas a la premutación del gen *FMR1*.

BIBLIOGRAFIA

1. Acevedo L, Ferreira C, Gayola M. 1996. Diagnóstico molecular Síndrome X Frágil en un grupo control y miembros de 3 familias afectadas. *Rev. Cubana. Pediatr.* 68(1): 21-25.
2. Arenas A, Peñalosa R, Salamanca G. 1999. Patología médica ocasionada por repetidos de trinucleótidos. *Gac. méd. Méx.* 135: 53-65.
3. Baynes J, Dominiczak M. 2005. Bioquímica médica. 2ª ed. España, *Elsevier Mosby.* 436 p.
4. Bronwen M, Pirkko S. 2000. Southern blotting as a Diagnostic Method. *Molecular Biomethods Handbook.* 2ª ed., Totowa N.J., J.M. *Walker and R. Raplay.* 55-64 p.
5. Brouwer J, Mientjes E, Bakker C, Nieuwenhuizen I, Severijnen L, Van H, Nelsón, Oostra b, Willwmsen R. 2007. Elevated Fmr1 levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragil X full mutation. *Exp. Cell Res.* 313(2):244-253.
6. Cabrera L, Herráez M. 2001. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. España, *Elsevier.* 114p.
7. Curfs L, Wieggers A, Fryns J. 1991. Intelligence and the FRAXA syndrome: a review. *Genetic Couns.* 2:55-62.
8. Davidow L, Barbe. Grio D, Cao J, McCormick I. 1994. An improved fragile X Southern blot probe without the CGG eliminates backgrounds bans. *Mol. Cell. Probes.* 8:241-244.

9. Díaz G, Barros N, Díaz C, Hernández A, Gomez E, Leal C, Fragoso R, Figuera I, García C, Ramirez D, Cantú J. 1995. Molecular Characterization on the fragile- Syndrome in the Mexican Population. *Arch. Med. Res.* 27(4):587-588.
10. Assembly and Genebuild. *Ensembl*. Mayo 2009. < <http://www.ensembl.org>>.
11. Esteiner C, Mantovani M, Marques de Faria A, Lopes I. 2005. Laboratorial Diagnosis of fragile X síndrome. *Arq Neuropsiquiatr.* 63(3):564-570.
12. Felix L. 2007. Estudio Molecular de los Alelos Fundadores del Gen *FMR1* en Poblaciones Indígenas y Mestiza Mexicana. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina, UNAM.
13. Felix L, Arguello G, Cerda F, Peñaloza E, Buentello M, Estrada M, Ramos K, Salamanca G, Arenas A. 2006. FMR1 CGG Repeat Distribution and Linked Microsatellite-SNP Haplotypes in Normal Mexican Mestizo and Indigenus. *Human Biology.* 78(5):579-598.
14. Garber K, Smith K, Reines D, Warren T. 2006. Transcription, translation and fragile X syndrome. *Current Opinion in Genetics y Development, Science direct.* 16(3): 270-275.
15. Glover L, Guillen N. 2006. Síndrome X Frágil. *Revista de Neurología.* 42:51-54.
16. Hagerman R, Hagerman P. 2001. El síndrome de x fragil: un modelo de la relación gen-cerebro-conducta. *Neurología.* 33(1): 51-57.
17. Handa V, Goldwater D, Stiles D, Cam M, Poy G, Kumari D, Usdin K. 2005. Long CGG-repeat tracts are toxic to human cells: implications for carriers of Fragile X premutation alleles. *FEBS Letters.* 579:2702-2708.

18. Hmadcha A, De Diego y Pintado E. 1998. Assessment of *FMR1* expresión by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of KH domains. *J. Lab. Clin. Med.*, 131(2):170-173.
19. Homo sapiens fragile X mental retardation 1 (FMR1) on chromosome X. *NCBI*. Febrero 2002. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>>.
20. Lantigua A. 1997. Síndrome frágil X: Mutaciones dinámicas y su repercusión en otras enfermedades genéticas. *Revista cubana pediátrica*. 69(1):37-47.
21. Marquis G, Geoffrey G, Nenad J, Slobodan M, McMurray C. 1995. Trinucleotide Repeats That Expand in Human Disease Form Hairpin Structures in Vitro. *Cell*. 81(4):533-540.
22. Medicina molecular: nueva perspectiva en medicina. *VITAE Academia biomédica digital*. Enero 2000. <<http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeDos/homevitae.htm>>
23. Mientjes E, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-westerveld M, Severijnen L, Rife M, Willemsem R, Nelson D, Oostra B. 2005. The generation of conditional FMR1 knock out mouse model to study FMRP function in vivo. *Neurobiology of Disease*. 21: 549-555.
24. Mila M, Mallolas, J. 2001. Síndrome del cromosoma X frágil menopausia precoz. Diagnostico preimplantacional y preconcepcional. *Neurología*. 33(1): 20-23.
25. Khaniani M, Kalitsis P, Burgess T, Slater H. 2008. An improved Diagnostico PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (FMRI). *Mol. Cytog.* 1:1-6.

26. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A. 1991. Instability of 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 252(5009):1097-102.
27. Pastore M, Karns L, Pinkerton V, Silverman M, Williams C, Camp T. 2006. Acceptance of fragile X premutation genetic screening in women with ovarian dysfunction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194(3):738-743.
28. Pérez H. 1998. Estudio molecular del síndrome del X Frágil en población Mexicana. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
29. Pintado E, Morón F. 2001. Metilación y expresión del gen *FMR1*. *Neurología*. 33: 57-62.
30. Poon P, Chen Q, Zhong N, Lam S, Lai K, Wong C, Pang C. 2006. AGG interspersed analysis of the *FMR1* CGG repeats in mental retardation of unspecified cause. *Clinical Biochemistry*. 39(3):244-248.
31. Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel T, Bardoni B, Pastore A. 2006. The Structure of the N-Terminal Domain of the Fragile X Mental Retardation Protein: A Platform for Protein-Protein Interaction. *Estructure*. 14: 21-31.
32. Raymond F. 2006. X linked mental retardation: a clinical guide. *Am. J. Med. Genet.* 43:193-200.
33. Ramos, F. 2001. Nuevos métodos de diagnóstico del síndrome X frágil: estudio de la *FMRP* en sangre y pelo. *Rev. Neurológica*, 33: 9-13.
34. Rosales R, Barros N. 2003. Utilidad de las técnicas de biología molecular en el Diagnóstico del síndrome X-frágil. *Gac. méd. Méx.* 139:413-414.

35. Rosales R, Mendoza C, Troyo S, Medina C, Barros Ñ. 2005. Genetic Diversity at the FMR1 Locus in Mexican Population. *Arch. Med. Res.* 36(4):412-417.
36. Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 3^a ed. Dallas Texas, CSHI pres.
37. Sinden R. 1999. Trinucleotide Repeats Biological Implications of the DNA Structure Associated with Disease-Causing Triplet Repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 64:346-353
38. Tarleton J. 2000. Detection of FMR1 Trinucleotide Repeat Expansion Mutations Using Southern Blot and PCR Methodologies. *Methods Mol. Biol.* 217:29-39.
39. Tejada, M. I. 2001. La prevención del síndrome X frágil mediante el diagnóstico prenatal genético: ventajas y aspectos controvertidos. *Neurology.* 33(1) 14-19.
40. Turner G. 1997. The prevalence of the Fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 23:11-67.
41. Van E. H. 2006. The fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Eur J Med Genet.* 49: 1-8.
42. Vega M, Ramos I, Márquez A, González J, Martínez R, Bonilla V. 2004. X frágil en una niña: características clínicas y del genotipo. *Vox pediátrica.* 12:26-30.
43. Verkerk A, Pieretti M, Sutcliff J, Fu Y, Kuhl D, Pizutti A. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint

cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 65:905-914.

44. Willemsen R, Anar B, Otero Y, Vries B, Hilhorts-Hofstee I, Smits A, Looveren E, Willems P, Galjaard H, Oostra B. 1999. Noninvasive Test for Fragile X Syndrome, Using Hair Root Analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 65:98-103.
45. Willemsen R, Bontekoe C, Tamanini F, Galjaard H, Hoogeveen A, Oostra B. 1996. Association of FMRP with Ribosomal Precursor Particles in the Nucleolus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:27-33.
46. Wittenberger M, Hagerman R, Sherman S, McConkin-Rosell A, Welt C, Rebar R, Corrigan E, Simpson J, Nelson L. 2007. The *FMR1* premutation and reproduction. *Fertility and Sterility*, 87(3): 456-465.
47. Zabalza R. 2007. Síndrome de temblor y ataxia asociado a premutación X-frágil. *Neurología*. 22(4):251-252.
48. Zalfa F, Achsel T, Bagni C. 2006. mRNPs, polysomes or granules: *FMRP* in neural protein synthesis. *Neurobiology*. 16:265-269

ABREVIATURAS

AGG: Adenina-Guanina-Guanina

cDNA: DNA complementario

CGG: Citosina-Guanina-Guanina

CpG: Citosina y Guanina unidas por un fosfato

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FMR1: Gen 1 de retraso mental X Frágil (*Fragile X Mental Retardation-1*)

FMRP: Proteína de retraso mental X Frágil (*Fragile X Mental Retardation Protein*)

FOPXF: Falla Ovárica Prematura asociada a X Frágil

FSH: Hormona Estimulante del Foículo (*Follicular Stimulating Hormona*)

CI: coeficiente intelectual

Kb: kilobases

min: Minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mRNAs: Mensajeros de ácidos ribonucleicos

ng: Nanogramos

mM: Milimolar

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAm: Ácido Ribonucleico mensajero

RT-PCR: Reverso transcriptasa

seg.: segundo

SNC: Sistema Nervioso Central

STAXF: Síndrome de Tremor Ataxia asociado a X Frágil

SXF: SXF

U: Unidad

μl: Microlitros