



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL  
SÍNDROME X FRÁGIL

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A

ALDARIZ AMAYA JUAN RODRIGO



**DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**

**MÉXICO, ESTADO DE MÉXICO**

**SEPTIEMBRE, 2012**





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.

J. Rodrigo Aldariz A.  
UNAM - FES IZTACALA - IMSS

“Non vox, sed votum;  
Non tinnula cordula, sed cor;  
Non clamor, sed amor  
Psallit in aure Dei.

Dirige cor sursum;  
Tene, profer,  
Respice sensum;  
In quo choro  
Ne sis corpore,  
Mente foro”.

### **Con mi más profundo agradecimiento a...**

Mi madre, simplemente por serlo; sin ella hubiese sido muy difícil alcanzar este sueño. A ella le debo la vida y he sido afortunado al tenerla a lo largo de mi vida.

La Universidad, por permitirme ser mi *alma máter*, de los cual me siento muy orgulloso.

Mi tutor, Dr. Diego Julio Arenas Aranda, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, así como por su paciencia y tolerancia.

Dra. Martha Ruíz Tachiquín, por brindarme su amistad.

Mis amigos de la carrera, por hacer de mi estancia en la Facultad, uno de los momentos más vivos en mi vida... ustedes saben quiénes son.

Mis amigos del laboratorio, por su amistad y los buenos momentos que encontré en ustedes.

A Sarai, por estar conmigo a pesar de ser como soy.

Y a la vida, por permitirme seguir recorriendo mi camino, por aquellas nuevas cosas que aún me faltan por descubrir; y sobre todo, por concederme la dicha de hacer lo que me apasiona y estar con quienes amo.

J. Rodrigo Aldariz A.  
UNAM - FES IZTACALA - IMSS



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS</b> .....	3
<b>3. SÍNDROME X FRÁGIL</b> .....	6
<b>4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b> .....	7
4.1. Varones.....	7
4.2. Mujeres.....	8
<b>5. HERENCIA</b> .....	8
5.1. Patrón de herencia.....	8
5.2. Transición de premutación a mutación completa.....	10
5.3. Mutaciones fundadoras .....	11
<b>6. GEN <i>FMR1</i></b> .....	12
6.1. Tamaño de alelos.....	13
6.1.1. Alelos normales .....	13
6.1.2. Zona gris.....	14
6.1.3. Alelos premutados .....	14
6.1.4. Alelos mutados.....	17
6.2. Inestabilidad de triplete repetidos .....	17
6.3. Mutaciones.....	19
6.3.1. Expansión de repetidos CGG.....	19
6.3.2. Deleción de repetidos CGG.....	19
6.3.3. Deleción de una porción de los repetidos CGG y algunas secuencias flanqueantes .....	20
6.3.4. Deleción de todos los repetidos CGG y algunas secuencias de flanqueantes...	21
6.3.5. Mutaciones puntuales y de dos nucleótidos .....	21

6.4. Epigenética de <i>FMR1</i> .....	22
<b>7. PROTEÍNA FMRP</b> .....	23
7.1. Localización .....	23
7.2. Isoformas.....	24
7.3. Dominios estructurales de FMRP .....	25
7.4. Transporte y traducción de RNAm .....	26
7.5. Proteínas con función similar a FMRP .....	26
7.6. Teoría de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) .....	27
<b>8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS</b> .....	29
8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
8.2. Southern blot.....	30
8.2.1. Radiactivo.....	30
8.2.2. No radiactivo .....	31
8.3. Análisis de secuencia .....	32
8.4. Análisis de hibridación fluorescente in situ (FISH) .....	32
8.5. Análisis citogenético .....	32
8.6. Análisis de raíz de cabello .....	32
<b>9. JUSTIFICACIÓN</b> .....	33
<b>10. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>11. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	35
<b>12. RESULTADOS</b> .....	54
<b>13. DISCUSIÓN</b> .....	69
<b>14. CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>15. REFERENCIAS</b> .....	77

## RESUMEN

El Síndrome X Frágil (SXF) es considerado como la primera causa de retraso mental hereditario. En la mayoría de los casos, es provocado por la ausencia de la proteína FMRP, resultado del silenciamiento transcripcional debido a la expansión anormal del triplete repetido CGG del gen *FMR1*. Actualmente, las técnicas empleadas en el campo de la biología molecular permiten un diagnóstico preciso del síndrome, en comparación con aquellas empleadas durante la fase previa al descubrimiento de las bases moleculares del SXF, tales como la observación fenotípica y el análisis citogenético; en cambio, las técnicas de análisis molecular permiten la detección de los transcritos de *FMR1* mediante la técnica de RT-PCR y la cuantificación aproximada del número de repetidos CGG, así como el estado de metilación de la región promotora por medio de la técnica de hibridación Southern. En este estudio, se reporta el diagnóstico de 21 pacientes varones con retraso mental idiopático mediante la técnica de RT-PCR y el de una mujer con sospecha de X frágil con la técnica de hibridación Southern no radiactivo. Ninguno de los pacientes varones resultó positivo al síndrome, ya que en todos los casos se detectó la presencia del transcrito de *FMR1*. Para asegurar la identidad de los productos obtenidos, se secuenció el cDNA de un individuo con sospecha de X frágil, el cual correspondió a los diferentes transcritos de *FMR1* de la base de datos del NCBI. En el caso del paciente femenino, se realizaron ensayos de hibridación para determinar únicamente el número de repetidos CGG. Estos se llevaron a cabo mediante el uso de una sonda marcada con digoxigenina (a diferencia de los ensayos comúnmente realizados mediante marcajes radiactivos) con el fin de evitar los riesgos y complicaciones que conlleva el uso de radioisótopos. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron definir las bandas esperadas, por lo que se recomienda seguir implementando la técnica con marcaje radiactivo o bien, desarrollar mejoras en el sistema no radiactivo que ayuden a obtener un resultado adecuado.

---

**Palabras clave:** Síndrome X Frágil, *FMR1*, triplete CGG, metilación, RT-PCR, Southern blot, digoxigenina.

## 1. INTRODUCCIÓN

El tipo de mutaciones que suelen aparecer en el genoma de una especie son tan variadas y particulares que pueden ser organizadas bajo determinados criterios de clasificación. Uno de ellos, permite agruparlas en función de la estabilidad por la cual son transmitidas, a este tipo de mutaciones se les ha denominado con el nombre de *mutaciones estáticas* y *mutaciones dinámicas*. Las primeras se caracterizan porque todos los miembros afectados comparten una mutación idéntica, en la cual, la tasa de mutación es la misma tanto para la secuencia originada como para la secuencia predecesora; es decir, se transmiten de manera estable. En cambio, las mutaciones dinámicas son transmitidas de manera inestable y resultan en secuencias disímiles o segmentos de diferentes longitudes con respecto a la secuencia de DNA que le antecede. Los cambios generados a partir de estos procesos de mutagénesis son conocidos como expansiones y deleciones. Las mutaciones dinámicas se caracterizan principalmente por la inestabilidad de tripletes de nucleótidos repetidos, localizados dentro del gen afectado, los cuales, favorecen la formación de estructuras secundarias que no corresponden al tipo estructural de DNA-B (*non-B DNA*). Estas secuencias pueden adoptar estructuras de tipo cruciformes cuando la secuencia es formada por un espejo de repetidos, *hairpin loops* cuando se asocia a una secuencia palíndroma de repetidos, DNA triplex y tetraplex mediados por enlaces de tipo Hoogsteen, así como DNA-Z. La mutagénesis en este tipo de secuencias es debido a la conformación de estas estructuras secundarias, más que a la secuencia del DNA por sí misma (Wells, 2007).

Actualmente, se han relacionado al menos 20 enfermedades neurodegenerativas a la expansión de tripletes repetidos, algunas de las cuales, abarcan enfermedades de aparición temprana como el Síndrome X Frágil (también conocido como FRAXA), y trastornos de aparición tardía como la enfermedad de Huntington, síndrome de Kennedy y diferentes tipos de ataxias y distrofias musculares (ver Cuadro 1). Cabe aclarar que los genes involucrados en estos padecimientos se caracterizan por ser altamente polimórficos en la región de los repetidos debido a las variaciones en el número de tripletes. Ciertamente

número de repetidos pueden ser transmitidos de manera estable y no representan riesgo de provocar algún padecimiento, por lo que reciben el nombre de alelos normales. Por encima de estos valores, pueden presentar el riesgo de ser transmitidos de manera inestable en generaciones posteriores sin llegar a causar el padecimiento. Este estado alélico denominado premutación, se caracteriza por un aumento o disminución del número de copias de los tripletes. Repetidos más allá de estos valores, están asociados a los diferentes síndromes y reciben el nombre de mutación completa (Wells, 2009).

**Cuadro 1.** Enfermedades hereditarias asociadas a inestabilidad de tripletes repetidos (Gene link, 2004).

Enfermedad	Triplete repetido	Normal	Premutación	Mutación completa
Frágil XA (FRAXA)	(CGG)n	6-52	59-230	230-2,000
Frágil XE (FRAXE)	(CCG)n	4-39	? (31-61)	200-900
Frágil XF (FRAXF)	(CGG)n	7-40	?	306-1,008
FRA16A	(CCG)n	16-49	?	1,000-1,900
Síndrome de Jacobsen (FRA11B)	(CGC)n	11	80	100-1,000
Síndrome de Kennedy	(CAG)n	14-32	?	40-55
Distrofia Muscular	(CTG)n	5-37	50-80	80-1,000; congénito, 2,000-3,000
Enfermedad de Huntington	(CAG)n	10-34	36-39	40-121
Ataxia Espinocerebelosa 1	(CAG)n	6-39	No reportado	40-81
Ataxia Espinocerebelosa 2	(CAG)n	14-31	No reportado	34-59
Ataxia Espinocerebelosa 3/ Enfermedad de Machado	(CAG)n	13-44	No reportado	60-84
Ataxia Espinocerebelosa 6	(CAG)n	4-18	No reportado	21-28
Ataxia Espinocerebelosa 7	(CAG)n	7-17	28-35	38-130
Síndrome de Haw River	(CAG)n	7-25	?	49-75
Ataxia Friedreich	(GAA)n	6-29	? (>34-40)	200-900

La característica principal de las mutaciones dinámicas es la variabilidad de la expresión: cuanto mayor sea la expansión, el trastorno asociado será más temprano y severo. A este suceso en particular se le conoce con el nombre de anticipación y es propio de enfermedades asociadas a expansión de tripletes repetidos (Wells, 2009).

## **2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

La primera familia en ser descrita con Síndrome de X Frágil se remonta al año de 1943 (ver Figura 1), cuando J. Purdon Martin y Julia Bell estudiaron una familia con 11 varones afectados con retraso mental, lo cual sugirió una herencia ligada al sexo. Los afectados presentaban rasgos que hoy son característicos del síndrome, por lo que se le denominó síndrome de Martin y Bell (Martin y Bell, 1943).

En 1969, Lubs describió una anomalía cromosómica en dos hermanos con retraso mental. Ésta consistía en un estrechamiento en el brazo largo del cromosoma X al que denominó marcador X, y que posteriormente, sería llamado sitio frágil debido al aspecto de fragilidad.

En 1977, Southerland demostró que los sitios frágiles podían ser inducidos en medios carentes de ácido fólico. Posteriormente, mediante técnicas de bandeado cromosómico, se determinó que el sitio frágil se encontraba ubicado en el sitio Xq27.3. La localización de este sitio sugería que el SXF era un trastorno ligado al cromosoma X.

En un principio se consideró el SXF como un trastorno recesivo ligado al cromosoma X, por lo cual, mujeres portadoras heterocigotas no mostrarían rasgos típicos del síndrome; sin embargo, había reportes de mujeres afectadas y hombres portadores del sitio frágil que no estaban afectados (Hagerman *et al.*, 1996). Debido a estas inconsistencias, Sherman *et al.* (1985) estudiaron los patrones de segregación en diferentes familias alrededor del mundo. Encontraron que el riesgo de padecer retraso mental en familias afectadas por el síndrome estaba determinado por la posición de los individuos en el árbol genealógico y

que éste aumentaba en cada generación (anticipación genética). A este tipo de herencia no convencional se le denominó como paradoja de Sherman, la cual establecía que:

A) No podían existir mutaciones *de novo*, ya que todos los afectados descendían de una madre portadora.

B) Cerca de un 20% de varones portadores basados en análisis de pedigrí, no manifestaban la enfermedad o algún síntoma, por lo que se les denominó varones transmisores normales (*NTM por sus siglas en inglés*).

C) Aproximadamente el 35% de mujeres portadoras presentaban alguna discapacidad intelectual (generalmente más leve que los varones).

D) El riesgo depende del sexo y fenotipo del progenitor, de acuerdo a lo siguiente:

- Mujeres portadoras que presentan alguna discapacidad intelectual tenían un mayor riesgo de tener hijos afectados con el síndrome, que las portadoras con inteligencia normal.

- Las hijas de los NTM pocas veces tenían retraso mental, mientras que las hijas de mujeres asintomáticas portadoras presentaban un 30% de riesgo de padecer el SXF.

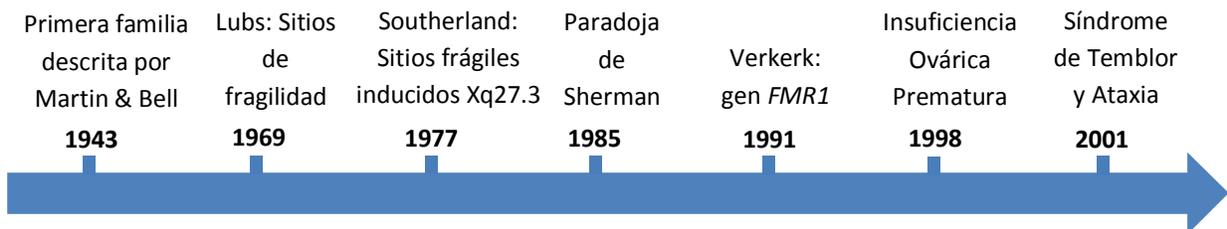
- Las hijas de los NTM tienen más riesgo de tener descendientes afectados que la madre de estos, el cual es producido por algún cambio en el cromosoma X durante las dos generaciones.

Para explicar este inusual patrón de herencia, Sherman *et al.* (1985) propusieron un evento en el cual, el presunto gen de X frágil era mutado en dos pasos. Consideraron que la mutación era causada por un estado premutación en el que no se producían síntomas clínicos, y un segundo estado de mutación, el cual antecedió a la premutación, denominado mutación completa, que es asociado con los rasgos típicos del SXF. Paralelamente, Pembrey *et al.* (1985) demostraron que familias con individuos afectados

con X frágil y que presentaban mutación completa eran siempre descendientes de una mujer portadora con premutación.

Finalmente, a mediados de 1991, Verkerk *et al.*, identificaron el gen responsable del sitio de fragilidad mediante la técnica de posicionamiento clonal, el gen *FMR1* (*Fragile Mental Retardation 1*). Encontraron que en una familia con X frágil había una expansión anormal del triplete repetido CGG en el extremo 5' de la región no codificante del exón 1, lo que sugirió la participación de éste gen en la expresión fenotípica de individuos con X frágil.

A partir del descubrimiento del gen responsable del SXF, se han identificado 2 enfermedades de aparición tardía asociadas al estado de premutación. El primero de ellos, denominado con el nombre de Insuficiencia Ovárica Prematura asociada a X frágil (FXPOI *por sus siglas en inglés*), fue descrito por primera vez en 1998 por Murray y *et al.*, quienes sugirieron que *FMR1* interviene en el desarrollo y maduración del ovario. Posteriormente, Bretherick *et al.*, encontraron una asociación de FXPOI debido al incremento de repetidos en alelos premutados y normales de *FMR1*. Finalmente, la segunda patología asociada a la premutación de *FMR1* fue descrita por Hangerman *et al.* (2001), a la que se denominó Síndrome de Temblor y Ataxia asociado a X Frágil (*FXTAS por sus siglas en inglés*), en la cual detectaron niveles elevados de hasta 4 veces lo normal de RNAm, lo que da como resultado un efecto patogénico por ganancia de función así como niveles reducidos la proteína FMRP (*Fragile Mental Retardation Protein*) (Hangerman *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Sucesos históricos relevantes del gen *FMR1*.

### 3. SÍNDROME X FRÁGIL

Es considerado como la causa más común de retraso mental hereditario (Crawford *et al.*, 2001); su prevalencia se estima 1 en 4,000 varones y 1 en 8,000 mujeres (Hagerman, 2008). Los rasgos morfológicos típicos en varones con X frágil incluyen cara alargada con frente prominente, mandíbula protuberante y orejas grandes (Hagerman 1996). El nombre de la enfermedad deriva del sitio frágil FRAXA (folato sensitivo) ubicado en la posición q27.3 del cromosoma X (O'Donnell y Warren, 2002). En la mayoría de los casos reportados, el síndrome ocurre por la amplificación anormal del triplete CGG (Citocina-Guanina-Guanina) localizado en la región UTR 5' del gen *FMR1* del brazo largo del cromosoma X (Verkerk *et al.*, 1991, Nolin *et al.*, 1996). Cuando el triplete es amplificado más de 200-230 veces (mutación completa), desencadena hipermetilación en la región de los repetidos, así como en la isla CpG de la región promotora, lo que provoca la inactivación transcripcional del gen (Oberle *et al.*, 1991). Además del retraso mental, las alteraciones en *FMR1* incluyen trastornos de aparición tardía como Insuficiencia Ovárica Prematura y Síndrome de Temblor y Ataxia asociados a X Frágil cuando la región de los repetidos se encuentra en el rango de premutación.

El producto final de los transcritos traducibles de *FMR1*, la proteína FMRP, se encuentra involucrada en la maduración dendrítica y plasticidad sináptica a través de mecanismos que actúan inhibiendo el grupo 1 de receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu1 y mGlu5) mediados por la traducción de RNAm en las dendritas (Grossman *et al.*, 2006). Los mecanismos de transporte y regulación de RNAm en las dendritas se consideran ampliamente importantes para una adecuada función neuronal y modulación de la plasticidad sináptica, lo cual resulta esencial en el aprendizaje y consolidación de la memoria. Es aquí donde FMRP desempeña una función importante y cuya ausencia, es la causa del síndrome (Kiebler y Des Groseiller., 2000). Además, se sugiere que FMRP regula la traducción específica de aproximadamente el 4% de RNAm en el cerebro humano (incluyendo su propio RNAm) vía cuarteto G; aunque también es capaz de unirse a RNAm que no contienen el cuarteto G (Ashley *et al.*, 1993; Laggerbauer *et al.*, 2001).

## 4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

### 4.1. Varones

Alrededor del 80-90% de individuos varones con mutación completa presentan deficiencia intelectual, así como una amplia variedad de problemas psicológicos, tales como hiperactividad con déficit de atención, retraso en la aparición del lenguaje, evitación de contacto ocular y comportamiento de tipo autista. El fenotipo asociado que suele encontrarse en la mayoría de individuos afectados con el padecimiento son: cara alargada con frente amplia y mentón prominente, orejas grandes y despegadas, macroorquidismo (90% de los casos) e hiperlaxitud articular; sin embargo, algunos rasgos pueden estar o no presentes dependiendo de la edad. Otros hallazgos físicos frecuentes son macrocefalia, paladar elevado y dientes apiñados en los maxilares. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en individuos con X frágil incluyen:

- **Alteraciones osteoarticulares:** Pie plano, pulpejo de las yemas de los dedos y *genu recurvatum*.
- **Alteraciones cardíacas:** Dilatación aórtica y prolapso de la válvula.
- **Alteraciones oculares:** Estrabismo (cerca de un 30-35% de los casos) y trastornos de refracción.
- **Afectaciones neurológicas:** Epilepsia (presente en aproximadamente el 15% de individuos), dilatación de los ventrículos cerebrales, anomalías en el tamaño del hipocampo o núcleo caudado, giro temporal superior y vermis cerebeloso.
- **Alteraciones endócrinas:** Obesidad, pubertad precoz y aceleración de peso y talla.
- **Alteraciones de oído:** Otitis de repetición.

Varones con premutación pueden presentar también retrasos en el aprendizaje, alteraciones de conducta, trastorno por déficit de atención con o sin hiperactividad e incluso autismo.

## 4.2. Mujeres

Cerca de un 30 a un 50% de mujeres portadoras del gen mutado presentan retraso mental leve, o cercano a niveles normales, siendo poco común encontrar mujeres con retraso mental severo. Mujeres con mutación completa que no presentan retraso mental, pueden tener problemas en el área de matemáticas, problemas emocionales y de relación social. Las manifestaciones clínicas en mujeres con X frágil son generalmente más leves y variables que en los hombres, siendo su aspecto físico menos evidente, aunque existen algunos casos de mujeres que presentan los rasgos típicos del síndrome (Ramos, 2006).

## 5. HERENCIA

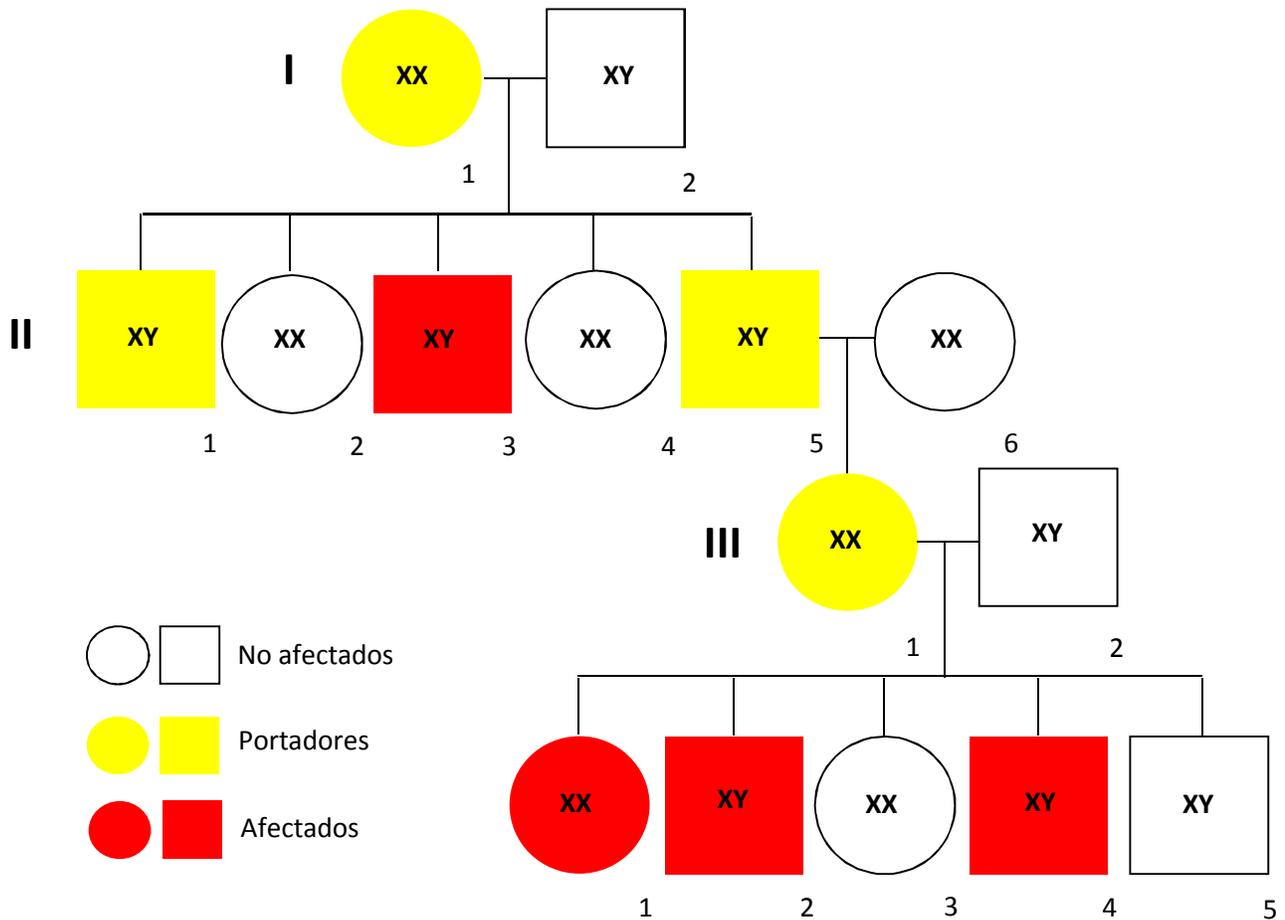
### 5.1. Patrón de herencia

El Síndrome X Frágil es un trastorno de tipo dominante ligado al cromosoma X. Sin embargo, presenta un patrón de segregación que no obedece las leyes básicas de esta herencia mendeliana y que es explicado mediante la paradoja de Sherman (ver Figura 2) (Hagerman *et al.*, 1996; O'Donnell y Warren, 2002).

Al igual que otras enfermedades asociadas a la inestabilidad de tripletes repetidos, el SXF presenta individuos que no manifiestan algún síntoma clínico (varones transmisores normales) y que suelen ser definidos como hemicingotos fenotípicamente normales. Se caracterizan por presentar muy pocos o nulos sitios frágiles y ser portadores del estado de premutación, el cual siempre transmiten a sus hijas, quienes son fenotípicamente normales. (Sherman *et al.*, 1985; Loesch *et al.*, 2005). Por el contrario, los hijos varones nunca heredan esta condición, ya que el padre únicamente le transmite el cromosoma Y. En cambio, las mujeres al contar con dos cromosomas X transmiten uno u otro con la misma probabilidad (50%) a sus hijos e hijas, quienes pueden ser portadores o manifestar la enfermedad dependiendo del número de repetidos que conformen el estado de premutación (ver Cuadro 2).

## Patrón de herencia del Síndrome X Frágil

(Paradoja de Sherman)



**Figura 2.** Patrón de herencia común. **Primera generación:** Una madre portadora del alelo premutado tiene el riesgo de transmitir tanto la mutación completa como la premutación a sus hijos e hijas. Cuando ésta última ocurre, puede transmitir el alelo premutado a todos sus descendientes, los cuales no se verán afectados por SXF, pero tendrán el riesgo a padecer algunas de las enfermedades asociadas a premutación. **Segunda generación:** El padre únicamente hereda el cromosoma X a todas sus hijas; por lo tanto siempre tendrá hijas portadoras. Los hijos varones nunca se ven afectados ya que no heredan el cromosoma X del padre. **Tercera generación:** Las mujeres de la tercera generación tienen más riesgo de tener descendientes afectados que las mujeres de la primera generación. Los nietos del individuo de la segunda generación se ven severamente afectados por el síndrome. El riesgo de transmitir el cromosoma afectado es del 50% a cada uno de sus descendientes, ya sean varones o mujeres (no confundir probabilidad de transmisión de un cromosoma con el riesgo de transmitir la mutación completa a partir de un estado de premutación).

**Cuadro 2.** Riesgo de transición de premutado a mutación completa (Nolin *et al.*, 2003).

<b>Número de repetidos CGG en mujeres con premutación</b>	<b>Mujeres estudiadas</b>	<b>Porcentaje de descendientes afectados</b>
55 -59	27	1 (3.7%)
60 – 69	113	6 (5.3%)
70 – 79	90	28 (31.1%)
80 – 89	140	81 (57.8%)
90 - 99	111	89 (80.1%)
100-109	70	70 (100%)
110-119	54	53 (98.1%)
120-129	36	35 (97.2%)
130-139	18	17 (94.4%)
140-200	19	19 (100%)

## **5.2. Transición de premutación a mutación completa**

La transición del estado alélico de premutación a mutación completa está restringida únicamente en las mujeres. La herencia paterna se transmite de manera estable con pequeños incrementos en el número de repetidos que nunca llegan a una mutación completa. En algunos otros casos, suele observarse incluso un retroceso del número de repetidos (Nolin *et al.*, 1996). En muy raras ocasiones, se ha observado reducción en el número de repetidos CGG en mujeres. Se tiene el registro de un alelo de 110 repetidos que fue transmitido de una madre a su hija con un decremento de 44 copias del repetido (Vits *et al.*, 1994). El riesgo de una madre de transmitir un alelo premutado a un alelo mutado depende del número de repetidos en la premutación y de la interrupción de los repetidos AGG (Tarleton y Saul, 2008).

Se ha sugerido que la transmisión materna podría ocurrir debido a las diferencias específicas del sexo durante la gametogénesis, lo cual conduciría a la producción de oocitos con mutación completa. En cambio, se ha visto que varones afectados con

mutación completa únicamente producen espermatozoides con premutación (Reyniers *et al.*, 1993). El cigoto por lo tanto, comienza a desarrollarse con mutación completa. En alguna etapa temprana de su desarrollo, resultará un mosaicismo somático con una reducción en el número de repetidos, la cual además, se ve favorecida en los testículos (Oostra y Willemsen 2009). Tal hipótesis es apoyada por la observación de premutación en células germinales y mutación completa en el resto de las células de fetos de 17 semanas de desarrollo, portadores de mutación completa (Malter *et al.*, 1997).

Un modelo precigótico predice que la expansión del estado de premutación a mutación completa ocurre durante la meiosis materna con consiguientes contracciones de repetidos en los gametos de los descendientes, en el cual, gametos con premutación podrían tener una ventaja de selección debido a la presencia de FMRP o en contra de la expansión (Malter *et al.*, 1997). Además, se considera que estas células germinales tendrían una ventaja en la proliferación con respecto a las células con mutación completa, debido a que en estas últimas, existe una demora en su ciclo celular debido al retraso de la replicación de *FMR1* (Hansen *et al.*, 1993). Contrario a esta hipótesis, se ha propuesto un segundo modelo denominado: expansión postcigótico, el cual indica que en realidad, los gametos nunca son portadores de la mutación completa, y que la expansión de los repetidos CGG ocurre justo después de la separación de la línea germinal (Wöhrle *et al.*, 1993). Sin embargo, mujeres con mutación completa son portadoras de mutación completa en sus gametos (Malter *et al.*, 1997). Hasta el momento, no se han hecho observaciones en mujeres portadoras de la premutación.

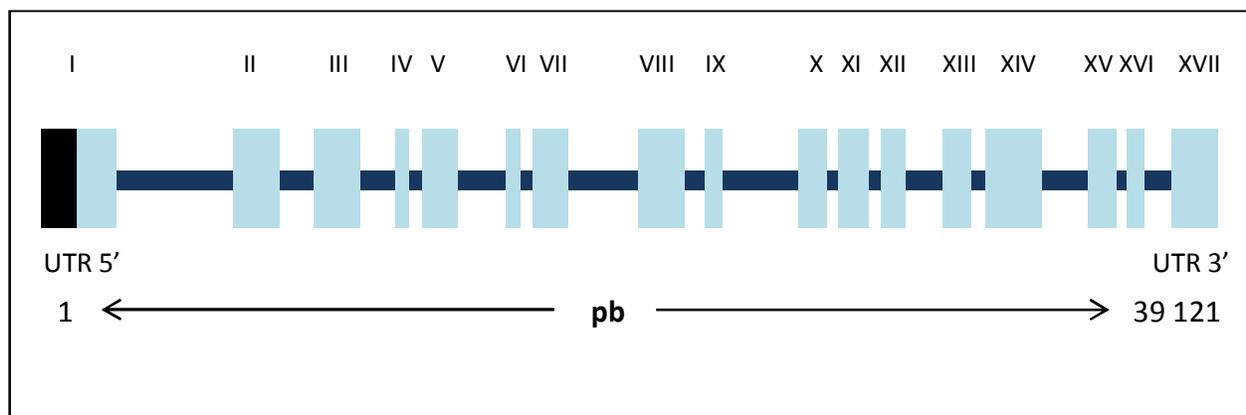
### **5.3. Mutaciones fundadoras**

Oudet *et al.*, llevaron a cabo un estudio para determinar el origen de las mutaciones responsables del SXF. Analizaron dos sitios polimórficos de repetidos-CA, uno en FRAXAC2 y otro en DXS548 localizados respectivamente a 10 y 150 Kb de la zona de repetidos CGG. El análisis se llevó a cabo en cromosomas con mutación completa y sin mutación. De acuerdo con las diferencias alélicas y distribución de haplotipos observadas en ambos

tipos de cromosomas, dedujeron que el origen del síndrome se pudo haber llevado a cabo a partir de un esquema de no más de 6 cromosomas fundadores, y mediante un número limitado de eventos primarios, pudieron haber provocado expansiones recurrentes en un rango normal-alto de repetidos CGG en población una población caucásica (Oudet *et al.*, 1993).

## 6. GEN *FMR1*

*FMR1* es un gen altamente conservado entre las diferentes especies; organismos tan divergentes como el humano, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* y *Gallus gallus*, expresan *FMR1* (Verkerk *et al.*, 1991; Ashley *et al.*, 1993). Dentro de estos organismos, las secuencias del humano y del ratón son las más parecidas con un 95% a nivel de nucleótido y 97% a nivel de aminoácidos (Deelen *et al.*, 1994). *FMR1* cuenta con un tamaño aproximado de 38 kb y está compuesto por 17 exones que codifican a transcritos de 470 pb a 4.3 kb (ver Figura y Cuadro 3) (Verkerk *et al.*, 1991; Ensembl 2011). La región de repetidos se encuentra 69 pb río arriba del inicio de la transcripción. El empalme alternativo ocurre hacia el extremo 3' del RNA mensajero. Las múltiples variantes del empalme alternativo codifican a diferentes isoformas de la proteína presentes en diferentes localizaciones celulares (Hooogeven y Oostra. 1997).



**Figura 3.** Representación del gen *FMR1* con sus 17 exones. La región de los repetidos (CGG)<sub>n</sub> se encuentra en la UTR 5' localizada en el exón 1 (color negro).

**Cuadro 3.** Variantes de los productos obtenidos como resultado del empalme alternativo en *FMR1*.

<b>Nombre</b>	<b>Longitud del transcrito (pb)</b>
FMR1-001	4308
FMR1-002	1295
FMR1-003	3699
FMR1-004	1774
FMR1-005	3437
FMR1-201	4333
FMR1-202	4125
FMR1-203	1853
FMR1-006	776
FMR1-007	470
FMR1-008	541
FMR1-009	497
FMR1-010	815

### **6.1. Tamaño de alelos**

Una de las características principales del gen es el polimorfismo localizado en la región UTR 5', la cual consiste en una región rica en repetidos CGG. A partir de esto, los alelos de *FMR1* son clasificados de acuerdo al número de copias de este triplete y al estado de metilación de la región de los repetidos (Strom *et al.*, 2007).

#### **6.1.1. Alelos normales**

Son considerados como normales aquellos que presentan de 5 a 40 repetidos (Tarleton y Saul 2008); la media se estima entre 29 y 30 copias (Dombrowski *et al.*, 2002). Este tipo de alelos son transmitidos de manera estable y sin riesgo de expansión o delección. Se caracterizan por presentar una interrupción del triplete AGG cada 10 a 20 repetidos CGG y en algunos casos, cada 30. Esta secuencia de interrupción se cree actúa en contra de la

expansión de los tripletes CGG, probablemente, para interrumpir la formación de estructuras secundarias derivadas durante la replicación del DNA (Eichler *et al.*, 1994; Kunst y Warren 1994).

### **6.1.2. Zona gris**

Existe una zona intermedia en la cual no es posible determinar el número de repetidos que precisen la transición del estado normal al de premutación. Esta región, denominada *zona gris*, puede ser definida dentro del rango de 41 a 58 repetidos. Sin embargo, la frecuencia y magnitud de los repetidos incrementa en alelos con más de 50 repetidos (Sherman, 2005). El menor número de repetidos que se ha visto puede provocar descendientes con mutación completa en una sola transmisión ha sido 59 (Nolin *et al.*, 2003). Cabe señalar, que existe una probabilidad a desarrollar alelos inestables en secuencias puras de 33-39 repetidos CGG carentes del triplete AGG, así como predisposición a desarrollar Insuficiencia Ovárica Prematura asociada a X frágil. Esta característica ha sido utilizada como un importante predictor de alelos inestables (Eichler *et al.*, 1994; Kunst y Warren 1994).

### **6.1.3. Alelos premutados**

Alelos con 59 a 200-230 repetidos entran en el rango de premutación. En una población general, se ha estimado que 1 de cada 813 hombres y 1 de cada 259 mujeres son portadores de alelos premutados (Dombrowski *et al.*, 2002). Sin embargo, la prevalencia varía entre diferentes grupo étnicos, siendo por ejemplo, menos común en Taiwán que en Israel (Tzeng *et al.*, 2005; Pessoa *et al.*, 2000; Toledano-Alhadef *et al.*, 2001).

La expansión de estos repetidos se encuentran asociados a cambios en los niveles de RNA mensajeros (RNAm) y de la proteína FMRP (Jacquemont *et al.*, 2007). Si bien este número de repetidos no está asociado a retraso mental, se corre el riesgo de padecer los siguientes síndromes asociados a premutación en *FMR1*:

**A) Síndrome de Temblor y Ataxia Asociado a X Frágil:** Caracterizado por la aparición tardía de ataxia cerebelosa progresiva, así como por intención de temblor, pérdida de memoria a corto plazo, deterioro cognitivo, demencia, Parkinson, debilidad muscular, y disfunción autonómica (Loesch *et al.*, 2005, Jacquemont *et al.*, 2006, Louis *et al.*, 2006). Tanto hombres como mujeres son propensos a desarrollar la enfermedad. La prevalencia se estima en un 40% del total de varones con premutación con más de 50 años edad y la penetrancia se haya relacionada con la edad. (Ver Cuadro 4) (Grigsby *et al.*, 2005). El riesgo en mujeres no ha sido definido aún, pero se cree es menor que en hombres (Biancalana *et al.*, 2005).

**Cuadro 4.** Riesgo de padecer FXTAS en hombres con premutación de *FMR1*.

Edad	Riesgo
50-59	17 %
60-69	38 %
70-79	47 %
> 80	75 %

**B) Insuficiencia Ovárica Prematura asociada a X Frágil:** Cerca del 20% de mujeres portadoras con premutación en *FMR1* manifiestan Insuficiencia Ovárica Prematura (también conocida como Falla Ovárica Prematura -FOP-), la cual es definida como el cese de la menstruación antes de los 40 años (Sherman, 2005; Bussani *et al.* 2004). Los alelos premutados se consideran como la mayor causa idiopática de esta enfermedad (Jacquemont *et al.*, 2006). El tamaño de repetidos dentro del rango de premutación se correlaciona con la penetrancia, el inicio de FXPOI y el incremento de la concentración de hormonas folículo estimulante. La incidencia llega a ser significativamente superior en un rango de 70-80 repetidos y parece estancarse o decrecer en los 100 repetidos (Sullivan *et al.*, 2005). Mujeres con diagnóstico de FXPOI han tenido hijos afectados con SXF (Corrigan *et al.*, 2005). Se

estima que 5-10% de mujeres pueden concebir después de ser diagnosticadas con FXPOI (Nelson *et al.*, 2005). Algunos autores indican que es más adecuado emplear el término de Insuficiencia Ovárica Prematura asociada a X Frágil que Falla Ovárica Prematura (Wittenberger *et al.*, 2007).

FXTAS al igual FXPOI se hayan relacionados con elevados niveles de RNAm de *FMR1*. La presencia de esta sobreproducción de mensajeros, ha sugerido una función tóxica debido al efecto de ganancia de función del RNA ( Jin *et al.*, 2003). Esta observación, se basa en la detección de niveles elevados de CGG en RNAm de *FMR1* (Tassone *et al.*, 2000), así como niveles reducidos o indetectables de FMRP en leucocitos de sangre periférica (Kenneson *et al.*, 2001) y regiones cerebrales de individuos portadores de la premutación (Tassone *et al.*, 2004). Se sugiere además que la expansión de CGG por sí sola, no sólo reduce los niveles de FMRP, sino que es responsable del incremento en la transcripción (Tassone *et al.*, 2000).

Mediante análisis de espectrometría de masas, fue posible la identificación de proteínas de neurofilamentos y dos proteínas de unión a RNAm: hnRNP-A2 (Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2) y MBNL1 (*muscle bind-like protein*) aisladas de inclusiones celulares. MBLN1 se une a los RNAm que contienen el repetido CUG o CCUG el cual está asociado a la distrofia miotónica 1 y 2 (DM1 y DM2). Diversos estudios apoyan la hipótesis que MBLN1 es secuestrada por un RNAm largo con expansiones de C(C)UG, su secuestro se haya relacionado con alteraciones en el empalme alternativo visto en la distrofia miotónica (Ranum y Cooper, 2006). Este mismo evento de MBLN1 en las inclusiones intracelulares visto en FXTAS, sugiere una posible relación entre ambos mecanismos moleculares (Jacquemont *et al.*, 2007).

Para apoyar más aún la teoría sobre la toxicidad de RNAm, se han realizado diversos estudios en *Drosophila melanogaster*, donde, el triplete repetido CGG en el rango de premutación fue expresado como un RNA en el contexto de un gen reportero. Las moscas desarrollaron neurodegeneración de los ojos así como la presencia de inclusiones (Jin, *et*

*al.*, 2003). Ratones *knock-in* con una expansión por encima de 100 repetidos CGG en *FMR1*, presentaron deterioro cognitivo y de comportamiento así como inclusiones intracelulares con ubiquitina positiva en varias neuronas, además de elevados niveles de RNAm de *FMR1* y reducida expresión de FMRP (Willemsen *et al.*, 2003; Van Dam *et al.*, 2005). El promedio del tamaño de inclusiones en determinadas zonas cerebrales como núcleo olfatorio, cerebelo, colículo inferior, núcleo talámico parafascicular, núcleo mamilar medial, amígdala y núcleos pontinos resultó menor en ratones juveniles que las comparadas con ratones maduros (Brouwer *et al.*, 2007). El aumento gradual del tamaño de las inclusiones y los porcentajes positivos de ubiquitina en neuronas en el transcurso de la vida, han sugerido un desarrollo progresivo en el fenotipo de FXTAS en humanos (Jacquemont *et al.*, 2004). Los elementos hallados dentro de estas inclusiones son: ubiquitina, chaperonas moleculares Hsp40, complejo 20S del proteosoma y HR23B, mientras que FMRP no se halla dentro de las inclusiones pero sí los RNAm de *FMR1* (Bergink *et al.*, 2006).

#### **6.1.4. Alelos mutados**

Secuencias de 200-230 hasta cientos o miles de repetidos se encuentran en el rango de mutación completa y son responsables de la hipermetilación del gen (O'Donnell y Warren, 2002).

#### **6.2. Inestabilidad de tripletes repetidos**

Los mecanismos responsables de la inestabilidad de tripletes repetidos en el Síndrome X Frágil son todavía inciertos. Son pocos los estudios que han sido reportados para el triplete CGG, debido a la extrema dificultad para trabajar con estas secuencias altamente inestables, en comparación con los tripletes repetidos asociados a enfermedades como la distrofia muscular miotónica de tipo 1 y 2, así como ataxia Friedreich. La dificultad de estas secuencias radica en los continuos desplazamientos en ambas cadenas del DNA debido a las continuas repeticiones de citocinas y guaninas (Shimizu *et al.*, 1996). Sin embargo, el modelo más aceptado actualmente, es el deslice o patinaje de las cadenas del

DNA durante la replicación, que fundamenta sus bases en los estudios llevados a cabo por Kang *et al.*, en *Escherichia coli*. Dichos estudios, revelaron que la frecuencia de expansiones y deleciones dependen de la dirección de la replicación. Para ello, se determinó si un plásmido con 170 repetidos del triplete CTG era completamente homogéneo tras sucesivas rondas de replicación, o si daba lugar a secuencias heterogéneas. Los resultados arrojaron plásmidos recombinantes que contenían secuencias con expansiones y deleciones en un rango de 17 a 300 repetidos (Kang *et al.*, 1995). En *E. coli*, cuando el triplete CTG se encuentra ubicado en la cadena rezagada naciente, provoca la formación de estructuras secundarias denominadas: *hairpin loops*, las cuales actúan como una estructura dúplex antiparalela de amplia estabilidad con apareamientos timina-timina; mientras que, en la cadena complementaria, el triplete CAG forma únicamente estructuras metaestables (Smith *et al.*, 1995). Cuando el triplete CTG se haya situado en el templete de la cadena rezagada, el *hairpin loop* que se forma provoca que los repetidos correspondientes a esta estructura sean anulados, debido a que la secuencia de esta estructura permanecerá oculta para la polimerasa, lo que dará lugar a deleciones. Por el contrario, cuando esta estructura se forma en la cadena rezagada, tendrá lugar la expansión del triplete (Kang *et al.*, 1995).

Se sugiere que estos eventos son promovidos por pausas que hace la polimerasa al situarse en *loci* de doble cadena de repetidos CTG y CGG (Kang *et al.*, 1995). Durante estas pausas, tiene lugar la formación de un *hairpin loop* (debido a la naturaleza de los tripletes a formar dichas estructuras) que provocará un deslice de la cadena recién sintetizada, y una vez que la polimerasa reanude su actividad, comenzará a incorporar nucleótidos donde anteriormente lo había hecho (ahora como producto del deslice), lo cual provocará que vuelva a sintetizar la secuencia que ya había realizado, dando lugar a la expansión del triplete (Wells, 1996). Así mismo, los resultados sobre las pausas de la polimerasa, indican que longitudes apropiadas de tripletes adoptan conformaciones de tipo “no B” del DNA, las cuales, bloquean la progresión de la DNA polimerasa, resultando en un retraso que da lugar a estos desplazamientos en la horquilla de replicación, promovidos por los *hairpin*

*loops* (Kang *et al.*, 1995 -b-). Cabe señalar, que el deslizamiento por sí solo no puede explicar todos los aspectos de expansión de repetidos, especialmente si estos son de gran tamaño (Oostra y Willemssen, 2009).

Por otro lado, estudios en *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, revelan que la frecuencia de deleciones es similar a la de expansiones, las cuales, son confinadas únicamente a la secuencia de los repetidos (Kang *et al.*, 1995). Paralelamente, estudios en levaduras deficientes de *RAD27*, muestran un incremento significativo en el número de repetidos CGG. *RAD27* al igual que *FEN1* en mamíferos, es un gen involucrado en la remoción de bucles como los derivados durante la síntesis los fragmentos de Okazaki (White *et al.*, 1999).

### **6.3. Mutaciones**

#### **6.3.1. Expansión de repetidos CGG**

Es considerada como la principal mutación responsable del Síndrome X Frágil, causada por la expansión anormal del triplete CGG por encima de los 200-230 repetidos en la región UTR 5' del gen *FMR1*. La mutación está asociada con hipermetilación de la región de los tripletes repetidos así como en la isla CpG de la región promotora, situada río arriba a 250 pb de la región de los repetidos, lo cual da lugar al silenciamiento del gen (Verkerk *et al.*, 1991; Oberle *et al.*, 1991; O'Donnell y Warren, 2002). Cabe aclarar que la expansión de los repetidos por sí sola no es capaz de producir el silenciamiento del gen. Se han descrito individuos no afectados con más de 200 repetidos CGG, cuya región promotora no se encuentra metilada. Los valores de transcripción y traducción permanecen tan eficientes como los de individuos con alelos normales (De Vries *et al.*, 1996).

#### **6.3.2. Delección de repetidos CGG**

Milà *et al.*, reportaron un individuo con mosaicismo que presentaba delección en la región de los repetidos CGG sin pérdida adicional en la secuencia del gen. Esta delección generó una secuencia de 15 repetidos puros, la cual estaba presente en el 31% de linfocitos.

Mediante análisis Southern blot con la sonda StB12.3, se determinó que el individuo mostraba un fragmento de 5.6 a 6.1 kb, y un fragmento adicional de 2.7 kb. Por otro lado, de Graaff *et al.*, reportaron un caso similar en un individuo con mosaicismo que presentaba tanto mutación completa como una secuencia de 21 a 33 repetidos. Ambos casos mostraron alelos no metilados con secuencias normales; sin embargo, los niveles de FMRP no eran suficientes para evitar el síndrome (Milà *et al.*, 1996; de Graaff *et al.*, 1995).

### **6.3.3. Deleción de una porción de los repetidos CGG y algunas secuencias flanqueantes**

La inestabilidad de la región que contiene los repetidos no se limita únicamente a los repetidos CGG, sino que también se extiende a regiones flanqueantes. Por otra parte, de Graaff *et al.*, describieron 4 individuos con mosaicismo no emparentados que presentaban mutación completa así como pequeñas deleciones en la región de los repetidos. Mediante análisis de secuenciación se detectaron deleciones en la región de los repetidos así como en las secuencias flanqueantes de los repetidos de los 4 pacientes. Las deleciones se encontraban entre 75 y 53 pb próximas a la región de los repetidos, lo que sugirió una región *hot spot* para deleciones en la región de los repetidos de *FMR1*, haciendo hincapié en que la inestabilidad de esta región puede ser debida a la presencia de una expansión aberrante de CGG (de Graaff *et al.*, 1995). Un caso similar fue descrito por Meijer *et al.*, quienes reportaron una familia con 4 individuos varones y 7 mujeres que presentaban una deleción de 1.6 kb próxima a la región de los repetidos CGG. Todos los hombres y sólo 2 mujeres presentaban fenotipo asociado a X frágil. Mediante RT-PCR en varones, se demostró que *FMR1* no era expresado, lo cual sugirió la pérdida de la región promotora; además se determinó que los pacientes tenían aproximadamente 45 repeticiones CGG en *FMR1*, los cuales no contaban con la interrupción AGG (Meijer *et al.*, 1994). De manera similar, Gu *et al.*, reportaron un individuo con fenotipo X frágil con una deleción de aproximadamente 100 kb que incluían los primeros 7 exones de *FMR1* (Gu *et al.*, 1994).

#### **6.3.4. Delección de todos los repetidos CGG y algunas secuencias de flanqueantes**

Deleciones de aproximadamente 13 Mpb en la región Xq26.3-q27.3 que incluyen el gen *FMR1* han sido reportadas en individuos que exhiben un fenotipo más severo que el observado típicamente en pacientes con X frágil (Wolff *et al.*, 1997). Gedeon *et al.*, describieron un paciente que presentaba rasgos típicos de X frágil con delección total de *FMR1* y aproximadamente 2Mpb de DNA próximos al gen y 0.5 Mpb distales (Gedeon *et al.*, 1992). De igual forma, Tartelon *et al.*, reportan un individuo afectado con fenotipo X frágil que presentaba delección total del gen junto con aproximadamente 5 Mpb próximo y 1 Mpb distal de la secuencia de *FMR1* (Tartelon *et al.*, 1993). Por último, un paciente descrito por Quan *et al.*, presentaba eliminación de la secuencia de *FMR1* junto con aproximadamente 10 Mpb de DNA próximo al gen. Además de los rasgos típicos del síndrome, presentaba aparición temprana de obesidad y atresia anal (Quan *et al.*, 1995).

#### **6.3.5. Mutaciones puntuales y de dos nucleótidos**

A diferencia de los tipos de mutación mencionados, las mutaciones puntuales no están promovidas por la presencia de un número elevado de copias del triplete CGG como se ha sugerido. Este tipo de alteración, está asociado principalmente a mutaciones puntuales y de 2 pb en *FMR1* (Wells 2009). De Boulle *et al.*, describieron pacientes con fenotipo de X frágil sin expresión de FMRP y con una longitud de repetidos CGG normal sin metilación en la isla CpG (De Boulle *et al.*, 1993). Wang *et al.*, describen 3 individuos afectados por el síndrome con un cambio puntual de citocina a timina (C-T) en el nucleótido 14 del intrón 10 con longitud normal en el número de repetidos CGG. Para determinar el efecto de esta mutación, se llevó a cabo la RT-PCR, y secuenciación del transcrito, revelando que el alelo con la mutación C-T escapa totalmente al exón 10, lo que da como resultado la unión de los exones 9 y 11. La delección del exón 10 lleva a una terminación prematura del transcrito, lo que trae como consecuencia que las regiones que codifican el segundo dominio KH y los dominios de la caja RGG de la proteína FMRP no sean traducidas (Wang

*et al.*, 1997). También han sido reportadas dos mutaciones intragénicas con pérdida de función en *FMR1*, la primera de ellas se encontró en un paciente con delección *de novo* en uno solo de los nucleótido, y el segundo en un paciente que heredó un cambio en dos pares de bases, ambos con rasgos típicos de X frágil (Lugenbeel *et al.*, 1995).

#### **6.4. Epigenética de *FMR1***

La metilación del gen *FMR1* por expansión del triplete CGG es un proceso dinámico que ocurre durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y que es además, acompañado de otros eventos epigenéticos como la desacetilación de las histonas H3 y H4, la metilación de la histona H3-K9 y desmetilación de la histona H3-K4 (Tabolacci *et al.*, 2005). En células germinales de fetos con mutación completa de mujeres con premutación, *FMR1* no está metilado; sin embargo, en muestras de vellosidades coriónicas de fetos con mutación completa, la zona de repetidos se encuentra metilada y ésta se incrementa conforme avanza el desarrollo embrionario (Willemsen *et al.*, 2002). El problema principal para estudiar los primeros sucesos epigenéticos de *FMR1*, subyace en la carencia de material apropiado para su estudio. Se han llevado a cabo estudios en ratones *Fmr1* KO con más de 200 repetidos; sin embargo, la inactivación de *FMR1* no ocurre en sistemas murinos (Brouwer *et al.*, 2007). Eiges *et al.*, desarrollaron una línea de células madre embrionarias humanas (*HESC por sus siglas en inglés*) de una mujer portadora con 170 repetidos CGG obtenida a partir de un diagnóstico genético de preimplantación (*PGD por sus siglas en inglés*). El número de repetidos CGG de *FMR1* se determinó mediante Southern blot, el cual mostró un número superior a los 1000 repetidos. Cuando estas células permanecen indiferenciadas, muestran niveles normales en la transcripción y traducción, lo cual además, indica que la expansión de los repetidos CGG por sí sola no es capaz de producir el silenciamiento del gen. Sin embargo, diferenciaciones espontáneas hacia células de cuerpos embrionarios (*EB por sus siglas en inglés*) y teratomas, indujeron a una metilación gradual de *FMR1*, con niveles bajos en la expresión del gen, similar a los derivados de células de pacientes con X frágil (Eiges *et al.*, 2007).

## 7. PROTEÍNA FMRP

### 7.1. Localización

Estudios inmunocitoquímicos en ratones revelan que FMRP es ampliamente expresada en todas las células hasta el día 14 del desarrollo embrionario. Posteriormente, exhibe patrones más específicos en tejidos de origen ectodérmico como cerebro, ganglios, folículos pilosos, células sensoriales y médula suprarrenal; así como en gónadas, derivadas de la capa mesodérmica; todos estos tejidos muestran altos niveles de expresión (De Diego Otero *et al.*, 2000). La expresión de FMRP en embriones humanos de 3 a 7 semanas es consistente con el patrón de expresión en ratones, siendo predominante en cerebro y testículos, tejidos que son mayormente afectados en individuos con X frágil (Agulhon *et al.*, 1999). En cerebro de humanos adultos, FMRP está presente en altas cantidades en neuronas, teniendo una alta expresión en células de Purkinje y en neuronas de la capa granulosa y corteza. La localización de FMRP está confinada únicamente al pericarión. En contraste, en células de la glía y oligodendrocitos, los niveles son muy bajos o nulos (Pacey y Doering, 2007). La ausencia de anomalías neuropatológicas evidentes en fetos con X frágil, sugiere que FMRP no es crucial en los primeros estadios del desarrollo del sistema nervioso (Agulhon *et al.*, 1999).

Mediante análisis en inmunohistoquímicos se ha determinado que FMRP es una proteína citoplasmática (Devys *et al.*, 1993). En el núcleo se halla principalmente en el nucléolo, involucrada en la formación de partículas ribosomales. FMRP se localiza principalmente en polirribosomas libres y en ribosomas de la membrana del retículo endoplasmático asociada a la subunidad ribosomal 60S. Cerca del 85 % de FMRP se halla en actividad de traducción en los polirribosomas, lo que señala un papel de FMRP como una proteína de unión a los RNAm (Feng *et al.*, 1997). La espectrometría de masas y estudios de sitios de mutagénesis dirigida, demuestran que la fosforilación en FMRP ocurre entre los residuos 483 y 521 (Ceman *et al.*, 2003).

## 7.2. Isoformas

Se han identificado 8 isoformas de la proteína FMRP como resultado del empalme alternativo en *FMR1* (ver Cuadro 5):

**Cuadro 5.** Isoformas de FMRP en la que se muestran sus respectivas longitudes y masas atómicas.

Variante	Longitud (aa)	Masa (Da)
Isoforma 1	594	66,971
Isoforma 2	620	70,025
Isoforma 3	603	68,030
Isoforma 4	607	68,445
Isoforma 5	590	66,460
Isoforma 6	632	71,174
Isoforma 7	615	69,179
Isoforma 8	586	66,246

Todas las variantes de las proteínas están ausentes en líneas celulares de individuos con X frágil. Líneas celulares de individuos con premutación expresan FMRP con una masa idéntica a los de la línea control, lo cual indica que los repetidos CGG no se traducen. La traducción comienza en el primer codón de inicio después de los repetidos CGG, en metionina-66 (Devys *et al.*, 1993).

La proporción de las diferentes isoformas en cerebro, testículos, hígado y riñón son similares, y no existe una expresión específica en tejido o estadio celular. Además, presenta altos niveles de expresión de todas sus isoformas en cerebro y testículos, así como bajos niveles de expresión en corazón, esqueleto y músculo abdominal (Verheij *et al.*, 1995).

### 7.3. Dominios estructurales de FMRP

En un principio FMRP no mostró claras homologías con otras proteínas, pero en 1993, Siomi *et al.*, fueron los primeros en reportar la semejanza de FMRP con proteínas de unión a RNA (Siomi *et al.*, 1993) desde entonces, diversos dominios estructurales se han reportado para FMRP:

**A) Caja RGG:** Contiene el triplete Arg-Gly-Gly que ha sido identificado como un sitio altamente específico de interacción a los RNA mensajeros (RNAm). A su vez, los RNAm poseen un sitio de unión denominado cuarteto G, que consta de un conjunto de cuatro purinas que forman una estructura intramolecular denominada *stem-loop* (Darnell *et al.*, 2001). Los RNAm que contienen cuarteto G han sido identificados como potenciales objetivos de FMRP así como de importantes proteínas neurológicas como la Proteína 1B Asociada a Microtúbulos (MAP1B) y semaforina (Miyashiro *et al.*, 2003).

**B) Dos Dominios homólogos K (dominios KH):** Estos dominios se encuentran presentes en el centro y parte terminal C de la proteína junto con la caja RGG. Los dominios KH junto con la caja RGG, se encargan de proporcionar la capacidad de unión a los RNAm. La importancia de estos dominios, fueron descritos en pacientes con X frágil que tenían una mutación puntual en el segundo dominio KH de FMRP, la cual cambia una isoleucina en la posición 304 por una asparagina (De Boulle *et al.*, 1993). Esta mutación altera el plegamiento normal del segundo dominio KH haciendo que la proteína sea incapaz de unirse al RNAm (Siomi *et al.*, 1994) cabe resaltar que ésta fue la única mutación encontrada en pacientes afectados por el síndrome.

**C) Dos Estructuras *Coiled-coil*:** Actúan mediando la interacción proteína-proteína. El primer dominio de esta estructura se encuentra localizado en el exón 7 y está asociado a las interacciones de FMRP con las proteínas FXR1 y FXR2. El segundo

dominio se halla localizado en el exón 14 y está relacionado con la unión de FMRP a los ribosomas (Siomi *et al.*, 1996).

**D) Señal de Localización Nuclear (NLS) y Señal de Exportación Nuclear (NES):** Presentes en la posición 117-118 y 429-438 respectivamente. Se sugiere le otorgan a FMRP la capacidad de transporte dentro y fuera del núcleo, ya que se ha observado a FMRP en el poro nuclear durante la transferencia entre el núcleo y el citoplasma, donde se le ha visto salir del núcleo unido a su RNAm (Feng *et al.*, 1997).

#### **7.4. Transporte y traducción de RNAm**

En 1987, mediante un cultivo de neuronas del hipocampo, Steward *et al.*, demostraron que los RNAm son transportados hacia las dendritas (Davis *et al.*, 1987). Se ha sugerido que la traducción de los mensajeros puede ser regulada en respuesta a un estímulo (Martin y Zukin, 2006). En conjunto, cuando FMRP se encuentra unido a un determinado RNAm (ribonucleoproteína), se le observa como gránulos de RNA que viajan en las ramificaciones dendríticas, a través de microtúbulos. La traducción permanece inactiva hasta que un determinado impulso permite su traducción (De Diego Otero *et al.*, 2002). Hasta el momento no se si sabe si determinados RNAm pueden ser transportados a las dendritas en la ausencia de FMRP.

FMRP cuenta con diferentes sitios de fosforilación. Cuando se encuentra desfosforilada está asociada con actividad de traducción en los polirribosomas, mientras que la fracción fosforilada se haya aparentemente estancada en los polirribosomas. Una rápida desfosforilación de FMRP permite a los RNAm ser traducidos, mientras que la refosforilación de FMRP reprime su traducción (Kim *et al.*, 2008).

#### **7.5. Proteínas con función similar a FMRP**

*FXR1* y *FXR2* son dos genes autosómicos que se encuentran localizados en los sitios 3q28 y 17p13, los cuales codifican a proteínas de 70 a 74 KDa respectivamente. Poseen masas

idénticas y además, contienen dos dominios KH, una caja RGG, señalizaciones de tipo NLS y NES, así como una identidad del 60% a nivel de aminoácidos. Una de las diferencias significativas entre los transcritos es que *FXR1* y *FXR2* no contienen la secuencia de repetidos CGG. Por otra parte, FMRP al igual que las proteínas *FXR1* y *FXR2* se encuentran localizadas principalmente en el citoplasma y están asociadas con la subunidad 60S ribosomal; además, son capaces de formar heteropolímeros u homopolímeros. La secuencia responsable de la unión *FXR-FMRP*, contiene un motivo *coiled-coil* localizado en el exón 7. Se ha visto que células de individuos con X frágil y ratones *Fmr1* KO con pérdida de expresión de FMRP, tienen una expresión normal de las proteínas *FXR1* y *FXR2*, por lo que es poco probable que estos dos genes puedan asumir el papel de FMRP (Siomi *et al.*, 1996).

#### **7.6. Teoría de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR)**

La presencia de una maquinaria de traducción cerca de las conexiones sinápticas, permite a las neuronas una rápida respuesta mediante la traducción local de RNAm. FMRP es sintetizada en respuesta a la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (*mGluR por sus siglas en inglés*) regulando negativamente la traducción de diversos RNAm que codifican a proteínas involucradas en la internalización de los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) AMPA. En la estimulación sináptica, FMRP puede disociarse de éstos RNAm para permitir la traducción y facilitación de la internalización de los receptores AMPA. Se cree que cuando FMRP está ausente, existe una sobreexpresión en la traducción de los RNAm, lo que da como resultado, una perturbación en la internalización de los receptores AMPA. A partir de esto, se ha generado un modelo en el cual, FMRP regula la traducción de estos RNAm a partir de un estímulo de mGluR. A este mecanismo, se le ha denominado, teoría de los receptores metabotrópicos de glutamato, la cual establece que la internalización de los receptores AMPA son provocadas por estimulación de mGluR5, donde se ha visto además, tiene una sobreexpresión en ratones *Fmr1* KO. Dendritas deficientes en FMRP muestran internalización aberrante de los receptores AMPA, lo que lleva a una reducción en el número de receptores AMPA en la membrana

postsináptica (Nakamoto *et al.*, 2007). Dolen *et al.*, llevaron a cabo un experimento en el cual cruzaron ratones Fmr1 KO con ratones a los que se les indujo una reducción del 50 % de la expresión de mGluR5. Como resultado de la reducción de la vía de señalización, hubo un rescate en algunos aspectos fenotípicos, tales como las pruebas Extinción de Evitación Inhibitoria (*IAE por sus siglas en inglés*) y la aparición de crisis audiogénicas (Dolen *et al.*, 2007). La cantidad de receptores AMPA en las membranas postsinápticas se correlaciona con la forma de protrusión, lo cual podría explicar la morfología inmadura de protrusión encontrada en diferentes áreas del cerebro de individuos con X frágil así como en ratones Fmr1 KO (Galvez y Greenough, 2005).

Se cree se puede inducir una reducción de la vía de señalización provocado por un antagonista en mGluR5 y contrarrestar el incremento de la internalización de los receptores AMPA en neuronas de ratones Fmr1 KO. Estudios en ratones Fmr1 KO tratados con MPEC (2-metil-6-(fenil etinil)-clorhidrato de piridina), un antagonista del grupo 1 de receptores de glutamato mGluR5 mostraron mejoras en sensibilidad a crisis audiogénicas y actividad exploratoria en campo abierto en comparación con ratones no tratados (Yan *et al.*, 2005). Ratones tratados con Fenobam (antagonista de mGluR5) tuvieron una mejora en la inhibición prepulso (IPP) incluido MPEC; además de observarse mejoras de la morfología de espinas inmaduras en cultivos de neuronas del hipocampo (De Vrij *et al.*, 2008), en el cual, la geometría de la espina dendrítica es correlacionada con el número de receptores AMPA en la membrana postsináptica. A partir de 2009, Berry-Kravis *et al.*, han iniciado la fase I en pacientes humanos con X frágil utilizando diferentes antagonistas de mGluR5, incluido Fenobam. Hasta el momento, no se han encontrado efectos secundarios por el uso de Fenobam y sólo se ha observado una reducción de la hiperactividad y ansiedad así como una mejora en el 20% de pacientes con IPP (Berry-Kravis *et al.*, 2009).

## 8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

### 8.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Mediante la técnica de PCR (*del inglés Polymerase Chain Reaction*) es posible analizar la región de los tripletes repetidos CGG de *FMR1* en un rango de  $\leq 100$  a 120 repetidos. No obstante, alelos por encima de estos valores, la reacción decae debido que la polimerasa no es capaz de sintetizar regiones con un alto número de CG, como en el caso de individuos con premutación alta y mutación completa. En caso de obtener el fragmento de amplificación esperado, no se considera necesario realizar pruebas adicionales. Pacientes con mosaicismo, pueden arrojar falsos positivos, ya que la PCR puede detectar alelos normales con baja premutación, y decaer en los alelos con alta premutación o con mutación completa (Schmucker y Seidel, 1999).

Existen variantes de la técnica que, mediante el uso de enzimas transcriptasas reversa, es posible llevar a cabo la detección directa del transcrito a partir de la síntesis de cDNA mediante el proceso de transcripción inversa en muestras de RNA de individuos con sospecha de X frágil. A esta variante de la PCR se le conoce con el nombre de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Actualmente se disponen de kits comerciales que llevan a cabo la reacción en uno o dos pasos. En esta última, el cDNA que se sintetiza mediante la transcriptasa inversa (primer paso), sirve como template para llevar a cabo una segunda reacción denominada PCR convencional o PCR en punto final (segundo paso), en la cual, únicamente se amplifica el cDNA correspondiente a *FMR1* mediante el uso de oligonucleótidos o *primers* que reconocen específicamente la secuencia del transcrito convertido a cDNA; en cambio, en los kits de un sólo paso, las reacciones de síntesis de cDNA y amplificación de la secuencia de interés, se llevan a cabo en una sola reacción. La diferencia principal entre estos dos kits es que en éste último, se dispone de un mix de ambas enzimas (transcriptasa reversa y DNA polimerasa) donde la DNA polimerasa se encuentra unida a un anticuerpo que inhibe su actividad a temperatura ambiente; posteriormente, el anticuerpo es desnaturalizado y la actividad de

la polimerasa es restaurada durante el proceso inicial de desnaturalización llevando de este modo, la síntesis de los fragmentos de interés. Una vez obtenidos estos productos, mediante electroforesis, es posible determinar la ausencia o presencia del fragmento amplificado. En caso de observarse el fragmento correspondiente a *FMR1* (con ayuda de un marcador de tamaño molecular) se considera que existe una transcripción activa del gen y por lo tanto, se descarta al individuo con sospecha de X frágil como portador del gen mutado. En caso de no amplificarse el fragmento correspondiente a *FMR1*, se considera al individuo como afectado por el padecimiento y se debe implementar la técnica de hibridación Southern para la confirmación del mismo y detectar portadores en la familia. Cabe aclarar que ésta técnica debe implementarse únicamente en individuos varones, ya que la naturaleza del mosaicismo del cromosoma X en las mujeres, resultaría en la detección de los transcritos de *FMR1* del cromosoma X que no está afectado. En este caso, la solución más apropiada es realizar un análisis Southern para su diagnóstico.

Otra variante de la PCR, permite detectar la metilación en la región promotora en alelos mutados mediante PCR específica de metilación (MSP). Es una opción más (al igual que la RT-PCR) que reducir significativamente el tiempo del diagnóstico.

## **8.2. Southern Blot**

Detecta un aproximado del número de repetidos en todos los estados alélicos de *FMR1* (normal, premutación y mutación completa) así como el estado de metilación de la región promotora mediante el uso de enzimas de restricción apropiadas. Puede ser usado en conjunto con la PCR para precisar aún más el número de repetidos en alelos normales y con baja premutación.

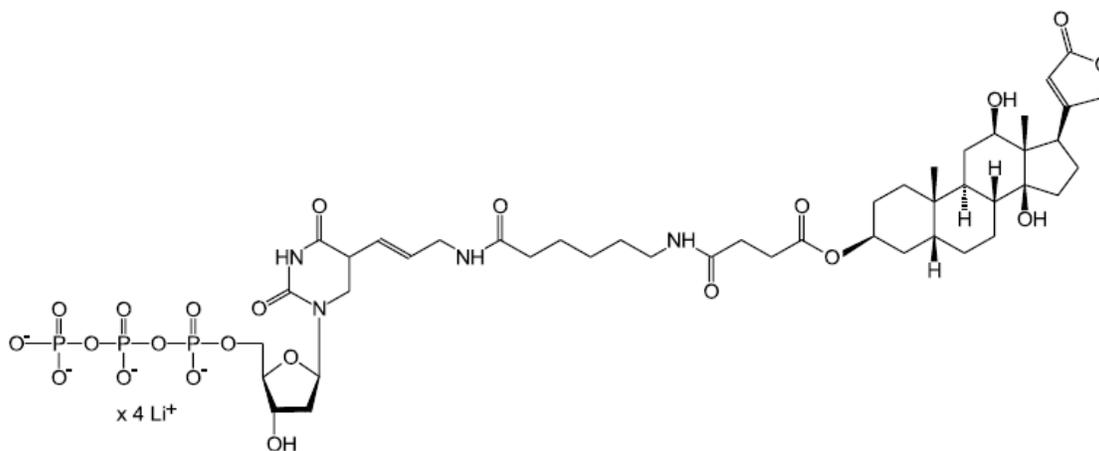
### **8.2.1 Radiactivo**

Se realiza principalmente mediante el marcaje con fósforo radiactivo ( $^{32}\text{P}$ ). Los sistemas isotópicos resultan ser más sensibles y ofrecen una resolución mayor que las sondas marcadas con haptenos. Poseen una fácil detección y la determinación de la eficiencia del

marcaje puede ser estimado rápidamente. La desventaja de este sistema es el peligro inherente de la radiactividad, tiempos de exposición variables, equipo adicional, licencias para su manipulación y la resolución depende del marcaje.

### 8.2.2 No radiactivo

Diferentes métodos no radiactivos han sido introducidos como una posible alternativa a la radiactividad mediante el uso de sondas marcadas con agentes fluorescentes, enzimas, fluorescencia, biotina o digoxigenina (ver Figura 4). Además de su gran potencial de sensibilidad y estabilidad, los sistemas no radiactivos carecen de riesgos para la salud, no requieren de equipos adicionales ni licencia especial para su manipulación y ofrecen la ventaja de que la vida media de las sondas no está determinada por la vida media del isótopo. Los sistemas no radiactivos logran altas sensibilidades en combinación con enzimas adheridas a un anticuerpo o complejos avidina, y substratos quimio-luminiscentes. La mayoría de estos ensayos, utilizan preferencialmente la enzima fosfatasa alcalina debido a su inusual resistencia a condiciones ambientales y estabilidad térmica. Sin embargo, el marcaje no radiactivo se encuentra limitado por su fondo no específico (*background*), causado principalmente por la detección indirecta durante los pasos involucrados. Por esta razón, los métodos no radiactivos no han sido introducidos tan fácilmente en todos los campos de la biología molecular.



**Figura 4.** Digoxigenina-dUTP. La digoxigenina es enlazada en la posición C5 de la uridina mediante un brazo de 11 átomos de carbono.

### **8.3. Análisis de secuencia**

Utilizado para detectar pequeñas deleciones y duplicaciones exónicas así como inserciones e inversiones intragénicas y otras pequeñas alteraciones en *FMR1*. Pocos laboratorios clínicos ofrecen análisis de la secuencia de la región promotora y los 17 exones junto con las regiones intrónicas.

### **8.4. Análisis de hibridación fluorescente *in situ* (FISH)**

Deleciones que no se hallan localizadas en la región de los repetidos pueden pasar desapercibidas durante un ensayo clínico de rutina. Los análisis de hibridación fluorescente *in situ* permiten detectar tales deleciones.

### **8.5. Análisis citogenético**

Actualmente no se encuentra en uso debido a su baja sensibilidad (no toma en cuenta la relación epigenética) y mayor costo que las técnicas moleculares. Utiliza medios de cultivo carentes de ácido fólico para inducir los sitios frágiles. Los porcentajes son muy variables al observar el sitio frágil, raramente se observa más del 50% de los cromosomas, y en las mujeres es significativamente inferior.

### **8.6. Análisis de raíz de cabello**

Consiste en un análisis de inmunohistoquímica para detectar la expresión de FMRP en la raíz del cabello. La principal ventaja de esta técnica es la rapidez y el análisis directo hacia la proteína, independientemente del tipo de mutación asociado en *FMR1*. Puede ser aplicada a individuos con mosaicismo; sin embargo, resulta menos específico para mujeres, debido al proceso de inactivación aleatoria del cromosoma X. Además, mujeres con mutación completa muestran porcentajes de FMRP similares a los encontrados en mujeres control. Por otra parte, el grado de retraso mental no se relaciona con el porcentaje de expresión de la proteína (Willemsen *et al.*, 1999).

## 9. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico del SXF mediante la observación fenotípica y el análisis citogenético, proporcionan un diagnóstico clínico incierto, proclive al diagnóstico de falsos negativos o positivos. Actualmente, las técnicas empleadas en el campo de la biología molecular permiten establecer un diagnóstico certero del síndrome.

Mediante la técnica de RT-PCR es posible determinar la ausencia de los transcritos de *FMR1* en individuos varones con sospecha de X frágil que, aunado con la técnica de Southern blot, permite determinar el número aproximado de copias del triplete CGG, tanto en individuos afectados por el síndrome (hombres y mujeres), como aquellos portadores de la premutación, lo que aumenta significativamente la precisión del diagnóstico.

Sin embargo, el principal problema de los ensayos de hibridación es el empleo de sondas marcadas con radiactividad, cuyos inconvenientes suelen ser la obtención de los permisos para su manipulación así como los riesgos inherentes para la salud y la desventaja de que la vida media de las sondas marcadas dependen de la vida media del isótopo. Es por ello, que los sistemas alternos a la radiactividad (como los basados en quimioluminiscencia a partir de moléculas como la digoxigenina) resultan de gran importancia ya que pueden llegar a reemplazar los sistemas isotópicos de marcaje de sondas.

Por otra parte, la importancia de llevar a cabo un diagnóstico certero de la enfermedad, radica en que el X frágil, al ser considerado como la primera causa de retraso mental hereditario, puede provocar la aparición de individuos afectados en los diferentes miembros de las familias afectadas. De éste modo, mediante asesoramiento genético los integrantes de la familia son informados sobre el riesgo de tener descendientes afectados con X frágil, así como de las diferentes enfermedades asociadas a las alteraciones de *FMR1*; esto, con la colaboración de médicos genetistas, psicólogos y personal capacitado para esta labor.

## **10. OBJETIVOS**

### **10.1 Objetivo general**

Llevar a cabo la detección del Síndrome X Frágil mediante análisis molecular en pacientes con retraso mental de tipo idiopático.

### **10.2 Objetivos particulares**

- 1) Detectar la presencia de transcritos del gen *FMR1* con la técnica de RT-PCR.
- 2) Obtener la secuencia del producto de amplificación de *FMR1* de un paciente con sospecha de X frágil.
- 3) Implementar la técnica de hibridación Southern no radiactivo mediante el marcaje con digoxigenina e inmunodetección.

## **11. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **11.1 Tipo de diseño**

Estudios de casos y controles.

### **11.2 Definición de la población en estudio**

#### **11.2.1 Criterios de selección**

A) Criterios de inclusión:

- Pacientes pediátricos hombres y/o mujeres con diagnóstico clínico de retraso mental idiopático.
- Carta consentimiento firmada por familiar o tutor del paciente.

B) Criterios de exclusión:

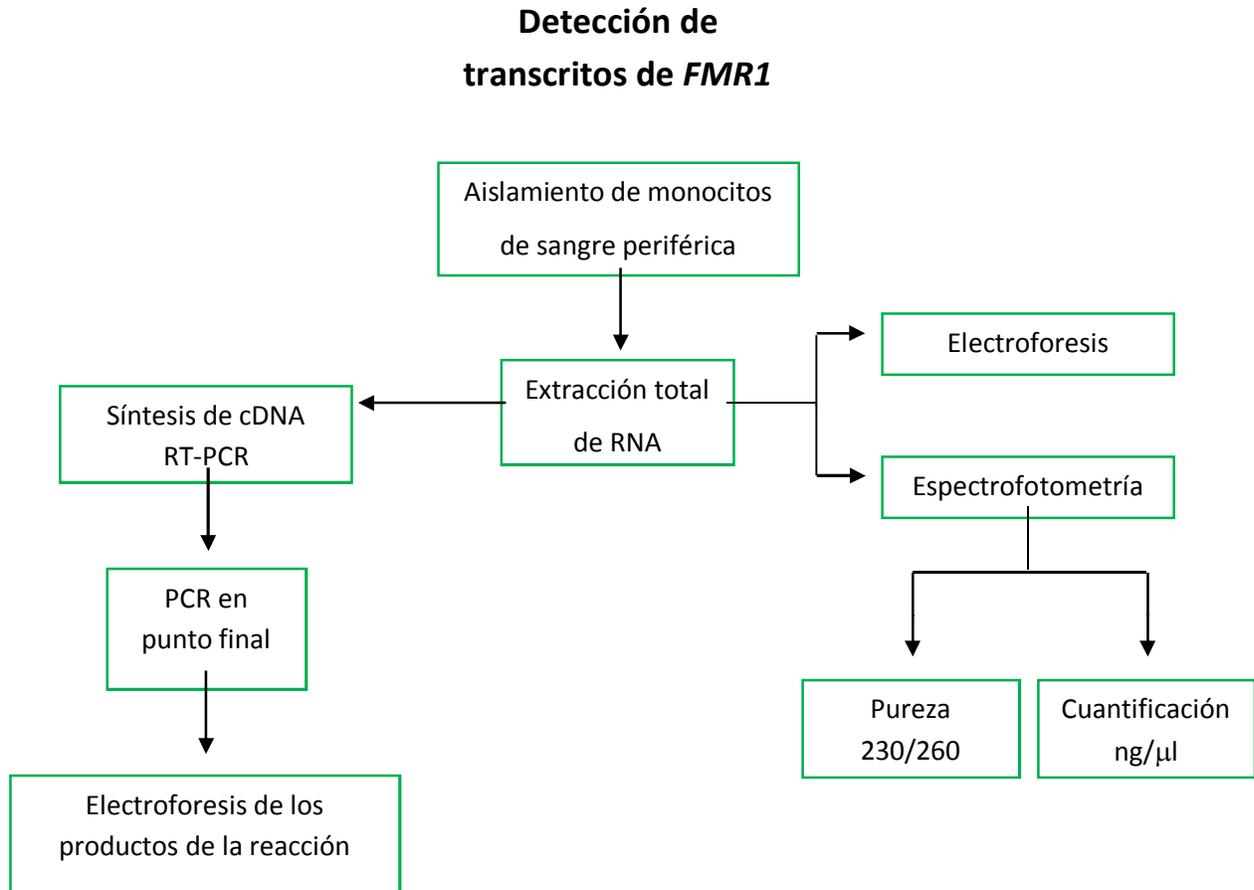
- Pacientes con diagnóstico de retraso mental no idiopático.
- Presencia de enfermedad incapacitante.

C) Criterios de eliminación:

- Abandono voluntario del paciente del protocolo de investigación.
- Confirmación de otro padecimiento distinto a SXF durante el desarrollo del protocolo.

### **11.3 Lugar de realización del estudio**

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.



**Figura 5.** Estrategia de trabajo para el diagnóstico de X frágil mediante la detección de los transcritos de *FMR1* en pacientes varones con retraso mental idiopático.

## Hibridación genómica Southern

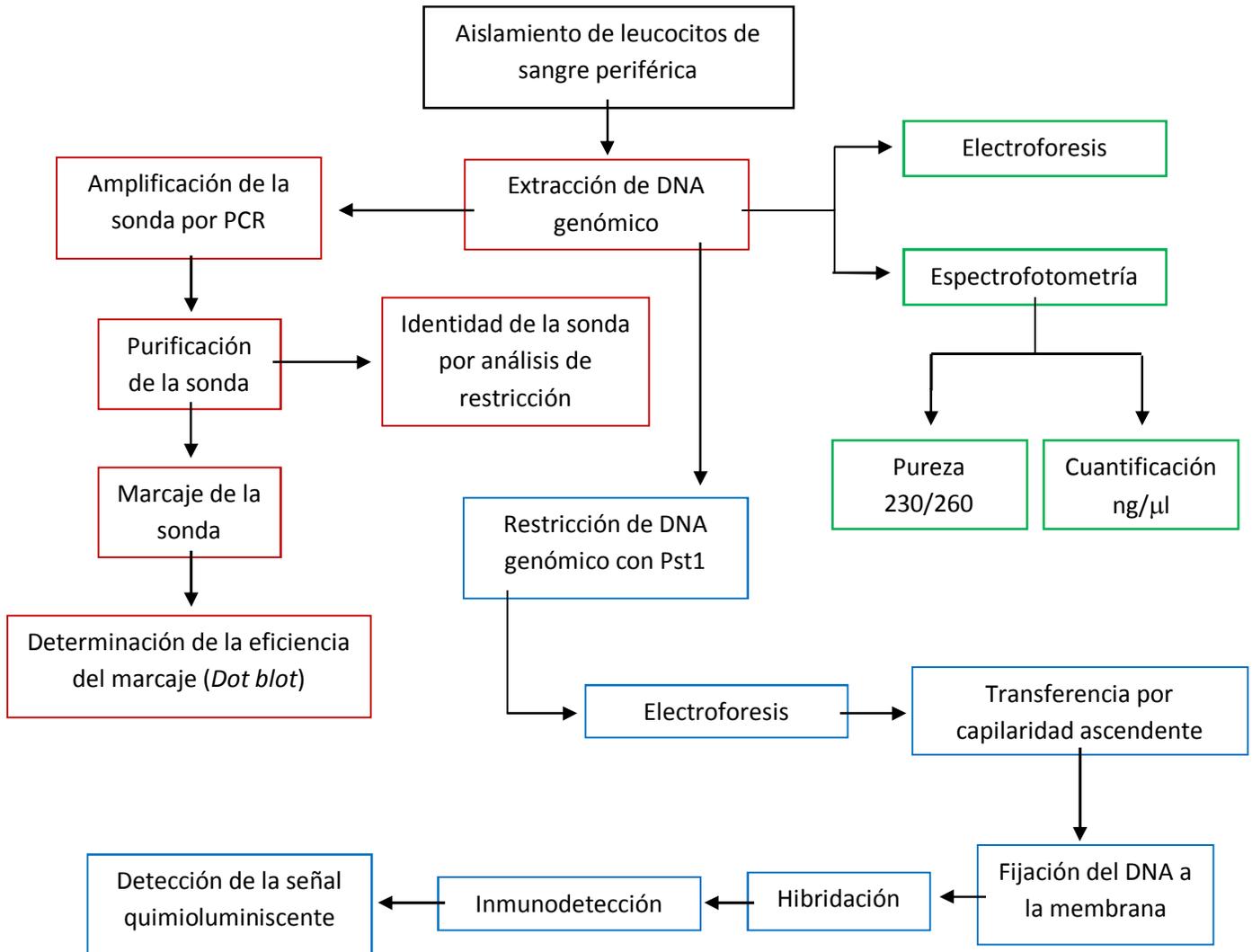


Figura 6. Estrategia de trabajo para la hibridación genómica Southern.

## 11.4. Diagnóstico molecular del SXF

### A. DETECCIÓN DE TRANSCRITOS DEL GEN *FMR1*

#### 1. Extracción de RNA total de monocitos de sangre periférica mediante gradiente de densidad y Trizol (Invitrogen)

Por cada paciente se obtuvieron de 2 a 3 ml de sangre periférica la cual fue depositada en un tubo Vacutainer con EDTA. Posteriormente, en un tubo de ensayo de vidrio se colocaron 6 ml de Ficoll (GE Healthcare) por 3 ml de sangre (2:1), la muestra se centrifugó 35 minutos a 1,344 x *g* en una centrífuga clínica para obtener el gradiente de densidad. A partir éste, se obtuvo la capa blanca de células (monocitos) formadas entre el plasma y el Ficoll, y se colocaron en un tubo Eppendorff estéril de 1.5 ml agregando 1 ml de solución PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.4). La muestra se centrifugó 1 minuto a 12,000 x *g* y se decantó la solución PBS quitando los remanentes con una pipeta. Los monocitos fueron lisados agregando 1 ml de Trizol agitando fuertemente durante 3 minutos y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Una vez terminado el tiempo de incubación se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó durante 15 segundos. Posteriormente, la muestra se incubó 3 minutos a TA y se centrifugó 15 minutos a 12,000 x *g* a 4 °C. Una vez terminada la centrifugación, se aisló la fase acuosa (evitando el contacto con la interfase y la fase orgánica) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregó 500 µl de isopropanol frío (-30°C). La muestra se incubó 10 minutos a -30 ° C y una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó 10 minutos a 12,000 x *g* a 4 °C. Al término de la centrifugación, se decantó el isopropanol y se realizaron dos lavados con etanol al 75% (preparado con agua tratada con dietil-pirocarbonato -DEPC-) agregando 1 ml. La muestra se centrifugó 5 minutos a 7,500 x *g* a 4 °C y al término de cada centrifugación, se decantó el etanol procurando remover totalmente el remanente con una pipeta. Finalmente la muestra de RNA se diluyó en 20 µl de agua en agua libre de nucleasas.

## **2. Determinación de la pureza y cuantificación del RNA total mediante análisis de espectrofotometría**

Para determinar los valores de concentración y pureza, se llevó a cabo la medición a una absorbancia de 260 nm ( $A_{260}$ ) en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific) tomando 1  $\mu$ l de la muestra. El índice de pureza fue obtenido a partir del cociente de 260/280 nm de longitud de onda.

## **3. Verificación de la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa**

Para determinar la integridad del RNA, una alícuota de la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% a 80V durante 90 minutos en buffer TBE 0.5X (Tris base 44.5 mM, Borato 44.5 mM, EDTA 1mM pH 8.0) utilizando 1  $\mu$ l de buffer de carga 6X (30% glicerol, cianol xileno 0.25% y azul de bromofenol 0.25%) y 1  $\mu$ l SYBR Gold (50X) por muestra. Para determinar el tamaño de las subunidades ribosomales, se utilizó marcador de 100 pares bases. Una vez terminada la electroforesis, el gel se visualizó en el fotodocumentador de imágenes Gel Doc XR+ System (BioRad).

## **4. Síntesis del cDNA para la detección de los transcritos de *FMR1* mediante RT-PCR**

La síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) se realizó con el kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). En un primer tubo Eppendorf de 200  $\mu$ l se preparó una solución a volumen final de 10  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O Milli-Q que contenía 250 ng/ $\mu$ l de RNA, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l de oligo (dT)<sub>12-18</sub> y 10 mM mix de dNTP. El tubo se incubó 5 minutos a 65°C e inmediatamente después se colocó en hielo durante 1 minuto. En un segundo tubo, se preparó una solución que contenía 2  $\mu$ l de 10X RT buffer, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M de ditioneitol (DTT) y 40 U de RNasa OUT. El contenido del tubo 2 se colocó en el tubo 1 y la muestra se incubó 2 minutos a 42 °C. Posteriormente, se adicionó 1  $\mu$ l de la enzima SuperScript II RT y la muestra se incubó 50 minutos a 42 °C y 70 °C 15 minutos para detener la reacción. El tubo se enfrió en hielo por al menos 1 minuto y se le agregó 1  $\mu$ l de RNasa H. Finalmente, la muestra se incubó 20 minutos 37 °C.

## 5. Amplificación de los transcritos de *FMR1* y *HPRT* por PCR en punto final

El producto de RT-PCR obtenido en la reacción anterior se utilizó para llevar a cabo la PCR en punto final. Como control interno de la reacción, se utilizó un par de oligonucleótidos del gen constitutivo *HPRT* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) reportados por De Smedt *et al.* (2000) (ver Cuadro 6) cuyo fragmento generado es de 389 pb. Para amplificar el transcrito correspondiente a *FMR1*, se utilizó un par de oligonucleótidos reportados por Pieretti *et al.* (1991) que generan un fragmento de 146 pb.

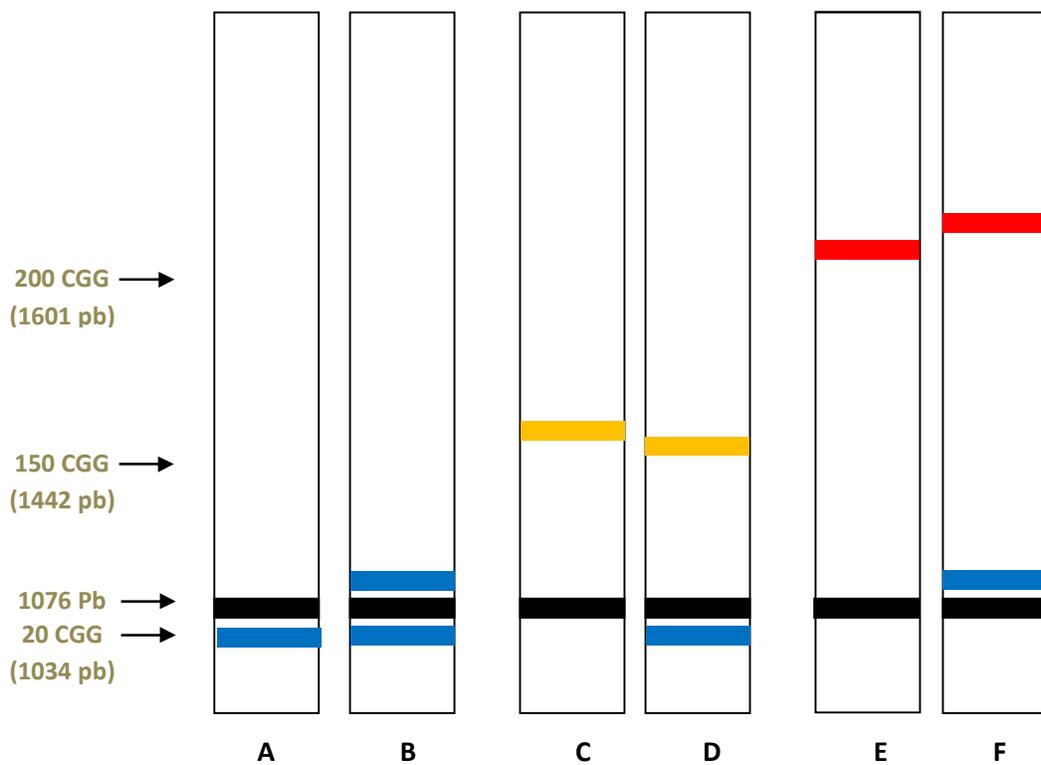
**Cuadro 6.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR en punto final.

<b><i>FMR1</i></b>	5' TAGCTAACCACCAACAGCAAGGC 3'
	5' AACTGGCAGCCTGATAGGCAGATTC 3'
<b><i>HPRT</i></b>	5' AATTATGGACAGGACTGAACGT 3'
	5' CGTGGGGTCCTTTTCACCAGC 3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ l a un volumen final de 20  $\mu$ l. El primer paso consistió en preparar una mezcla de reacción que contenía 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 1.5 mM de  $MgCl_2$  y 0.2 mM de cada dNTP. Posteriormente, se agregó 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido a una concentración de 20 pM cada uno, 2  $\mu$ l de la reacción de RT-PCR y 1.5 U de la enzima *Taq* Platinum. Las condiciones utilizadas para el termociclador consistieron en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación de 94°, 30 segundos; 55°C, 45 segundos y 72 °C, 30 segundos. Al final de estos, se realizó una elongación final de 72°C por 10 minutos. Finalmente, los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones descritas anteriormente. Para determinar el tamaño de los productos se utilizó marcador de 100 pares bases.

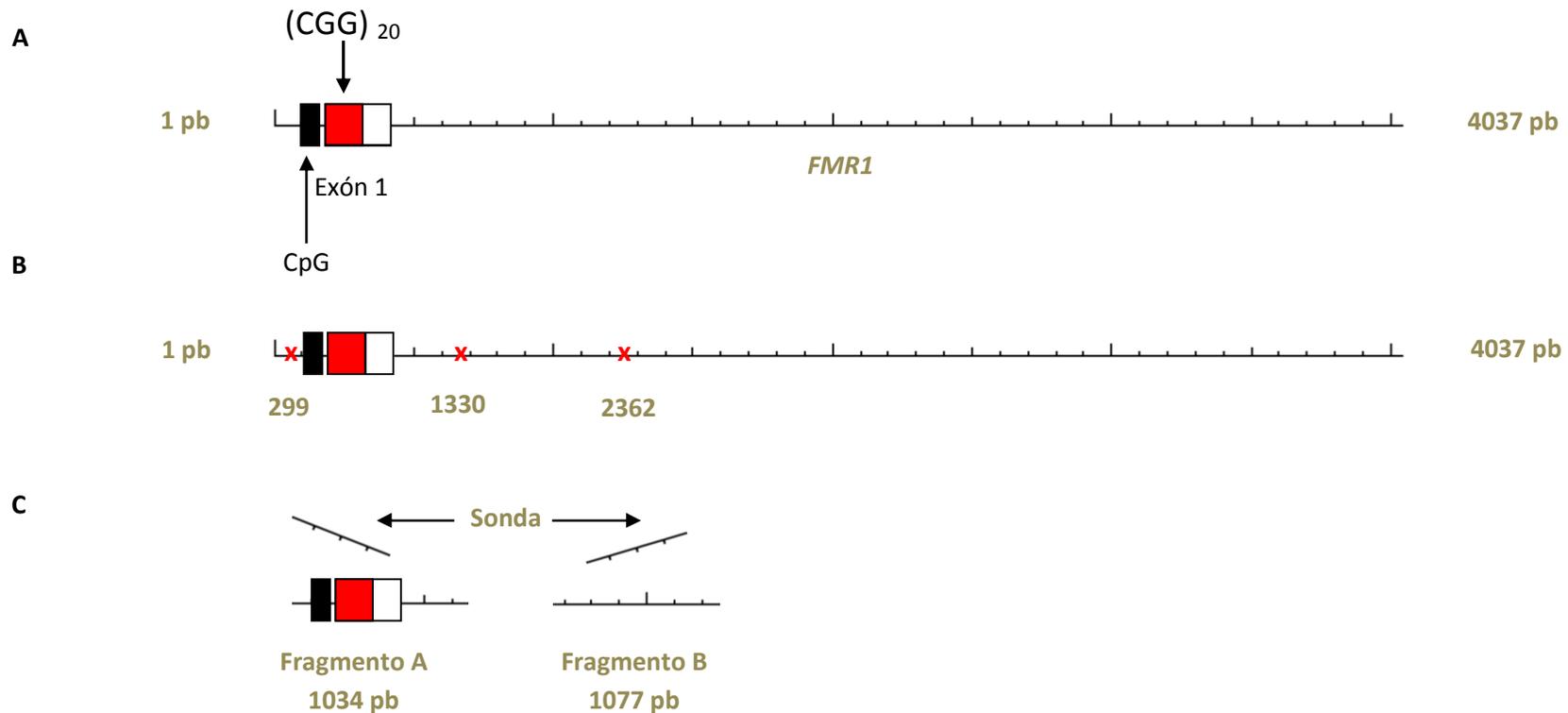
## B. HIBRIDACIÓN SOUTHERN BLOT NO RADIOACTIVO MEDIANTE EL MARCAJE CON DIGOXIGENINA-dUTP

La técnica de hibridación Southern se realizó de acuerdo al protocolo *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche); sin embargo, se llevaron a cabo diversas modificaciones que son descritas en esta sección. Para los ensayos de hibridación se utilizó la sonda reportada por Eiges *et al.* (2007). Los fragmentos de restricción del DNA fueron generados con la enzima Pst1, ésta reconoce la secuencia CTGCAG a lo largo del DNA y no es sensible a la **metilación**. Mediante análisis de restricción, se determinó que la sonda hibrida en dos fragmentos de *FMR1* (ver Figura 7 y 8).



**Figura 7.** Patrón de bandas esperado para la hibridación Southern utilizando la sonda de Eiges *et al.* La banda negra en cada esquema representa un fragmento que comparte secuencia con la sonda y no tiene interés en el diagnóstico. **A.** Varón normal. **B.** Mujer normal heterocigota. **C.** Varón con premutación. **D.** Mujer heterocigota con premutación. **E.** Varón con mutación completa. **F.** Mujer heterocigota con mutación completa.

### Análisis de los sitios de restricción de Pst1 e hibridación de la sonda en *FMR1*



**Figura 8.** Sitios de corte de la enzima Pst1 e hibridación de la sonda. **A.** Representación del exón 1 a lo largo del gen *FMR1* en un individuo con 20 repetidos. **B.** Sitios de reconocimiento de Pst1 (se representan únicamente los 3 primeros con sus respectivas posiciones). **C.** Fragmentos complementarios con la secuencia de la sonda. **Fragmento A:** Contiene la secuencia de los repetidos y varía en cada individuo. **Fragmento B:** Sus primeros 74 nucleótidos guardan complementariedad con la secuencia de la sonda; por lo que ésta es capaz de hibridar en ambos fragmentos. Éste último fragmento se espera siempre del mismo tamaño ya que escapa a la secuencia de los repetidos.

## **1. Extracción de DNA genómico de leucocitos de sangre periférica con el kit *Puregene Blood Core Kit C* (QIAGEN).**

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se colocaron 900  $\mu$ l de solución de lisis RBC y 300  $\mu$ l de sangre. La muestra se agitó durante 30 segundos para lisar los eritrocitos y se dejó incubando durante 1 minuto a TA. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 14,000 x *g* a TA y al término de ésta, se decantó cuidadosamente la solución con las células rojas lisadas y con una pipeta se retiró el remanente de la solución dejando sólo 10  $\mu$ l. El tubo con la muestra se agitó en un vortex durante 1 minuto y la lisis de los leucocitos se llevó a cabo adicionando 300  $\mu$ l de *Cell Lysis Solution* en agitación durante 10 segundos en un vortex. Una vez lisadas las células, se agregó 100  $\mu$ l de *Protein Precipitation Solution* y se agitó en un vortex por 20 segundos hasta que se formó el precipitado. La muestra se centrifugó 2 minutos a 14,000 x *g* a TA y una vez terminado el tiempo de centrifugación, se retiró la solución acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml adicionando un volumen similar de isopropanol frío (-30°C). La muestra se centrifugó nuevamente a 14,000 x *g* 2 minutos a TA y al término ésta, se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Una vez precipitado el DNA se procedió a realizar un lavado con etanol al 75% preparado con agua Milli-Q agregando 500  $\mu$ l a la muestra. El tubo se centrifugó a 14,000 x *g* 3 minutos a TA y al terminar, se decantó el sobrenadante quitando con una pipeta los remanentes del etanol. Finalmente, el DNA se diluyó en un volumen de 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O Milli-Q y se calentó 10 minutos a 65 °C.

La determinación de los valores de pureza y cuantificación del DNA se realizaron de manera similar al procedimiento descrito anteriormente. De igual forma, para determinar la integridad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa (utilizando marcador de 1Kb) bajo las mismas condiciones descritas para el RNA.

## 2. Amplificación de la sonda por PCR en punto final

La secuencia de los oligonucleótidos para la sonda fueron obtenidas del trabajo de Eiges *et al.*, (2007) cuyo fragmento corresponde a 596 pb. Como control interno se utilizó un par de oligonucleótidos para el factor de coagulación de von Willebrand (FvW) que producen un fragmento de 600 pb (ver Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la sonda en la reacción de PCR.

<b>Sonda</b>	F - 5'GCTAGCAGGGCTGAAGAGAA3'
	R - 5'CAGTGGAGCTCTCCGAAGTC3'
<b>FvW</b>	F - 5'GCTAGCAGGGCTGAAGAGAA3'
	R - 5'CAGTGGAGCTCTCCGAAGTC3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un tubo Eppendorf de 200 µl a un volumen final de 20 µl. De manera similar a la descrita anteriormente, el primer paso consistió en preparar una mezcla de reacción que contenía 1X PCR Buffer, 50 mM KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.2 mM de cada dNTP. Posteriormente, se agregó 1 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 20 pM cada uno, 150 ng de DNA genómico de un individuo sano y 1.5 U de la polimerasa *Taq* Platinum. Las condiciones utilizadas para el termociclador consistieron en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación de 94°, 30 segundos; un gradiente de temperatura de 55 a 65 °C con 45 segundos cada uno, y 72 °C, 30 segundos. Al final de estos, se realizó una elongación final de 72°C por 10 minutos. Finalmente, los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones descritas con anterioridad. Para determinar el tamaño de los productos se utilizó marcador de 100 pares bases.

### 3. Purificación de la sonda por extracción fenólica

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se agregó el producto de 10 reacciones de PCR del paso anterior más 1 ml de solución fenol: cloroformo: isoamil (25:24:1). Los productos de amplificación se centrifugaron 5 minutos a 12,000 x *g* a TA. Posteriormente, se obtuvo la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregó 1 ml de solución fenol: cloroformo: isoamil. La muestra se centrifugó nuevamente 5 minutos a 12,000 x *g* a TA y al término de ésta, se obtuvo una vez más la fase acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. La sonda se precipitó agregando un volumen igual de isopropanol frío (-30°C) y se incubó 15 minutos a -30°C. Al término de la incubación, el tubo con la sonda se centrifugó 10 minutos a 12,000 x *g* a TA. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados agregando 1 ml de etanol al 75% (preparado con H<sub>2</sub>O Milli-Q) y centrifugando a 12,000 x *g* a TA por 5 minutos en cada paso. Al término de cada lavado, con una pipeta se removieron los residuos de etanol para finalmente diluir la sonda en un volumen de 20 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

### 4. Análisis de restricción para corroborar la identidad de la sonda

Con el fin de determinar la identidad de la sonda, se buscó un sitio de corte con la enzima de restricción Pst1 (ver Figura 9). Para ello, se obtuvo la secuencia de *FMR1* de la base de datos del *Ensembl* (2012) y se aisló únicamente la secuencia correspondiente a la sonda. Posteriormente, con ayuda del programa *Restriction map*, se introdujo la secuencia de la sonda así como la secuencia de reconocimiento de Pst1 (5' CTGCAG 3' - 3' GACGTC 5') y se encontró un sitio de corte con en el nucleótido 517, por lo que se generan 2 fragmentos: uno de 78 y otro de 517 pb.

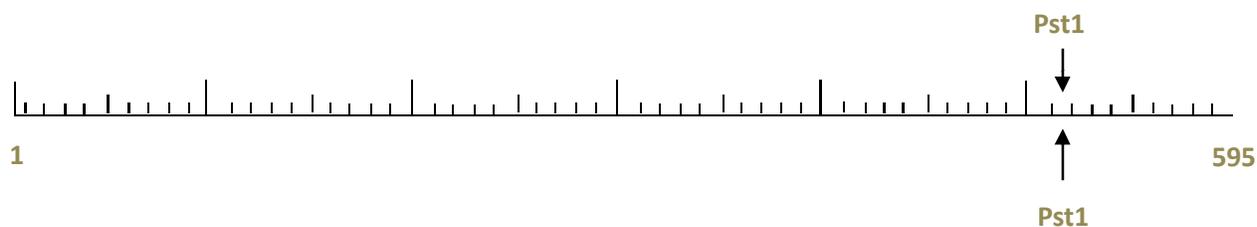


Figura 9. Sitio de corte de Pst1 en la sonda.

Una vez definida la estrategia experimental, se procedió a realizar la restricción de la sonda. Para ello, en un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ l se agregaron 500 ng de la sonda purificada, 1X BufferIII (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9), 5 U de la enzima de restricción y H<sub>2</sub>O Milli-Q necesaria para llevar la reacción a un volumen final de 20  $\mu$ l. La muestra se incubó 4 horas a 37 °C.

Al término de la reacción, los fragmentos de restricción fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

### 5. Marcaje de la sonda con digoxigenina por *random primer*

El marcaje de la sonda con la molécula de digoxigenina, se realizó mediante la técnica de *random primer* usando el kit *DIG High Prime* (Roche) (Ver Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Contenido del mix de marcaje DIG High Prime 5X

1 mM dATP	1 mM dGTP
1 mM dCTP	0.65 mM dTTP
0.35 mM dUTP DIG-11-dUTP	5X random primer mix
1 U/ $\mu$ l polimerasa Klenow	5X Buffer en 50% (v/v) glicerol

La cantidad de sonda a marcar fue de 1  $\mu$ g. Ésta se llevó a un volumen final de 16  $\mu$ l y se desnaturalizó a 95 °C por 5 minutos. Posteriormente, el tubo con la sonda se colocó rápidamente en hielo durante 5 minutos y se le agregaron 4  $\mu$ l de *DIG High Prime*. La reacción de marcaje se llevó a cabo durante 20 horas a 37 °C y se detuvo por calentamiento a 65 °C 10 minutos.

Para determinar la cantidad del producto obtenido, se tomó 1  $\mu$ l de la reacción anterior y se cuantificó mediante espectrofotometría para DNA de cadena sencilla en el espectrofotómetro mencionado anteriormente.

## 6. Determinación de la eficiencia del marcaje de la sonda por *dot blot*

Se realizaron una serie de diluciones del producto de la reacción anterior utilizando buffer de disolución (1 M de Tris pH 7.4., 0.2 M EDTA y 5 µg de DNA de espermatozoos de salmón) (ver Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Serie de diluciones de la reacción de *random primer* para determinar la eficiencia del marcaje. El tubo original (1) corresponde a una disolución de la reacción de marcaje llevada a su concentración final.

Tubo	DNA (µl)	Del tubo #	Buffer de disolución (µl)	Disolución	Concentración final
1		Original	-	-	1 ng/µl
2	5	1	495	1:100	10pg/µl
3	15	2	35	1:3.3	3pg/µl
4	5	2	45	1:10	1pg/µl
5	5	3	45	1:10	0.3pg/µl
6	5	4	45	1:10	0.1 pg/µl
7	5	5	45	1:10	0.03 pg/µl
8	5	6	45	1:10	0.01 pg/µl
9	0	-	50	-	0

Las diluciones obtenidas fueron cargadas en una membrana de nylon **Amersham Hybond<sup>+</sup>** de un tamaño de 3X5 cm utilizando 1 µl de solución de cada tubo. Los puntos de carga fueron fijados en un Crosslinker UVC 500 (Hoefer) a 70,000 µJ/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, la membrana se sumergió en 20 ml de Buffer 1X de Ácido Málico (0.1 M ácido málico, 0.15 M de NaCl pH 7.5) por 2 minutos en agitación constante a TA y en 10 ml de Solución de bloqueo 1X por 30 minutos en agitación constante a TA. La membrana fue sometida a detección de los fragmentos Fab del anticuerpo Anti-DIG durante 30 minutos en agitación constante a TA en 10 ml de solución de anticuerpo 1/10,000. Los lavados de la membrana se realizaron dos veces en 10 ml de Buffer 1X de lavado (0.1 M ácido málico, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) durante 15 minutos en agitación constante a TA y al final de

estos, se sumergió en 10 ml de Buffer 1X de detección (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) por 10 minutos en agitación constante a TA.

La detección de la señal quimioluminiscente se realizó en un casete de revelado. En el interior de éste, se colocó una hoja de acetato y sobre la hoja, la membrana (aún humedecida por el buffer de detección) a la cual se aplicó 0.1 ml de del sustrato **CDP star ready to use**. Inmediatamente, la membrana se cubrió con otra hoja de acetato evitando que se formaran burbujas y se incubó 5 minutos a TA. Dentro de un cuarto oscuro y utilizando luz roja, se colocó un film de rayos x (Kodak) para detectar la señal durante 30 minutos a TA. Después, la placa se sumergió en solución reveladora hasta que la señal esperada se hizo visible. Una vez ocurrido esto, se enjuagó el film en agua y se sumergió en solución fijadora unos segundos.

## **7. Restricción de DNA genómico para generar los fragmentos de hibridación**

Para lograr una restricción total, se llevó a cabo el procedimiento descrito por Sambrook y Russell en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. La reacción se llevó a cabo a un volumen final de 100 µl utilizando 10 U de enzima por cada µg de DNA.

En un tubo Eppendorf de 200 µl se adicionó 10 µg DNA genómico, 1X BufferIII y H<sub>2</sub>O Milli-Q necesaria. La muestra se incubó por 2 horas a 4°C agitando en un vortex cada 20 minutos durante 30 segundos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se agregó la mitad de unidades de enzima requeridas y se incubó a 37°C (temperatura de activación) durante 2 horas. Posteriormente, se agregó la otra mitad de unidades de la enzima y la muestra se dejó incubando por 12 horas a 37°C y a 65°C durante 20 minutos para terminar la reacción. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agregó el volumen de la reacción más 200 µl de etanol absoluto (grado molecular) y se incubó por 20 minutos a -30°C. Después del tiempo de incubación, se centrifugó 10 minutos a 14,000 x g. El tubo con la muestra se decantó para agregarle 1ml de etanol al 75% (preparado con agua Milli-Q) y se centrifugó 5 minutos a 7,500 x g a 4°C. Finalmente, se decantó el etanol y los remanentes

se removieron calentando la muestra a 65°C procurando no secar totalmente la muestra. Los fragmentos de restricción se resuspendieron en un volumen de 20 µl con agua Milli-Q.

### **8. Separación de los fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% con un grosor no mayor a 0.5 cm y una longitud de 20 cm. En el primer y último carril se cargó marcador de 1 Kb y posteriormente las muestras (previamente calentadas a 65 °C 5 minutos). Tanto las muestras como los marcadores se cargaron únicamente con 10 µl de buffer de carga 6X. Las muestras se separaron a 45V durante 18 horas con buffer TBE 0.5X a 4°C en una cámara previamente nivelada. Una vez finalizado el tiempo de migración de los fragmentos, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (5µg/ml) durante 30 minutos. El gel se fotografió en el fotodocumentador de imágenes (Gel Doc XR+ Systemy) bajo luz blanca con una regla a un lado del gel y posteriormente con luz UV por unos instantes (con el fin de no dañar el DNA) hasta que los productos se hicieron visibles. Con un bisturí estéril se removieron las partes no útiles del gel y se sumergió en agua bidestilada.

### **9. Preparación del gel para la transferencia**

El gel se sumergió en un volumen 10 veces mayor de solución despurinizante (0.2N HCl) hasta que los colorantes del buffer de carga cambiaron de color (azul de bromofenol a amarillo y cianol xileno a verde). Una vez que ocurrió esto, se incubó 10 minutos a TA en agitación constante. Posteriormente, se decantó la solución y el gel se enjuagó dos veces con agua bidestilada. La desnaturalización del DNA se produjo sumergiendo dos veces el gel en un volumen 10 veces mayor de solución desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) por 20 minutos en agitación constante a TA. En este paso, los colorantes regresaron a su color inicial. Una vez terminado los tiempos de desnaturalización, se decantó la solución y el gel se enjuagó dos veces con agua bidestilada. Finalmente, se ajustó el pH del gel a un valor cercano a 7.5 sumergiéndolo dos veces en solución neutralizante (1M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl) 30 minutos en agitación constante a TA para el primer tiempo, y 15 minutos para

el segundo tiempo bajo las mismas condiciones. La solución se decantó y el gel se enjuagó dos veces en agua bidestilada.

#### **10. Transferencia neutra de los fragmentos de restricción por capilaridad ascendente**

Una vez realizados los tratamientos al gel, se procedió a montar el sistema de capilaridad ascendente para la transferencia de los fragmentos de DNA a la membrana de nylon Amersham Hybond N+. De ésta, se cortó una pieza con un tamaño aproximado del gel (1 mm mayor) y se colocó en agua bidestilada hasta que descendió. Posteriormente, se sumergió en solución de transferencia SSC 20X (0.3M Citrato de Sodio tribásico, 3M NaCl) por al menos 5 minutos junto con el gel. Se ensambló la base del sistema usando 500 ml de solución de transferencia para una membrana de 100 cm<sup>2</sup> y se forró una placa de vidrio del tamaño aproximado del gel con 2 piezas de papel Whatman de 3 mm previamente impregnadas con la solución de transferencia, a modo que estos quedaran expuestos por los 4 lados. El gel se colocó con los pozos hacia abajo y sobre éste, la membrana de nylon evitando que no se formaran burbujas. Para ello, se deslizó una pipeta sobre ambos para remover las burbujas que hayan quedado atrapadas. Por encima de la membrana, se colocaron 3 piezas de papel Whatman 3mm impregnadas con solución de transferencia del tamaño del gel (evitando la formación de burbujas) y se cubrió con plástico el sistema dejando expuesto únicamente los papeles Whatman. Sobre estos, se colocaron 5 cm de toallas absorbentes y encima de estas, una placa de vidrio más un peso adicional de 750 g. El tiempo de transferencia fue de 20 a 24 horas, una vez concluido se desmanteló el sistema cuidadosamente y, antes de separar la membrana del gel, se marcó la ubicación de los pozos con un lápiz. El gel se sumergió nuevamente en la solución de bromuro de etidio durante 30 minutos y se visualizó en el fotodocumentador para corroborar la transferencia. El DNA se fijó a la membrana mediante un el Crosslinker UVC 500 a 70,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ . Posteriormente se sumergió en solución SSC 2X para remover los restos de agarosa y el exceso de sales de la solución. La membrana se sumergió en agua bidestilada dos veces brevemente y se dejó secando a temperatura ambiente durante 20 minutos.

## 11. Prehibridación

La temperatura de hibridación (Thyb) se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - (600/L)$$

L = Longitud de la hibridación en pares de bases

$$\text{Thyb} = T_m - (20^\circ \text{ a } 25^\circ\text{C})$$

$$T_m = 49.82 + 0.41 (64.5) - (600/596) \rightarrow T_m = 49.82 + 26.445 - 1.007$$

$$T_m = 75.265$$

$$\text{Thyb} = 75.265 - (20^\circ \text{ a } 25^\circ\text{C}) \rightarrow \text{Thyb} = 75.265 - 20^\circ\text{C} = 55.265$$

$$\rightarrow \text{Thyb} = 75.265 - 25^\circ\text{C} = 50.265$$

$$\text{Thyb} = 50.265 \text{ a } 55.265^\circ\text{C}$$

Para asegurar una mayor especificidad de la sonda, se utilizó la Thyb a 55 °C. Asimismo, se determinó la cantidad necesaria de DIG Easy Hyb (solución de prehibridación) para los ensayos de prehibridación e hibridación de acuerdo al siguiente criterio:

- 10 ml de DIG Easy Hyb para una membrana de 100 cm<sup>2</sup> (10 x 10).
- 3.5 ml de DIG Easy Hyb para una membrana de 100 cm<sup>2</sup>.

Una vez establecidos los volúmenes requerido de DIG Easy hyb, se calentó a Thyb hasta alcanzar la temperatura correcta. La solución se vertió dentro de una bolsa de hibridación con la membrana dentro y con una máquina selladora de bolsas se delimitaron los bordes de la membrana a modo que quedara del tamaño de la misma. La membrana se incubó a Thyb durante 30 minutos.

## **12. Hibridación de la sonda a los fragmentos de restricción**

El primer paso de la hibridación consistió en determinar la cantidad de sonda necesaria, de acuerdo a lo siguiente:

- 25 ng de sonda marcada por 1ml de DIG Easy Hyb

Una vez definida la cantidad de sonda necesaria, en un tubo Eppendorf de 200  $\mu$ l se colocaron 100  $\mu$ l de DIG Easy Hyb más el volumen requerido de sonda. Éste se calentó a 95 °C durante 5 minutos y enfrió rápidamente en hielo por al menos 1 minuto. Una vez terminado el tiempo de prehibridación, se cortó la bolsa de hibridación y se decantó la solución. Posteriormente, se agregó la sonda a la solución restante de DIG Easy Hyb (3.5 ml) para formar la solución de hibridación y se adicionó a la membrana dentro de la bolsa de hibridación. Antes de sellar la bolsa, se retiraron las burbujas formadas dentro. La membrana con la solución de hibridación se incubó a Thyb durante 18 horas en una incubadora de hibridación con agitación constante.

## **13. Lavados astringentes para la remoción de uniones inespecíficas**

Al terminar el tiempo de hibridación, se abrió la bolsa y se retiró la membrana para colocarla en un recipiente con la solución astringente 1 (SSC 2X, SDS 1%). La solución de hibridación se desechó y la membrana se incubó dos veces 5 minutos a TA en 250 ml de solución. Posteriormente, la membrana se depositó en un contenedor apropiado con solución astringente 2 (SSC 0.5X, SDS 1%) y se incubó en agitación constante dos veces 20 minutos a 68°C. Al término, la membrana se enjuagó 2 veces con agua bidestilada.

## **14. Inmunodetección de la molécula de digoxigenina por los fragmentos Fab**

La membrana se colocó en un recipiente con 100 ml de buffer de lavado 1X durante 3 minutos en agitación constante a TA. Se decantó la solución y se enjuagó 2 veces con agua bidestilada. Para bloquear la unión del anticuerpo a sitios inespecíficos de la membrana, se agregó 100 ml de solución de bloqueo 1X durante 30 minutos, en agitación constante a TA. Al término de ésta, se decantó la solución bloqueadora y se agregó 20 ml de solución

de anticuerpo para llevar a cabo la inmunidetección. La membrana se incubó 30 minutos en agitación constante a TA. Posteriormente, se decantó la solución de anticuerpo y se enjuagó dos veces con agua bidestilada. Se realizaron dos lavados con buffer de lavado 1X durante 15 y 30 minutos respectivamente, en agitación constante a TA. Una vez llevado a cabo los tiempos de lavados, se decantó la solución y se enjuagó 2 veces con agua bidestilada. La membrana se sumergió en 20 ml de buffer de detección por 4 minutos en agitación constante a TA y al término se decantó la solución. En un casete de revelado, se colocó la membrana lado arriba sobre una hoja de acetato y se aplicó 0.5 ml del sustrato CDP star *ready to use*; inmediatamente después, se colocó otra placa de acetato a modo que esta expandiera el sustrato a lo largo y ancho de la membrana procurando remover con una gasa exceso de la solución. La membrana se incubó 10 minutos a TA y al término de este tiempo, en un cuarto oscuro con luz roja, se colocó sobre el acetato una placa de revelado y se dejó exponer durante 20 a 30 minutos. La placa se retiró del casete de revelado y se sumergió en solución de revelado hasta que la señal fue visible. Finalmente, se sumergió en agua y después en solución fijadora.

## 12. RESULTADOS

### A. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SXF EN VARONES

#### 12.1 Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de RNA total

Un total de 21 pacientes varones en edad pediátrica fueron referidos para el diagnóstico del SXF mediante la detección de transcritos del gen *FMR1*. Las muestras de RNA total aisladas de leucocitos mostraron íntegras las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S (ver Figuras 10-14).

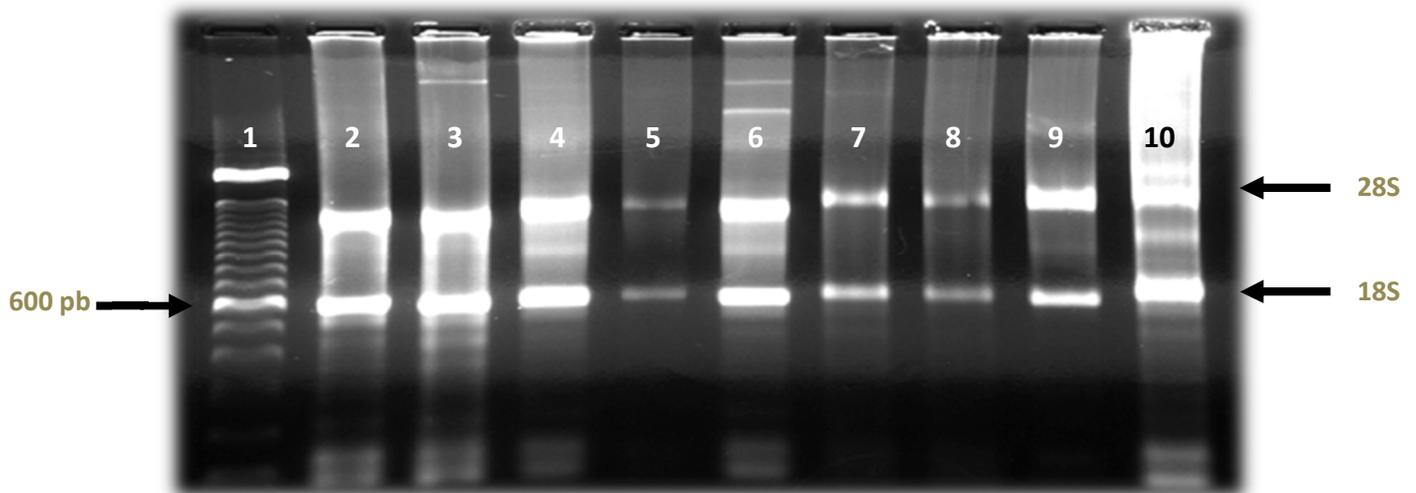


Figura 10. Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-10: RNA total de los pacientes 1-9 utilizados para la RT-PCR.

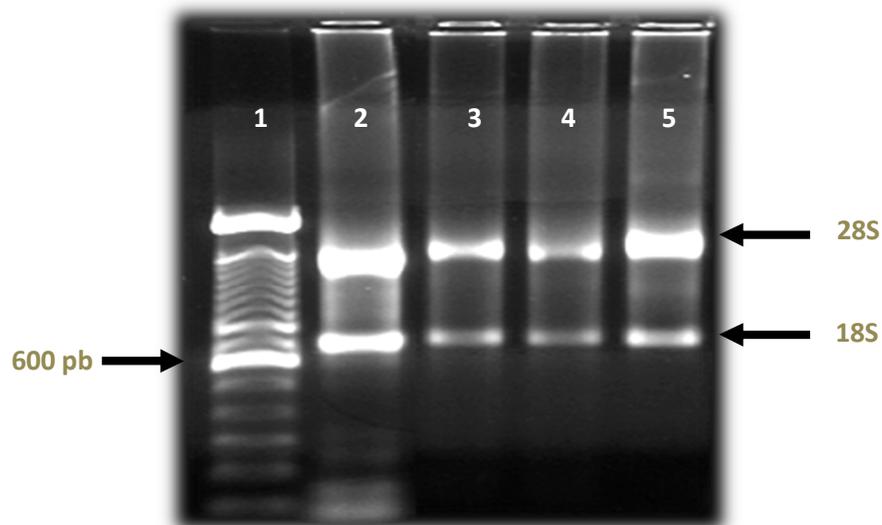
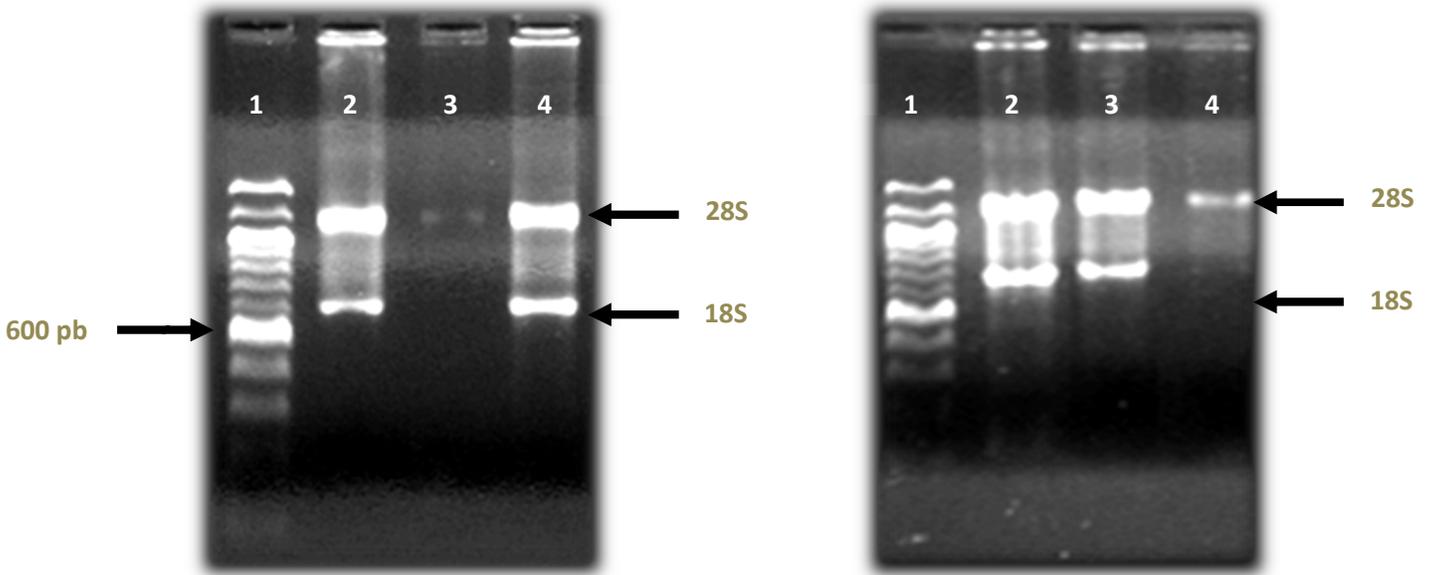
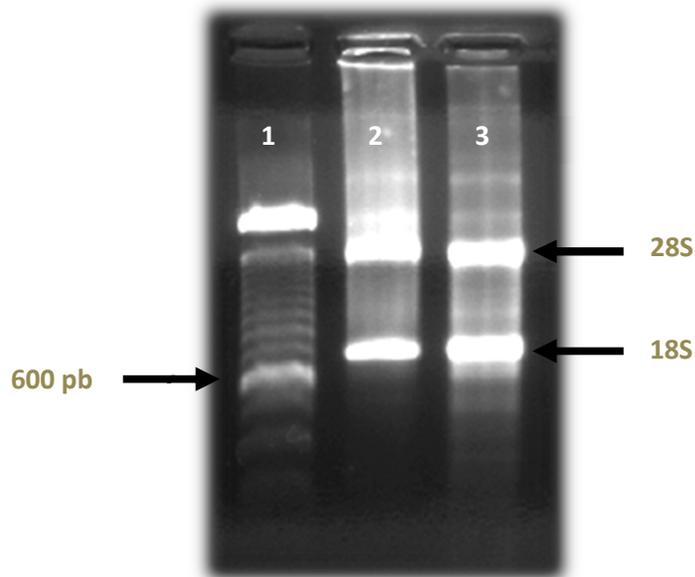


Figura 11. Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-5: RNA total de los pacientes 10-13 utilizados para la RT-PCR.



**Figura 12.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-4: RNA total de los pacientes 14-16 utilizados para la RT-PCR. **Figura 13.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2- 4: RNA total de los pacientes 17-19 utilizados para la RT-PCR.



**Figura 14.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2 y 3: RNA total de los pacientes 20 y 21 utilizados para la RT-PCR.

## 12.2 Análisis de espectrofotometría de las muestras de DNA total

Los índices de pureza de la relación 260/280 para las muestras de RNA se consideran óptimos dentro de un rango de 1.8 a 2.0, por lo que la mayoría de las muestras se encuentran en un valor aceptable. Por el contrario, en aquellas cuyo índice fue inferior a 1.8 se vio reflejado sólo para las muestras donde se obtuvo poca disponibilidad de sangre periférica para su procesamiento (Ver Cuadro 10).

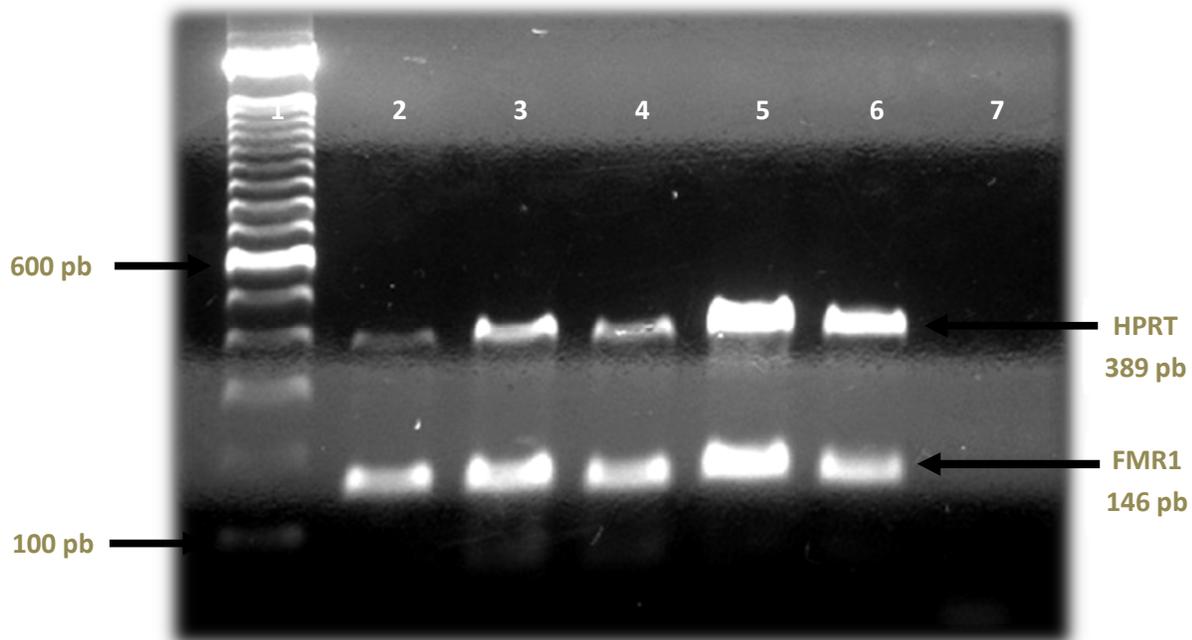
**Cuadro 10.** Valores de concentración y pureza de las muestras de RNA.

Muestra	Concentración (ng/μl)	A 260/280
1	406.7	1.88
2	459.1	1.89
3	672.7	1.89
4	111.9	1.96
5	551.2	1.87
6	339	1.81
7	302.6	1.94
8	524.3	1.93
9	59.1	1.82
10	534	1.93
11	262.9	1.88
12	256.7	1.89
13	411	1.91
14	343.3	1.89
15	64.1	1.74
16	391.1	1.98
17	389	1.97
18	314.6	1.86
19	41.2	1.79
20	655.8	1.88
21	745.5	1.87

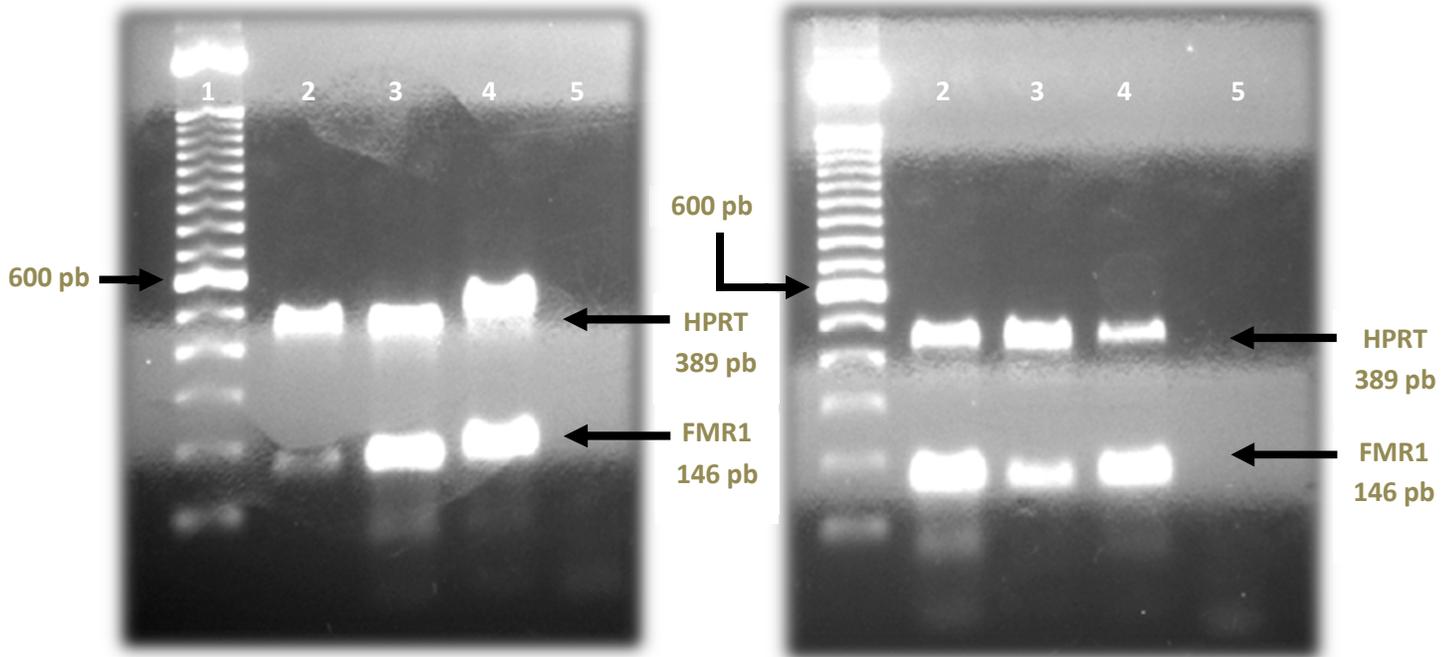
### 12.3 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR

El análisis de los productos obtenidos de la reacción de amplificación del cDNA, mostró en todos los casos, un fragmento de 146 pb correspondiente a *FMR1*, por lo que ninguno de los 21 pacientes resultó positivo a X frágil. De igual modo, el control interno de la reacción (*HPRT*) fue amplificado, mostrando en todos los casos, un producto de amplificación de 389 pb (ver Figuras 15-21). Sin embargo, la migración de los productos de amplificación fueron afectados en algunos casos durante la electroforesis (esta discordancia es abordada en el apartado de discusión).

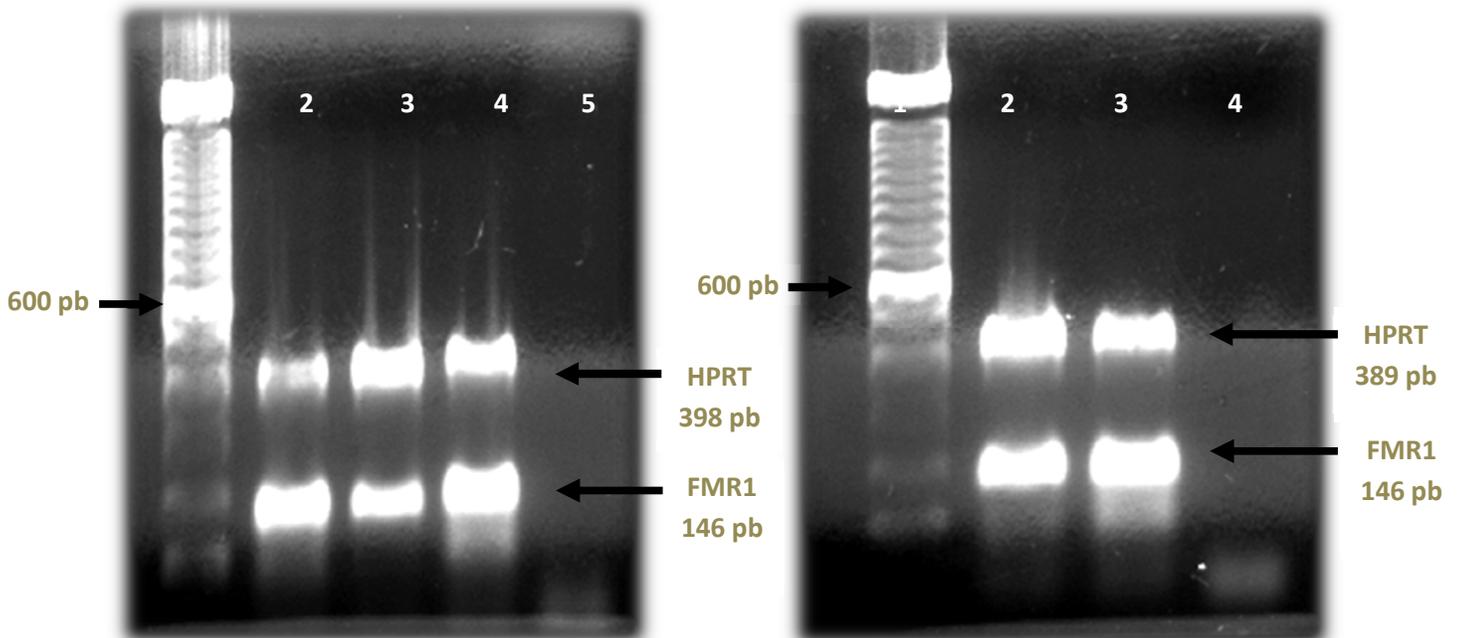
Para validar los resultados obtenidos, en cada ensayo se preparó un control negativo para descartar contaminación en los reactivos. Éste consistió en un tubo con todos los componentes de la reacción, a excepción del cDNA y fue sometido bajo las mismas condiciones de amplificación. En todos los casos, los carriles correspondientes a los controles se mostraron limpios.



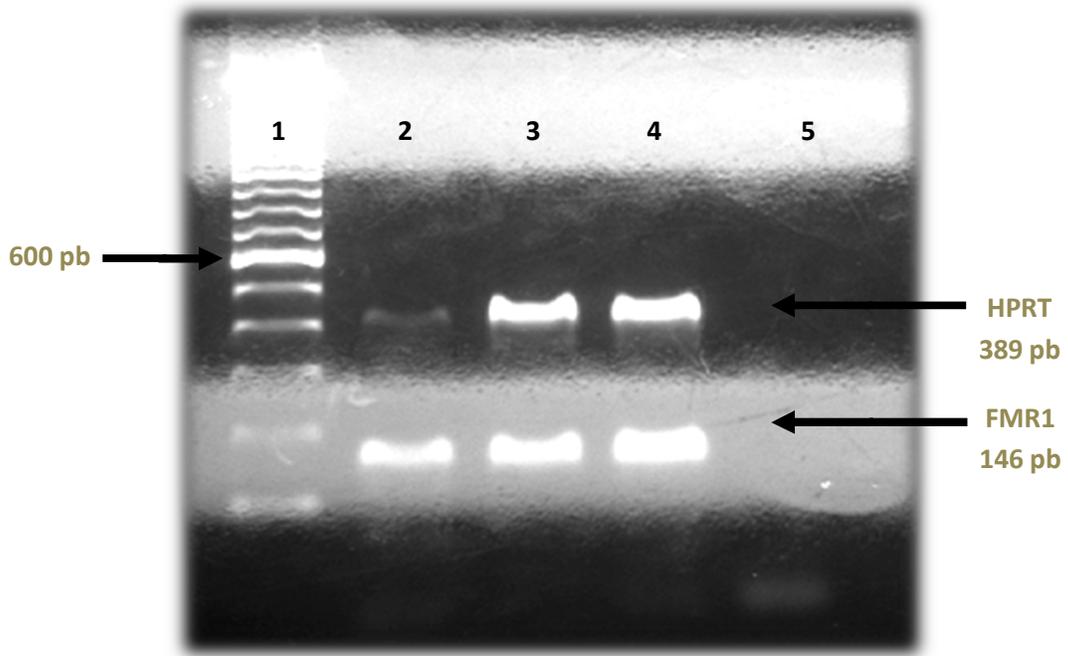
**Figura 15.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-6: amplicones de los pacientes 1-5, carril 7: control negativo.



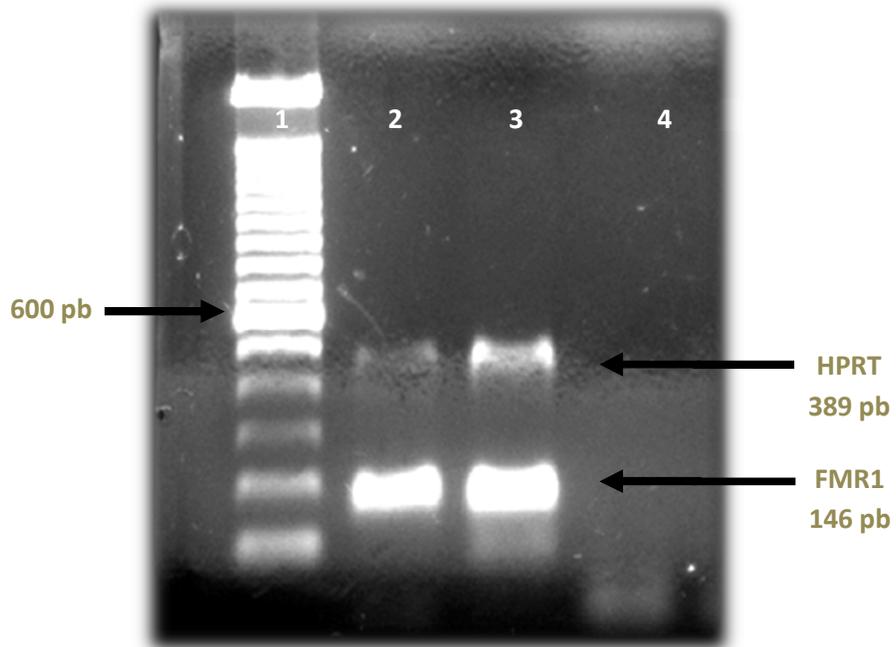
**Figura. 16** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-4: amplicones de los pacientes 6-8, carril 5: control negativo; **Figura 17.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-4: amplicones de los pacientes 9-11, carril 5: control negativo.



**Figura. 18** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-4: amplicones de los pacientes 12-14, carril 5: control negativo; **Figura 19.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2 y 3: amplicones de los pacientes 15 y 16, carril 5: control negativo.



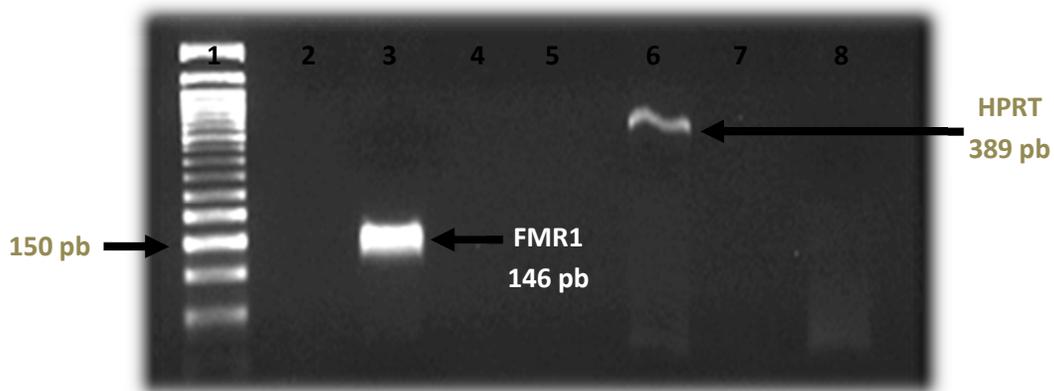
**Figura 20.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2-4: amplicones de los pacientes 17-19, carril 5: control negativo.



**Figura 21.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2 y 3: amplicones de los pacientes 20-21, carril 4: control negativo.

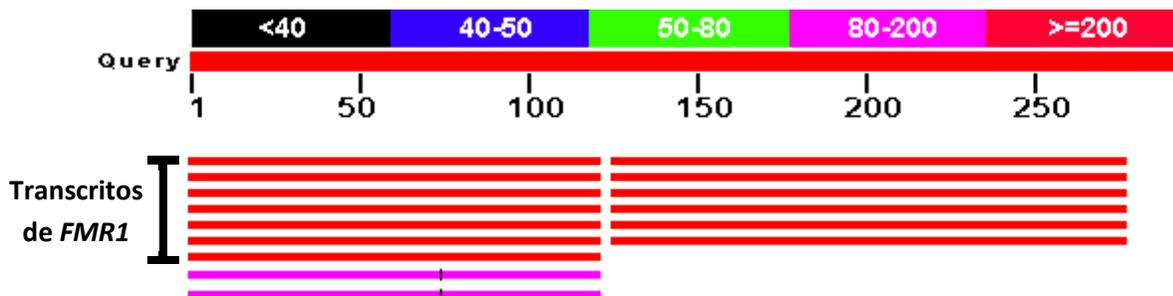
## 12.4 Secuenciación del producto de PCR de *FMR1* de un paciente con sospecha de X frágil

Para asegurar que el transcrito amplificado mediante PCR correspondía con el fragmento esperado, el producto de amplificación un paciente con fenotipo de X frágil fue secuenciado en el servicio de secuenciación de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, utilizando únicamente los oligonucleótidos correspondientes a *FMR1*. Como el fragmento correspondiente a *FMR1* presentó sólo una banda, se consideró adecuado para su secuenciación (ver Figura 22).



**Figura 22.** Carril 1: Marcador de 50 pb, carril 2: vacío, carril 3: Amplicón secuenciado correspondiente a *FMR1* del paciente 1 carril 4 y 5: vacíos, carril 6 amplicón de *HPRT*, carril 7: vacío, carril 8: control negativo.

La secuencia del amplicón permitió confirmar que los productos obtenidos corresponden a 7 diferentes transcritos de *FMR1* (ver Figura 23 y Cuadro 11). En todos los casos se obtuvo un valor de  $E = 6e-56$  con una identidad máxima del 100%.



**Figura 23.** Alineamiento de la secuencia del amplicón de *FMR1* usando el programa *Basic Local Alignment Search Tool* del NCBI.

**Cuadro 11.** Secuencia del amplicón obtenida tras el análisis de secuenciación.

---

***FMR1***

---

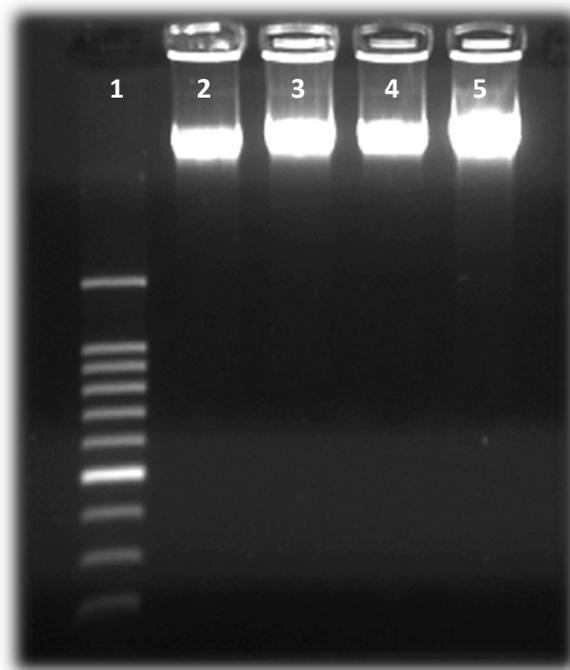
5'CATTTCATGATGTCAGATTCCACCTCCTGTAGGTTATAATAAAGATATAAATGAAAGTGATGAAGTTG  
AGGTGTATTCCAGAGCAAATGAAAAAGAGCCTTGCTGTTGGTGGTTAGCTAACGCAAAGAATCCTCCC  
ACCTCATGCCTTTTTTTTTTTCTGATGCAGGGAATTAGTTTTCTTGCCTCTTTAAGAGGCCAATGCAAAAA  
AGGGTAGAAAAAGCCCTAGCCCAGGAGTTGGGATTGCCAGTTGTAGTCCCTGGGTTG 3'

---

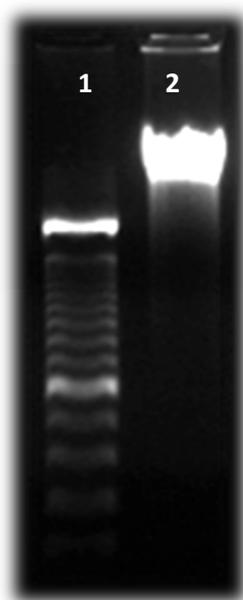
**B. HIBRIDACIÓN SOUTHERN NO RADICATIVO**

**12.5 Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de DNA genómico**

Las imágenes de los geles de agarosa mostraron las bandas de DNA genómico íntegro (ver Figuras 24 y 25).



**Fig. 24** Muestras de DNA genómico utilizados para el ensayo de hibridación **Carril 1:** Marcador de 1 Kb, **carril 2 y 3:** varón y mujer sanos, **carril 4:** varón control (paciente 20 -no X frágil-) **5:** mujer con sospecha de SXF.



**Fig. 25 Carril 1:** Marcador de 100 Kb, **carril 2:** ADN genómico de un individuo varón sano utilizado para la síntesis de la sonda.

### 12.6 Análisis de espectrofotometría de las muestras de RNA total

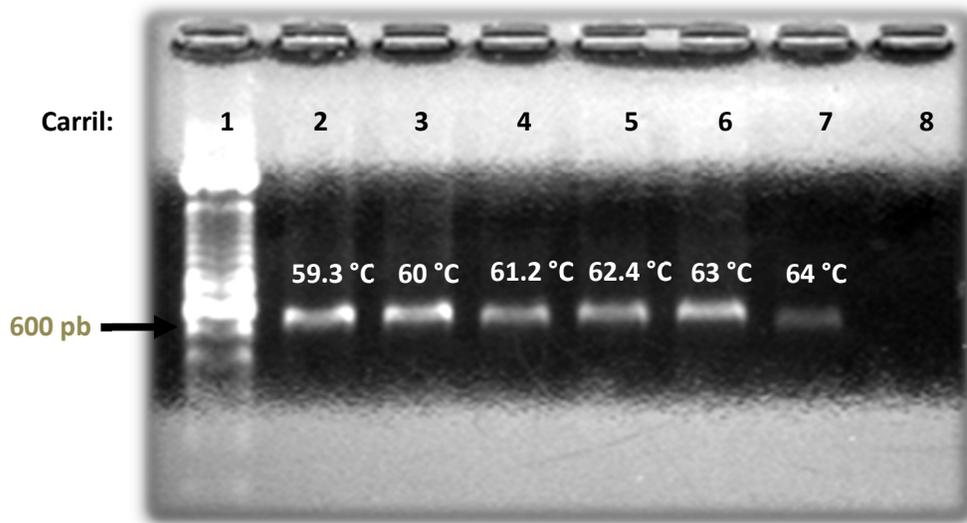
Las muestras de DNA presentaron valores superiores a 1.8 de la relación 260/280, por lo que su índice de pureza fue apropiado para realizar la amplificación de la sonda y los ensayos de hibridación (ver Cuadro 12). La muestra 1 corresponde al DNA de un individuo sano utilizado para la amplificación de la sonda por PCR, las muestras 2 -4 corresponden al DNA de los individuos control (sanos) y la muestra 5 a la paciente mujer con sospecha de X frágil.

**Cuadro 12.** Valores de concentración y pureza de las muestras de DNA.

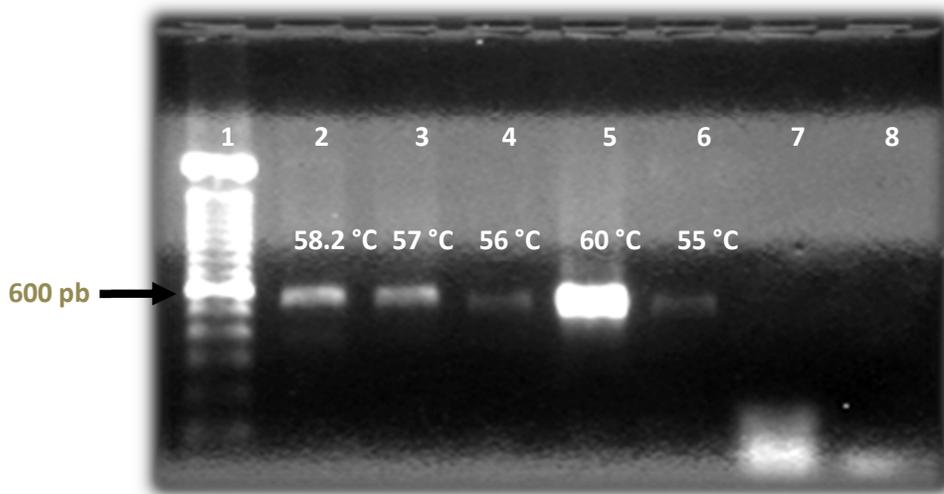
Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ l)	A 260/280
1	456.8	1.89
2	389.3	1.91
3	654.1	1.87
4	445	1.87
5	491.4	1.89

### 12.7 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la síntesis de la sonda

Para determinar la temperatura de alineamiento óptima, se realizó un gradiente en un rango de 56 a 64 °C (ver Figura 26 y 27). La temperatura de 60°C resultó con mejor rendimiento, por lo que fue utilizada para las reacciones posteriores. De igual de forma, se determinó la  $T_M$  de los iniciadores del gen constitutivo únicamente a 55 y 60 °C, resultando óptimo 60°C.



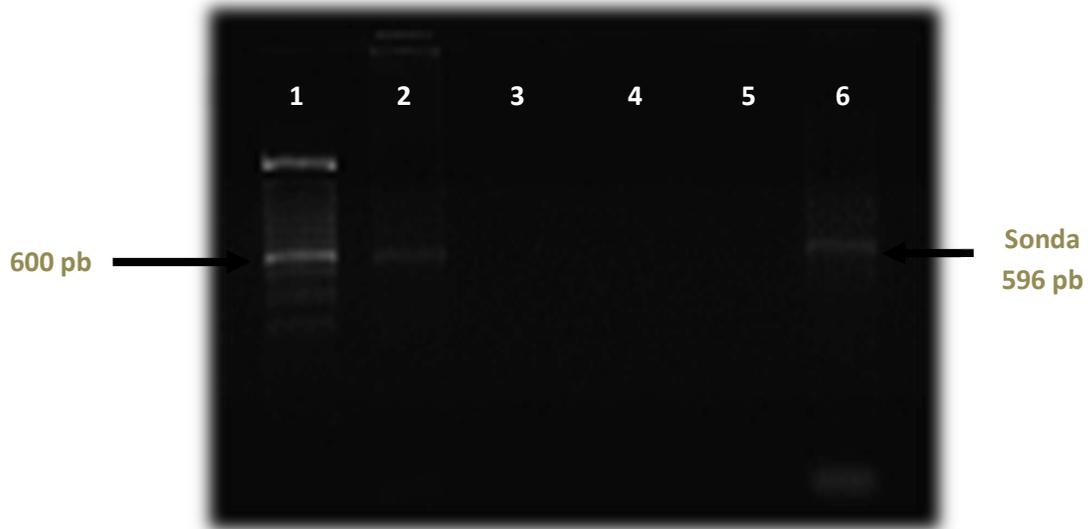
**Figura 26.** Gradiente de  $T_M$ . **Carril 1:** marcador de 100 pb, **carril 2-7:** amplicón sonda, **carril 8:** blanco.



**Figura 27.** Gradiente de  $T_M$  **Carril 1:** marcador de 100 pb, **carril 2-4:** amplicón sonda, **carril 5 y 6:** amplicón constitutivo, **carril 8 y 7:** blanco constitutivo y sonda respectivamente.

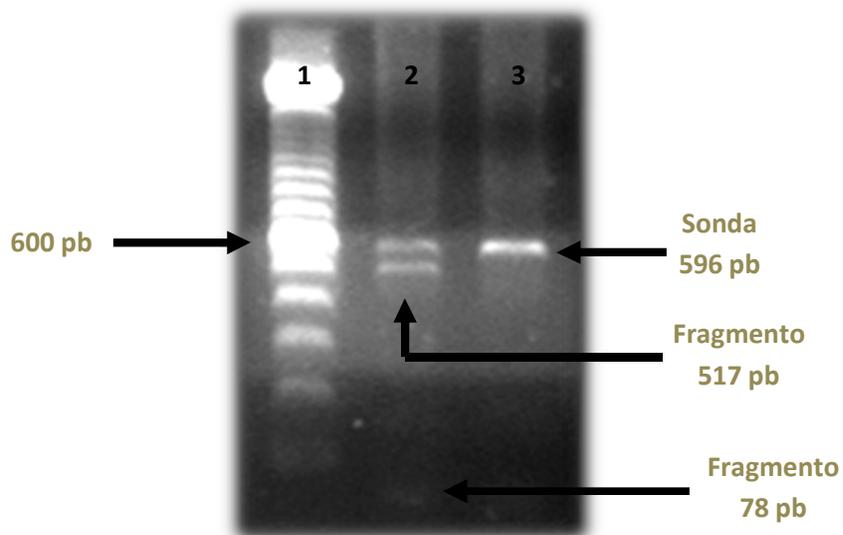
### 12.8 Purificación y análisis de identidad de la sonda

La purificación permitió remover los componentes de la reacción anterior, a fin de evitar problemas en la reacción de marcaje, restricción y fondo oscuro (ver Figura 28).



**Figura 28.** Carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2: sonda purificada, carril 3-5: vacíos, carril 6: sonda sin purificar.

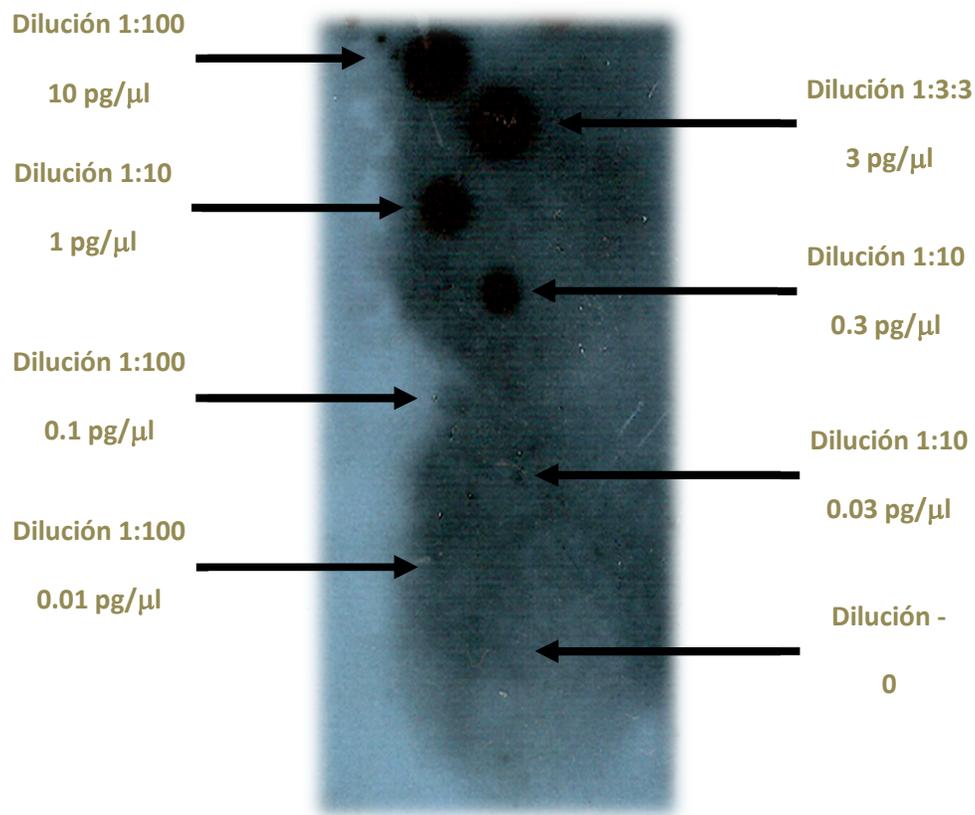
El corte producido con análisis la enzima Pst1 permitió determinar que producto de amplificación correspondía con la sonda (ver Figura 29).



**Figura 29.** Carril 1: marcador de 100 pb, carril 2: restricción de sonda con Pst1, carril 3: sonda sin cortar.

### 12.9 Determinación de la eficiencia de marcaje de la sonda

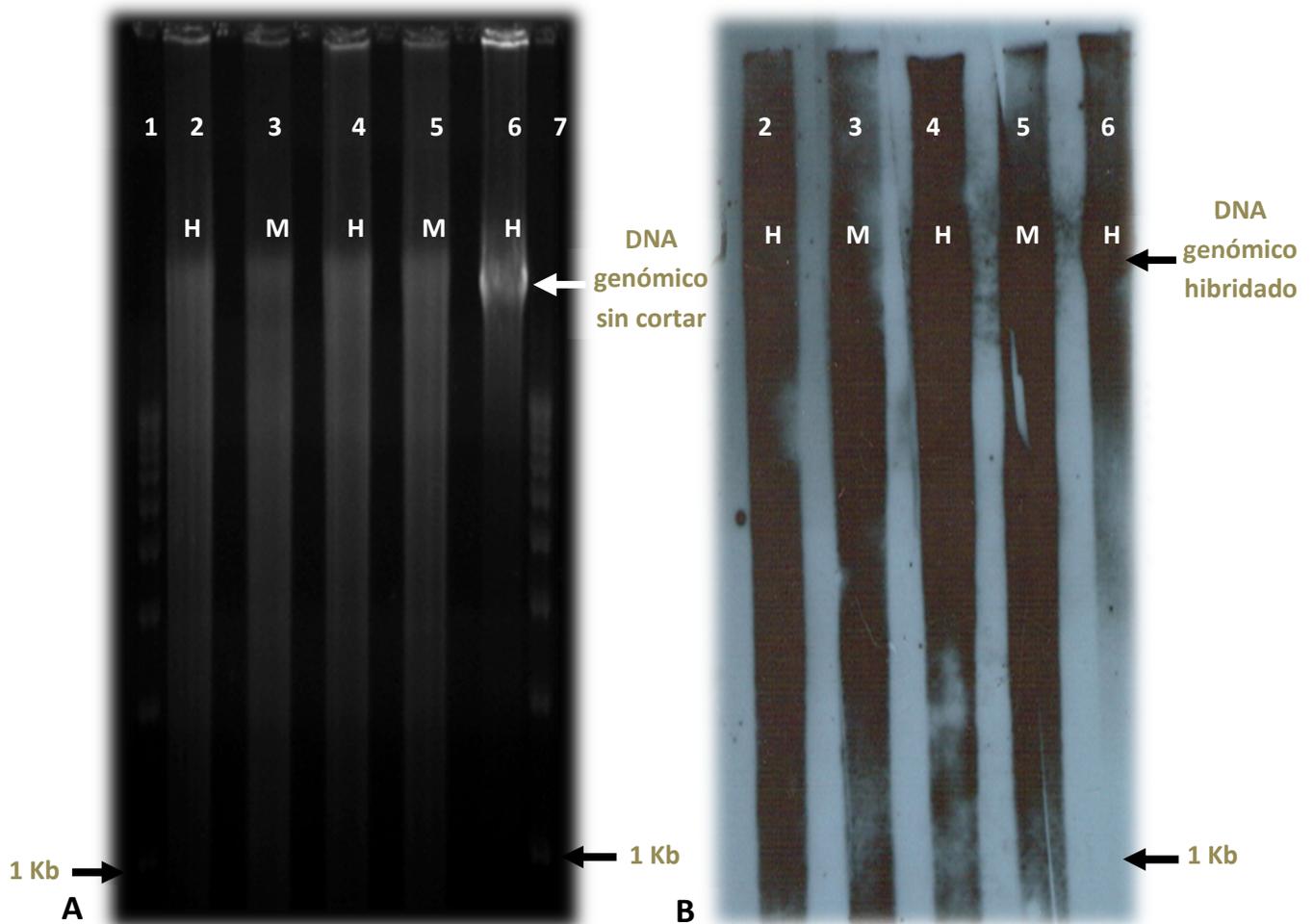
Mediante una serie de diluciones del producto de la reacción de marcaje, se pudo determinar la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina a la sonda. Esto consistió en observar señal en la dilución del tubo 6 correspondiente a la concentración de 0.1 pg/ $\mu$ l. En la imagen se observa que fue justo hasta esta dilución donde aún se pudo obtener señal, por lo que se considera que el marcaje fue adecuado (ver Figura 30).



**Figura 30. Dot blot.** Serie de disoluciones para determinar la eficacia del marcaje de la sonda mediante la técnica de *random primer*.

### 12.10 Hibridación de los fragmentos de restricción siguiendo el protocolo de Roche

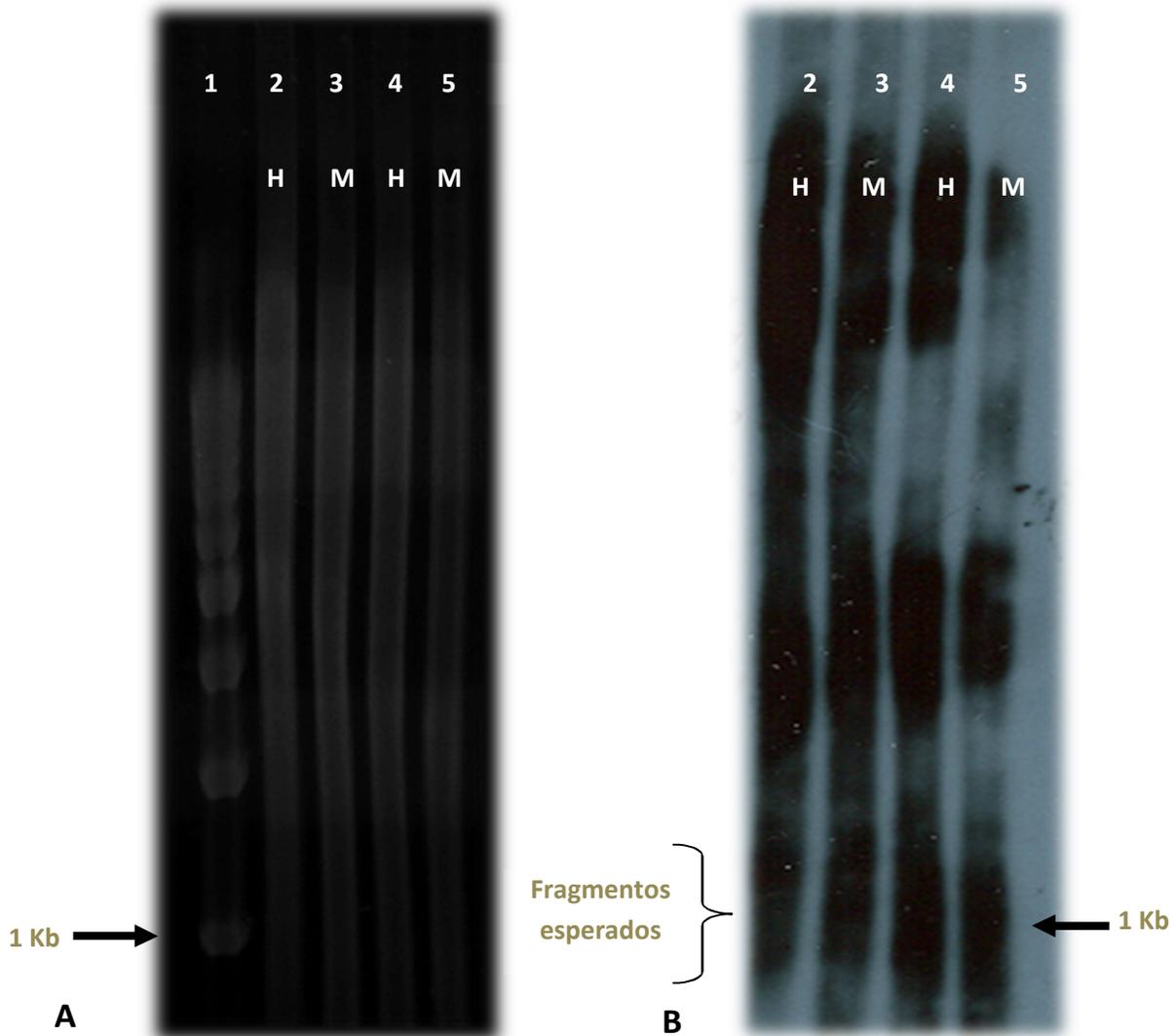
Los resultados obtenidos mediante el protocolo de Roche mostraron en todos los casos un fondo oscuro más intenso a lo largo del carril de cada muestra, que los ensayos realizados con las modificaciones al protocolo. Este fondo inespecífico fue una constante en todos los ensayos de hibridación (ver figura 31 A-B).



**Figura 31. A. Electroforesis de los fragmentos de restricción de DNA genómico A. Carril 1 y 7:** Marcador de 1 Kb, **carril 2 y 3:** Hombre y mujer (controles) **carril 4:** Hombre control (paciente 20 -no X frágil-,) **5:** Paciente mujer con sospecha de X frágil, **carril 6:** DNA genómico sin cortar **B. Detección de la señal quimioluminiscente. Carril 2 y 3:** Hombre y mujer sanos (controles) **carril 4:** Hombre control (paciente 20 -no X frágil-,) **5:** Paciente mujer con sospecha de X frágil, **carril 6:** DNA genómico sin cortar.

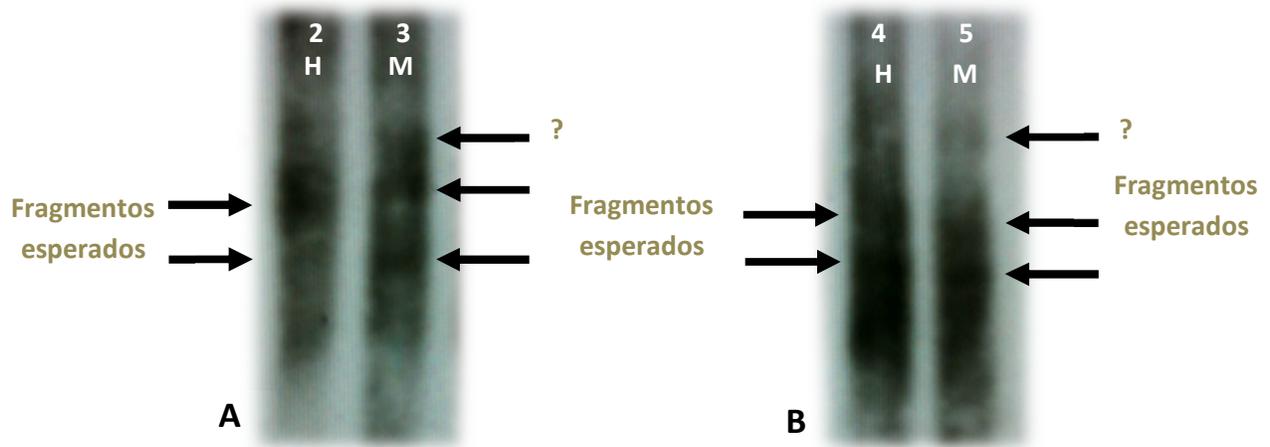
### 12.11 Hibridación de los fragmentos de restricción con las modificaciones al protocolo

Los resultados de los ensayos de hibridación siguiendo las modificaciones al protocolo permitieron mejorar ligeramente la visualización de las bandas de hibridación. No obstante, se consideran confusos para el diagnóstico (ver Figura 32 A-B).



**Figura 32. A. Electroforesis de los fragmentos de restricción de DNA genómico A. Carril 1:** Marcador de 1 Kb, **carril 2 y 3:** Hombre y mujer sanos (controles) **carril 4:** Hombre control (paciente 20 -no X frágil-,) **5:** Paciente mujer con sospecha de X frágil **B. Detección de la señal quimioluminiscente. Carril 2 y 3:** Hombre y mujer sanos (controles) **carril 4:** Hombre control (paciente 20 -no X frágil-) **5:** Paciente mujer con sospecha de X frágil.

Un acercamiento a la placa anterior permitió observar con mayor detalle las bandas de hibridación, las cuales corresponden al tamaño esperado (1034 y 1077 pb) (ver Figura 33 A-B).



**Figura 33. Acercamiento a las placas de revelado de la figura 36 en la región de los fragmentos de hibridación. A. Carril 2 y 3:** Bandas de hibridación para de los individuos sanos hombre y mujer (controles). **B. Carril 4:** Bandas de hibridación para hombre control (paciente 20 -no X frágil-). **Carril 5:** Bandas de hibridación de la paciente mujer con sospecha de X frágil.

### 13. DISCUSIÓN

El SXF es considerado como la primera causa de retraso mental hereditario; sin embargo, esta afirmación pareciera escapar de contexto. De acuerdo con los valores de incidencia del número de individuos afectados por el síndrome, la muestra poblacional en este estudio se considera baja, ya que ésta por lo menos debe ser de 1/100, por lo que en teoría, se necesitaría este tamaño de muestra para encontrar al menos un individuo afectado. Esta N poblacional no se incluyó en el estudio debido a que el número de pacientes referidos al servicio durante el tiempo de elaboración de esta tesis, fue únicamente de 21 varones y 1 mujer. Asimismo, se debe considerar que los índices de frecuencia referidos en este trabajo, corresponden a estudios llevados a cabo principalmente en poblaciones caucásicas, por lo que la incidencia en México se considera desconocida ya que son pocos los laboratorios donde realizan este tipo de análisis. Esto abre la incógnita de si pueden existir variaciones en la incidencia de la enfermedad entre las diferentes poblaciones, ya que como se ha mencionado, la frecuencia del estado de premutación es significativamente distinta a la encontrada por ejemplo en poblaciones de Israel con respecto a Taiwán, por lo que se sugiere llevar a cabo un estudio poblacional sobre la incidencia de este estado alélico.

Asimismo, la detección de transcritos mediante la técnica de RT-PCR resulta ser una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico del Síndrome X Frágil. Su amplia sensibilidad de detección, bajos costo y rapidez hacen de esta técnica el primer paso sugerido para el diagnóstico del SXF. Además, actualmente se disponen de kits comerciales que permiten llevar a cabo este proceso en un solo paso, lo que reduce significativamente el tiempo de análisis.

Con respecto a los resultados obtenidos en la PCR para el diagnóstico del síndrome, los fragmentos de las reacciones de amplificación en algunos casos correspondieron a un tamaño ligeramente mayor a lo esperado. Esto pudo haber sido causado por un mantenimiento inadecuado de las cámaras de electroforesis. Éstas, generalmente después

de un cierto periodo de uso, requieren un tratamiento con NaOH 10N por 2 horas; sin embargo, el fabricante advierte no llevar a cabo este procedimiento debido a la naturaleza del material de las cámaras, por lo que únicamente fueron limpiadas con H<sub>2</sub>O bidestilada. Además, por ejemplo, es posible observar en la foto 11 de la electroforesis de los ARN, que conforme avanza la numeración de los carriles, las bandas de los RNA ribosomales se posicionan ligeramente una más arriba de otra con respecto a la anterior, aun cuando éstos poseen el mismo tamaño. Asimismo, la secuenciación del producto de PCR utilizando únicamente los oligonucleótidos para *FMR1*, demostró que éstos correspondían a 7 de sus transcritos, por lo que se espera siempre el mismo resultado para todas las reacciones de amplificación, ya que siempre se trabajó bajo las mismas condiciones en cada reacción (temperaturas, ciclos, concentración de reactivos, etcétera).

Por otra parte, a pesar de que el SXF es considerado como la causa más importante de retraso mental, fue posible observar que existe cierto desconocimiento de las bases de este padecimiento, aún entre los propios médicos. En algunos casos, se consideraron inciertos los criterios por el cual los pacientes fueron referidos a este servicio, por lo que el investigador debe tomar parte del ingreso de los pacientes al estudio. Además, en algunos casos, el diagnóstico del síndrome resultó ser la última opción de estudio, aun cuando no existiera algún vínculo de éste con el SXF.

En cuanto a la técnica de hibridación Southern, ésta se llevó a cabo con la sonda reportada por Eiges *et al.*, cuya ventaja es que lleva a cabo el reconocimiento de los fragmentos de DNA genómico generados mediante una sola enzima de restricción (Pst1), en contraste con aquellas que requieren una doble restricción mediante las enzimas EcoR1 y Eag1, que en conjunto, resultan de mayor costo. Sin embargo, la desventaja de esta sonda es que no hay trabajos reportados más allá de su publicación; además, genera una incógnita, ya que mediante un análisis con el software NEBcutter 2.0 (New England BioLabs), se puede determinar que ésta se une siempre a un fragmento de aproximadamente 1 Kb que no contiene la región de los repetidos, y que no se menciona en el artículo de Eiges *et al.* También cabe aclarar que, Pst1 no es una enzima sensible a metilación, por lo que la

hibridación mediante esta sonda, debe ser utilizada únicamente para cuantificar el número de repetidos CGG y no para determinar el estado de metilación. Por lo tanto, la estimación de un individuo con más de 200-230 mediante el uso de esta sonda (y un diagnóstico previo confirmatorio por RT-PCR), sería suficiente para considerar al individuo como afectado por el padecimiento.

Si bien se consideró este sistema como una alternativa a la radiactividad, no se lograron producir los resultados deseados, debido a que no fue posible remover el fondo oscuro en todos los ensayos, aun cuando se realizaron modificaciones al protocolo de Roche. El problema radica en que este ruido de fondo aparece a lo largo del carril de las muestras y a la par de las señales que se esperan obtener; es decir, que no se generan tiempo antes ni después de la señal donde se espera hibride la sonda; además, cuando se cargó solamente DNA genómico sin cortar en el carril, la señal aparecía únicamente donde se situaba el DNA y no a lo largo del carril, por lo que se considera que existe hibridación de la sonda únicamente al DNA y no en cualquier posición de la membrana. Sin embargo, cabe aclarar que el fondo oscuro es una copia fiel de la restricción; es decir, sigue el mismo patrón que se ve cuando se visualiza el gel en el fotodocumentador, posterior a la electroforesis, lo que indica que la sonda se estaría uniendo a cualquier parte donde hay DNA, pero la señal es ligeramente mayor donde se esperan los fragmentos, lo que indica que no hibrida al azar, pero que de algún modo se une a donde hay DNA.

Siguiendo el protocolo *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Versión 1, Nov. 2003), se obtuvo un fondo oscuro mayor que el logrado con las modificaciones realizadas, las cuales permitieron una mejora significativa pero no suficiente para visualizar de manera correcta las bandas esperadas. Estas modificaciones son las descritas en el apartado de material y métodos; la comparación de los resultados entre los distintos protocolos muestran una reducción significativa del fondo oscuro y sólo se muestra el resultado de la hibridación con el que se obtuvo un mejor rendimiento.

Prácticamente cada paso del total de la metodología fue modificada para la lograr una mejora que ayudara a resolver este problema, aunque ninguna de ellas resultó ser la solución definitiva; sin embargo, el conjunto de estos ensayos llevó a la elaboración del protocolo descrito en este trabajo del cual se tomaron únicamente los aspectos que mostraron una mejora significativa. Cabe aclarar que no se muestran todos los resultados de las modificaciones, ya que en todos los casos, el resultado es un fondo inespecífico que no permitió dilucidar las bandas esperadas, salvo aquella que ofreció un mejor resultado y que es la mostrada en este trabajo.

A continuación, se mencionan cada una de las modificaciones realizadas en los diferentes pasos: 1) Gradiente de concentración de DNA: En todos los ensayos de hibridación, se partió de una concentración inicial de 10  $\mu\text{g}$  de DNA genómico cortado previamente con la enzima Pst1. De acuerdo al protocolo de Roche, una concentración de 0.5 a 2  $\mu\text{g}$  es suficiente para poder observar una señal adecuada con un tiempo de exposición de 30 minutos; además, se incluyó una muestra con una concentración de 20  $\mu\text{g}$  de DNA, con la finalidad de obtener una señal más intensa en la zona donde se esperaban observar los fragmentos. Al término de esta hibridación, únicamente se pudo observar señal en los carriles correspondientes a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g}$ . Para que las señales de menor concentración fueran visibles, se dejó exponer la placa autorradiográfica durante 1 hora pero tales señales no fueron visibles. El carril de los 20  $\mu\text{g}$  de DNA resultó en un fondo oscuro que impidió visualizar los lugares de hibridación. 2) Fijación del DNA a la membrana: Se realizaron 4 ensayos distintos en los primeros dos, las membranas con el DNA transferido fueron fijadas en un Crosslinker a 120,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ , la primera de ellas enjuagada previamente en solución 6X SSC y la segunda sin enjuagar previo al fijado. En las otras dos membranas el DNA fue fijado en un horno a 80°C durante 2 horas con el mismo procedimiento de enjuague que en las dos membranas anteriores. Estos variantes se realizaron con el fin de saber si el DNA fijado con UV podría ser la causa del fondo oscuro; sin embargo, no fue así, ya que las 4 membranas tenían el mismo patrón de fondo oscuro, pero en aquellas donde fueron sumergidas antes del procedimiento de fijación, se

evidenció que el DNA se perdió bajo el procedimiento de sumergir la membrana en solución 6X SSC, que es lo que algunos protocolos referidos recomendaban para remover restos de agarosa y exceso de sales de la solución de transferencia, por lo que se recomienda llevar a cabo esta inmersión posterior al proceso de fijación. 3) Gradiente de  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ : Con el fin de determinar si la intensidad de luz UV podría influir en los resultados, se fijó el DNA a las membranas a diferentes intensidades en un rango de 70,000, 90,000 y 120,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ . No se observó alguna mejora, por lo que se decidió trabajar a 70,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  con el fin de no dañar el DNA. 4) Tiempos de hibridación: Se realizaron distintos ensayos a diferentes tiempos de hibridación para determinar si a un mayor tiempo de exposición de la membrana con la sonda podía influir en el fondo oscuro. Los tiempos de hibridación fueron de 12, 18, 20 y 24 horas. Ningún tiempo resultó significativo, pero se prefirió trabajar con 18 horas ya que fue el mínimo para que la sonda hibridara de manera correcta. 5) Concentración de la sonda: Una posible causa que se pensó pudiera estar provocando este fondo inespecífico era un exceso de la concentración de la sonda; para ello, se realizaron una serie de hibridaciones a 6.25, 12.5, 18.5 y 25 ng por 1 ml de solución *DIG Easy hyb*. Se observó una reducción en la intensidad de la señal como era de esperarse en las diferentes membranas, pero el ruido de fondo siguió apareciendo a la par de las señales esperadas. Sin embargo, se pudo observar que se obtiene un buen resultado a la concentración de 18.5 ng. Cabe mencionar que en la guía de problemas, refieren la concentración como una causa del fondo inespecífico, por lo que se llevó a cabo esta sugerencia, además de que en un principio se procuró el detalle de realizar dos extracciones fenólicas a la sonda antes de marcarla, que es otra de las posibles causas que refiere Roche. 6) Lavados astringentes: En sistemas radiactivos, el problema del fondo oscuro se resuelve realizando de manera adecuada los lavados astringentes ya que en este caso, la sonda permanece unida inespecíficamente a la membrana; sin embargo, parece no ser el caso para los sistemas con digoxigenina, no obstante, se logró una mejora notoria a la hora de efectuar el revelado. Las modificaciones consistieron en un lavado extra de la segunda solución astringente (1% SDS, 0.5X SSC) a 68°; además, cabe señalar que el resultado mejoró al aumentar la temperatura. 7) Tiempos y concentración del

buffer de bloqueo: Con el fin de bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana, se realizaron diversos ensayos a diferentes concentraciones de solución de bloqueo, estas consistieron en valores de 1, 1.5 y 2X, la solución 1.5X resultó mayor que la de 1X, y similar a la de 2X. Los tiempos de incubación variaron en un rango de 30 minutos, 1, 2 y 4 horas de incubación con solución 1.5 y 2X. En los tiempos en que se dejó bloqueando la membrana durante 4 horas, se cambió a las 2 horas la solución para agregar una con el mismo volumen y concentración. Los tiempos mostraron un patrón similar, aunque se observó una leve mejora con 1 hora de incubación, que es el doble de tiempo que el recomendado por Roche. Además, se probó incubando a 4°C, mostrando una leve mejora. 8) Concentración de anticuerpo. Roche recomienda utilizar 20 ml de esta solución para una membrana de 10 X 10 cm; sin embargo, se demostró que se puede utilizar la mitad de la solución, pero sin ninguna mejora. 9) Tiempos y concentración del buffer de lavado: Se realizaron diferentes ensayos a concentraciones de 1, 1.5 y 2X. Se observó una leve mejora al utilizar la solución al 1.5X en vez de 1X que es como se cita en el protocolo de Roche. Una vez que se eligió esta concentración, se llevaron a cabo diferentes tiempos de incubación para los lavados de la membrana, estos consistieron en series de 15 a 15, 15 a 30, 30 a 30 minutos, donde se observó que en los tiempos de 15 a 30 minutos fueron mejores que los de 15 a 15 minutos y similares al de 30 a 30 minutos. 10) Buffer de revelado: Siguiendo un protocolo alterno, se realizaron incubaciones cada 2 minutos, 3 veces en contraste con Roche en que sólo recomienda sumergir la membrana una sola vez. En este caso no hubo diferencias significativas para ambos casos 11) Concentración de sustrato: Una mejora significativa se logró aplicando la mitad de sustrato que la recomendada por Roche (1 ml). Al realizar el revelado con la concentración sugerida por Roche y con la mitad de éste, se pudo observar que al incrementar la cantidad de sustrato, el fondo oscuro resulta ser mayor. 12) Tiempos de exposición: Para los ensayos en los que se logró mejorar ligeramente la señal, se realizaron una serie de tiempos de exposición comprendidos entre 5, 15, 30, 60 minutos. En este paso es donde se demuestra que el fondo oscuro aparece a la par de las señales que se esperan ver, independientemente de los tiempos de exposición. De igual modo, se llevó a cabo la

exposición de una placa al día siguiente para dejarla 30 minutos revelando, pero no se logró una mejora. 13) Finalmente, se realizó una hibridación con la membrana PVDF con el fin de obtener una mejora con respecto a las membranas de nylon, pero no hubo hibridación ya que al parecer el DNA no se unió a la membrana.

Hasta el momento, se siguieron las indicaciones de la guía de problemas del protocolo de Roche a excepción de una sola, que es el tipo de membrana. Roche refiere que una causa importante del fondo inespecífico es el tipo de membrana, ya que ligeras variaciones en la carga son una causa importante del fondo oscuro. Esta membrana se sugiere está diseñada exclusivamente para los sistemas con digoxigenina y es propia de Roche.

Por último, hoy en día se considera que el SXF es ocasionado no sólo por la expansión del triplete CGG, sino por los diversos procesos de mutagénesis que dan lugar al síndrome, por lo que no es posible ofrecer un diagnóstico íntegro del mismo a partir de las técnicas de RT-PCR e hibridación Southern, ya que éstas no son capaces de detectar mutaciones puntuales, secuencias cortas de nucleótidos, ni proteínas aberrantes, etc., por lo que se considera necesario tomar en cuenta estas variantes. Por lo tanto, la frecuencia relativa del SXF asociada a estos eventos de mutagénesis se considera desconocida, debido a que los ensayos clínicos sólo determinan el síndrome por expansión de repetidos, por lo que no deben ser descartados para su análisis.

## 14. CONCLUSIONES

La detección de transcritos de *FMR1* mediante la técnica de RT-PCR permite un diagnóstico rápido y preciso del SXF cuando éste se encuentra únicamente asociado a la expansión de tripletes repetidos. Debido a esto, se requiere ampliar el número de técnicas para ofrecer un diagnóstico más íntegro.

Se recomienda la obtención de una línea celular de X frágil para los controles positivos de la técnica de PCR e hibridación Southern.

Actualmente se considera desconocida la frecuencia de premutación poblaciones mexicanas, por lo que se recomienda llevar a cabo tal estudio poblacional.

La sonda utilizada en los ensayos de hibridación Southern de este trabajo, debe ser empleada únicamente para determinar el número de repetidos CGG.

Los resultados obtenidos mediante el sistema de quimioluminiscencia basado en el marcaje con digoxigenina, resultó poco satisfactorio debido al fondo inespecífico, por lo que se recomienda seguir implementando mejoras que ayuden a obtener un rendimiento adecuado, o bien, retomar la radiactividad.

Asimismo, la utilización de la membrana recomendada por Roche pudiera ayudar a obtener una mejora con respecto al fondo oscuro, de acuerdo a la su guía de problemas.

## 15. REFERENCIAS

1. Agulhon, C., Blanchet, P., Kobetz, A., Marchant, D., Faucon, N., Sarda, P., Moraine, C., Sittler, A., Biancalana, V., Malafosse, A. y Abitbol, M. (1999). Expression of FMR1, FXR1, and FXR2 genes in human prenatal tissues. *Journal of Neuropathol & Experimental Neurology*; 58:867–880.
2. Ashley, C.T., Sutcliffe, J.S., Kunst, C.B., Leiner, H.A., Eichler, E.E., Nelson, D.L. y Warren ST. (1993). Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nature Genetics*; 4(3):244-51.
3. Bergink, S., Severijnen, L.A., Wijgers, N., Sugasawa, K., Yousaf, H., Kros, J.M., van Swieten, J., Oostra, B.A., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W. y Willemsen, R. (2006). The DNA repair-ubiquitin-associated HR23 proteins are constituents of neuronal inclusions in specific neurodegenerative disorders without hampering DNA repair. *Neurobiology of Disease*; 23:708–716.
4. Berry-Kravis, E.M., Hessler, D., Coffey, S., Hervey, C., Schneider, A., Yuhas, J., Hutchison, J., Snape, M., Tranfaglia, M., Nguyen, D.V. y Hagerman, R. (2009). A pilot open-label single-dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. *Journal of Medical Genetics*. In press.
5. Biancalana, V., Toft, M., Le Ber, I., Tison, F., Scherrer, E., Thibodeau, S., Mandel, J.L., Brice, A., Farrer, M.J., y Durr, A. (2005). FMR1 premutations associated with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in multiple system atrophy. *Archives of Neurology*; 62:962–6.
6. Bretherick, K.L., Fluker, M.R. y Robinson, W.P. (2005). FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Human Genetics*; 117: 376-382.
7. Brouwer, J.R., Mientjes, E.J., Bakker, C.E., Nieuwenhuizen, I.M., Severijnen, L.A., Van der Linde, H.C., Nelson, D.L., Oostra, B.A. y Willemsen, R. (2007). Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Experimental Cell Research*; 313:244–253.
8. Brouwer, J.R., Severijnen, E., de Jong, F.H., Hessler, D., Hagerman, R.J., Oostra, B.A. y Willemsen, R. (2007). Altered hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis regulation in the expanded CGG-repeat mouse model for fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Psychoneuroendocrinology*; 33:863–873.
9. Bussani, C., Papi, L., Sestini, R., Baldinotti, F., Bucciattini, S., Bruni, V. y Scarselli, G. (2004). Premature ovarian failure and fragile X premutation: a study on 45 women. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*; 112:189–91.
10. Corrigan, E.C., Raygada, M.J., Vanderhoof, V.H. y Nelson, L.M. (2005). A woman with spontaneous premature ovarian failure gives birth to a child with fragile X syndrome. *Fertility and Sterility*; 84:1508.

11. Crawford, D.C., Acuna, J.M. y Sherman, S.L. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine*; 3, 359-371.
12. Davis, L., Banker, G.A. y Steward, O. (1987). Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature*; 330:477-479.
13. De Boule, K., Verkerk, A. J. M. H., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van Den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A. y Willems, P. J. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genetics*; 3:31-35.
14. De Diego Otero, Y., Bakker, C.E., Raghoe, P., Severijnen, L., Hoogeveen, A., Oostra, B.A. y Willemsen, R. (2000). Immunocytochemical characterization of FMRP, FXR1P and FXR2P during embryonic development in the mouse. *Gene Function & Disease*; 1:28-37.
15. De Diego Otero, Y., Severijnen, L.A., Van Cappellen, G., Schrier, M., Oostra, B. y Willemsen, R. (2002). Transport of Fragile X Mental Retardation Protein via Granules in Neurites of PC12 Cells. *Molecular and Cell Biology*; 22:8332-8341.
16. de Graaff, E., de Vries, B. B., Willemsen, R., van Hemel, J. O., Mohkamsing, S., Oostra, B. A. y van den Ouweland, A. M. (1996). The fragile X phenotype in a mosaic male with a deletion showing expression of the FMR1 protein in 28% of the cells. *American Journal of Medicine Genetics*; 9; 64(2):302-8.
17. de Graaff, E., de Vries, B.B., Willemsen, R., van Hemel, J.O., Mohkamsing, S., Oostra, B.A. y van den Ouweland, A.M. (1996). The fragile X phenotype in a mosaic male with a deletion showing expression of the FMR1 protein in 28% of the cells. *American Journal of Medicine Genetics*; 9; 64(2):302-8.
18. De Smedt, M., Verhasselt, B., Kerre, T., Vanhecke, T., Naessens, E., Leclercq, G., Renauld, J.C., Van Snick, J., y Plum, J. (2000). Signals from the IL-9 Receptor Are Critical for the Early Stages of Human Intrathymic T Cell Development. *The Journal of Immunology*; 164, (4) 1761-1767.
19. de Vries, B.B., Jansen, C.C., Duits, A. A., Verheij, C., Willemsen, R., van Hemel, J.O., van den Ouweland, A.M., Niermeijer, M.F. y Oostra B.A., Halley, D.J. (1996). Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *Journal of Medical Genetics*; 33(12):1007-10.
20. De Vrij, F.M.S., Levenaga, J., Van der Linde, H.C., Koekkoek, S.K., De Zeeuw, C.I., Nelson, D.L., Oostra, B.A. y Willemsen, R. (2008). Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in FMR1 KO mice. *Neurobiology of Disease*; 31:127-132.
21. Deelen, W., Bakker, C., Halley, C., Dicky, J.J. y Oostra, B.A. (1994). Conservation of CGG region in FMR1 gene in mammals. *American Journal of Medicine Genetics*; 51; 513-516.

22. Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J.P. y Mandel, J.L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genetics*; 4(4):335–340.
23. Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B.S., Smith, G.B., Auerbach, B.D., Chattarji, S. y Bear M.F. (2007). Correction of Fragile X Syndrome in mice. *Neuron*; 56:955–962.
24. Dombrowski, C., Lévesque, S., Morel, M.L., Rouillard, P., Morgan, K. y Rousseau, F. (2007). Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10 572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Human Molecular Genetics*; 11 (4): 371-378.
25. Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. y Darnell, R.B. (2001). Fragile X Mental Retardation Protein Targets G Quartet mRNAs Important for Neuronal Function. *Cell*; 107:489–499.
26. Eichler, E.E., Holden, J.J., Popovich, B.W., Reiss, A.L., Snow, K., Thibodeau, S.N., Richards, C.S., Ward, P.A. y Nelson, D.L. (1994). Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genetics*; 8:88–94.
27. Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N. y Ben-Yosef, D. Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell*; 1:568–577.
28. Feng Y, Absher D, Eberhart D.E., Brown V., Malter H.E. y Warren ST. (1997). FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Molecular Cell*; 1:109–118.
29. Galvez, R. y Greenough, W.T. (2005). Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *American Journal of Medicine Genetics A*; 135:155–160.
30. Gedeon, A. K., Baker, E., Robinson, H., Partington, M. W., Gross, B., Manca, A., Korn, B., Poustka, A., Yu, S., Sutherland, G. R. y Mulley, J. C. (1992). Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genetics*; 1(5):341-4.
31. Gene link. (2004). Product manual. Non-radioactive Fragile X Genotyping by Southern Blot Analysis Methylation Pattern and CGG Repeat Detection.
32. Grigsby, J., Bennett, R., Brega, A., Bounds, L., Cogswell, J., Greco, C., Hagerman, P., Hagerman, R., Hall, D., Jacquemont, S., Leehey, M., Paulich, M., Rice, C., Rubinstein D. y Tassone, F. (2005). Fragile X-associated tremorataxia syndrome (FXTAS): An X-linked neurodegenerative phenotype. Abstract #280. Presentado en la reunion del American College of Medical Genetics, Dallas, TX.

33. Grossman, A.W., Aldridge, G.M., Weiler, I.J. y Greenough, W.T. (2006). Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond. *The Journal Neuroscience*; 26:7151–7155.
34. Gu, Y., Lugenbeel, K.A., Vockley, J.G., Grody, W.W. y Nelson, D.L. (1994). A de novo deletion in FMR1 in a patient with developmental delay. *Human Molecular Genetics*; 3(9):1705–1706.
35. Hagerman, P.J. (1996). Physical and Behavioral Phenotype. In Hagerman RJ and Cronister A (eds): "Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research, 2nd ed." Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 3-87.
36. Hagerman, P.J. (2008). The fragile X prevalence paradox. *Journal of Medical Genetics*. 45(8): 498–499.
37. Hagerman, R.J. y Cronister A. (1996). *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*, 2nd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
38. Hagerman, R.J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B. y Hagerman, P.J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*; 57: 127-130.
39. Hansen, R.S., Canfield, T.K., Lamb, M.M., Gartler, S.M. y Laird, C.D. (1993). Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR1 gene. *Cell*; 73:1403–1409.
40. Hoogeveen, A.T., y Oostra, B.A. (1997). The fragile X syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*; 20, 139-151.
41. Jacquemont, S., Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. y Leehey, M.A. (2007). Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *The Lancet Neurology*; 6:45–55.
42. Jacquemont, S., Hagerman, R.J., Leehey, M.A., Hall, D.A., Levine, R.A. Brunberg, J.A., Zhang, L., Jardini, T., Gane L,W., Harris, S.W., Herman, K., Grigsby, J., Greco, C.M., Berry-Kravis, E., Tassone, F. y Hagerman, P.J. (2004). Penetrance of the fragile x-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *The Journal of the American Medical Association*; 291:460-469.
43. Jacquemont, S., Leehey, M.A., Hagerman, R.J., Beckett, L.A. y Hagerman, P.J. (2006). Size bias of fragile X permutation alleles in late-onset movement disorders. *Journal of Medical Genetics*; 43:804-9.
44. Jin P, Zarnescu DC, Zhang F, Pearson CE, Lucchesi JC, Moses K y Warren ST. (2003). RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in drosophila. *Neuron*; 39:739–747.
45. Kang, S., Jaworski, A., Ohshima, K. y Wells R.D. (1995). Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nature Genetics*; 10(2):213–218. (A)
46. Kang, S., Ohshima, K., Shimizu, M., Amirhaeri, S. y Wells, R. (1995). Pausing of DNA Synthesis in Vitro at Specific Loci in CTG and CGG Triplet Repeats from Human Hereditary Disease Genes. *The*

American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; Vol. 270, No. 45, pp. 27014–27021.

(B)

47. Kenneson, A., Zhang, F., Hagedorn, C.H. y Warren, S.T. (2001). Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Human Molecular Genetics*; 10:1449–54.
48. Kiebler, M.A. y DesGroseiller, L. (2000). Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*; 25:19–28.
49. Kim, M., Bellini, M. y Ceman, S. (2009). Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. *Molecular and Cellular Biology*; 29:214–228.
50. Kunst, C.B. y Warren, S.T. (1994). Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell*; 77:853-861.
51. Lagerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E.M., Ostareck-Lederer, A. y Fischer, U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Human Molecular Genetics*; 10:329–338.
52. Loesch, D.Z., Litewka, L., Brotchie, P., Huggins, R.M., Tassone, F. y Cook, M. (2005). Magnetic resonance imaging study in older fragile X premutation male carriers. *Annals of Neurology*; 58:326-30.
53. Louis, E., Moskowitz, C., Friez, M., Amaya, M. y Vonsattel, J.P. (2006). Parkinsonism, dysautonomia, and intranuclear inclusions in a fragile X carrier: a clinical-pathological study. *Movements Disorders*; 21:420-5.
54. Lubs, H.A. (1969). A marker X chromosome. *American Journal of Medicine Genetics*; 21:231–44.
55. Lugenbeel, K.A., Peier, A.M., Carson, N.L., Chudley, A.E. y Nelson, D.L. (1995). Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nature Genetics*; 10(4):483-5.
56. Malter, H.E., Iber, J.C., Willemsen, R., De Graaff, E., Tarleton, J.C., Leisti, J., Warren, S.T. y Oostra, B.A. (1997). Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nature Genetics*; 15:165–169.
57. Martin, J.O y Bell, J. (1943). A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *Journal of Neurology, Neurosurgery y Psychiatry*; 6(3-4): 154–157.
58. Martin, K.C. y Zukin, R.S. (2006). RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *The Journal of Neuroscience*; 26:7131–7134.
59. Meijer, H., de Graaff, E., Merckx, D.M., Jongbloed, R.J., de Die-Smulders, C.E., Engelen, J.J., Fryns, J.P., Curfs, P.M. y Oostra, B.A. (1994). A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics*; 3(4):615-20.

60. Milà, M., Castellví-Bel, S., Sánchez, A., Lázaro, C., Villa, M. y Estivill, X. (1996). Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR1 gene. *Journal of Medical Genetics*; 33:338-340.
61. Miyashiro, K.Y., Beckel-Mitchener, A., Purk, T.P, Becker, K.G., Barret, T., Liu, L., Carbonetto, S., Weiler, I.J., Greenough, W.T. y Eberwine, J. (2003). RNA Cargoes Associating with FMRP Reveal Deficits in Cellular Functioning in Fmr1 Null Mice. *Neuron*; 37:417–431.
62. Nakamoto, M., Nalavadi, V., Epstein, M.P., Narayanan, U., Bassell, G.J. y Warren, S.T. (2005). Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 104:15537–15542.
63. Nelson, L.M., Covington, S.N., y Rebar, R.W. (2005). An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertility and Sterility*; 83:1327–32.
64. Nolin, S.L., Brown, W.T., Glicksman, A., Houck, G.E. Jr., Gargano, A.D., Sullivan, A., Biancalana, V., Brondum-Nielsen, K., Hjalgrim, H., Holinski-Feder, E., Kooy, F., Longshore, J., Macpherson, J., Mandel, J.L., Matthijs, G., Rousseau, F., Steinbach, P., Vaisanen, M.L., von Koskull, H., y Sherman, S.L. (2003). Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *American Journal of Medicine Genetics*; 72:454–64.
65. Nolin, S.L., Lewis, F.A., Ye, L.L., Houck, G.E. Jr., Glicksman, A.E., Limprasert, P., Li S.Y., Zhong, N., Ashley, A.E., Feingold. E., Sherman, S.L., y Brown, W.T. (1996). Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *American Journal of Medicine Genetics*; 59:1252-61.
66. O'Donnell, W.T., y Warren, S.T. (2002). A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annuual Review of Neurosciense*; 25, 315-338.
67. Oberlé, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boué, J., Bertheas, M.F. y Mandel, J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*; 24; 252(5010):1097-102.
68. Oostra, B. A. y Willemsen, R. (2009). FMR1: a gene with three faces. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790(6): 467–477.
69. Oudet, C., Mornet, E., Serre, J.L., Thomas, L., Lentès-Zengerling, S., Kretz, Deluchat, C., Tejada, I., Boué, J., Boué, A. y Mandel, J. L. (1993). Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggests that fragile X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *American Journal of Medicine Genetics*; 52: 297-304.
70. Pacey, L.K. y Doering, L.C. (2007). Developmental expression of FMRP in the astrocyte lineage: implications for fragile X syndrome. *Glia*; 55:1601–1609.
71. Pembrey, M. E., Winter, R. M. y Davies, K. E. (1985). A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *American Journal of Medical Genetics*; 709–717.

72. Pessa, R., Berkenstadt, M., Cuckle, H., Gak, E., Peleg, L., Frydman, M. y Barkai, G. (2000). Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. *Prenatal Diagnosis*; 20:611–614.
73. Pieretti, M., Zhang, F., Fu, Y.H., Warren, S.T., Oostra, B.A., Caskey, C.T. y Nelson, D, L. (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*; 23; 66(4):817-22.
74. Quan, F., Zonana, J., Gunter, K., Peterson, K.L., Magenis, R.E. y Popovich, B.W. (1995). An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene. *American Journal of Medicine Genetics*; 56(5):1042-51.
75. Ramos, F.J. (2006). Fenotipo físico y manifestaciones clínicas. Síndrome X Frágil, libro de consulta para familia y profesionistas. Girmogen.
76. Ranum, L.P., y Cooper, T.A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annual Review of Neuroscience*; 29: 259–77.
77. Reyniers, E., Vits, L., De Boule, K., Van Roy, B., Van Velzen, D., de Graaff E., Verkerk., Jorens, H.Z., Darby, J.K., Oostra, .B.A. y Willems, P.J. (1993). The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nature Genetics*; 4:143–146.
78. Rousseau, F., Heitz, D., Biancalana, V., Blumenfeld, S., Kretz, C., Boué, J., Tommerup, N., Hagen, C.V., DeLozier-Blanchet, C., Croquette, M.F., Gilgenkrantz, S., Jalbert, P., Voelckel, M.A. Oberlé, I., Mandel, J.L. (1991). Direct Diagnosis by DNA Analysis of the Fragile X Syndrome of Mental Retardation. *The New England Journal of Medicine*; 325:1673-1681.
79. Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
80. Schmucker, B. y Seidel, J. (1999). Mosaicism for a full mutation and a normal size allele in two fragile X males. *American Journal of Medicine Genetics*; 84:221-5.
81. Sherman S. L., Jacobs, P.A., Morton, N.E., Froster-Iskenius, U., Howard-Peebles, P.N., Nielsen K.B., Partington, M.W. Southerland, G.R., Turner, G. y Watson, M. (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Human Genetics*; 69:289-299.
82. Sherman, S., Pletcher, B.A. y Driscoll, D.A. (2005). Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genetics in Medicine*; 7:584–7.
83. Shimizu, M., Gellibolian, R., Oostra, B.A. y Wells, R. D. (1996). Cloning, characterization and properties of plasmids containing CGG triplet repeats from the FMR-1 gene. *Journal of Molecular Biology*; 258, 614–626.
84. Siomi, H., Choi, M., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L. y Dreyfuss, G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* 8; 77(1):33-9.
85. Siomi, H., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L. y Dreyfuss, G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*; 74(2):291-8.

86. Siomi, M.C., Siomi, H., Sauer, W.H., Srinivasan, S., Nussbaum, R.L., y Dreyfuss, G. (1995). FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO Journal*; 1; 14(11):2401-8.
87. Siomi, M.C., Zhang, Y., Siomi, H. y Dreyfuss, G. (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Molecular and Cellular Biology*; 16(7):3825-32.
88. Smith, G.K., Jie, J., Fox, G.E., y Gao, X. (1995). DNA CTG triplet repeats involved in dynamic mutations of neurologically related gene sequences form stable duplexes. *Nucleic Acids Research*; 23, 4303-4311.
89. Ceman, S., O'Donnell, W., Reed, M., Patton, S., Pohl, J. y Warren, S.T. (2003). Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Human Molecular Genetics*; 12 (24): 3295-3305.
90. Strom, C.M., Crossley, B., Redman, J.B., Buller, A., Quan, F., Peng, M., McGinnis, M., Fenwick, R.G. Jr., y Sun, W. (2007). Molecular testing for Fragile X Syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinicallaboratory. *Genetics in Medicine*; 9:46-51.
91. Sullivan, A.K., Marcus, M., Epstein, M.P., Allen, E.G., Anido, A.E., Paquin, J.J., Yadav-Shah, M. y Sherman, S.L. (2005). Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Human Reproduction*; 20:402-12.
92. Sutherland, G.R. (1979). Heritable fragile sites on human chromosomes. *Human Genetics*; 53:23-27.
93. Tabolacci, E., Pietrobono, R., Moscato, U., Oostra, B.A., Chiurazzi, P. y Neri, G. (2005). Differential epigenetic modifications in the FMR1 gene of the fragile X syndrome after reactivating pharmacological treatments. *European Journal of Human Genetics*; 13(5):641-8.
94. Tarleton, J., Richie, R., Schwartz, C., Rao, K., Aylsworth, A.S. y Lachiewicz, A. (1993). An extensive de novo deletion removing FMR1 in a patient with mental retardation and the fragile X syndrome phenotype. *Human Molecular Genetics*; 2(11):1973-4.
95. Tarleton, J.C., y Saul, R.A. (2008). FMR1-Related Disorders. *GeneReviews*.
96. Tassone, F., Hagerman, R.J., Garcia-Arocena, D., Khandjian, E.W., Greco, C.M. y Hagerman, P.J. (2004). Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *Journal of Medical Genetics*; 41:E43.
97. Tassone, F., Hagerman, R.J., Taylor, A.K., Gane, L.W., Godfrey, T.E. y Hagerman, P.J. (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: A new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *American Journal of Medicine Genetics*; 66:6-15.
98. Toledano-Alhadeff, H., Basel-Vanagaite, L., Magal, N., Davidov, B., Ehrlich, S., Drasinover, V., Taub, E., Halpern, G.J., Ginott, N. y Shohat, M. (2001). Fragile-Xcarrier screening and the prevalence of

- premutation and full-mutation carriers in Israel. *American Journal of Medicine Genetics*; 69:351–360.
- 99.** Tzeng, C.C., Tsai, L.P., Hwu, W.L., Lin, S.J., Chao, M.C., Jong, Y.J., Chu, S.Y., Chao, W.C. y Lu, C.L. (2005). Prevalence of the FMR1 mutation in Taiwan assessed by large-scale screening of newborn boys and analysis of DXS548-FRAXAC1 haplotype. *American Journal of Medicine Genetics Part A* 133A:37–43.
- 100.** Van Dam, D., Errijgers, V., Kooy, R.F., Willemsen, R., Mientjes, E., Oostra, B.A. y De Deyn, P.P. (2005). Cognitive decline, neuromotor and behavioural disturbances in a mouse model for fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Behavioural Brain Research*; 162: 233–39.
- 101.** Verheij, C., de Graaff, E., Bakker, C.E., Willemsen, R., Willems, P.J., Meijer, N., Galjaard, H., Reuser, A.J. y Oostra, B.A. (1995). Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Human Molecular Genetics*; 4(5):895-901.
- 102.** Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F. y Zhang, F.P. (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*; 31; 65(5):905-14.
- 103.** Vits, L., De Boulle, K., Reyniers, E., Handig, I., Darby, J.K., Oostra, B. y Willems, P.J. (1994). Apparent regression of the CGG repeat in FMR1 to an allele of normal size. *Human Genetics*; 94:523-6.
- 104.** Wang, Y.C., Lin, M.L., Lin, S.J., Li, Y.C. y Li, S.Y. (1997). Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome. *Human Mutation*; 10(5):393-9.
- 105.** Wells R. (2007). Non-B Conformations, Mutagenesis, and Diseases. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 271-278.
- 106.** Wells. (2009). Mutation Spectra in Fragile X Syndrome Induced by Deletions of CGG-CCG Repeats. *The Journal of Biological Chemistry*; 284, 12:7407-7411.
- 107.** White, P.J., Borts, R.H. y Hirst, M.C. (1999). Stability of the human fragile X (CGG) (n) triplet repeat array in *saccharomyces cerevisiae* deficient in aspects of DNA metabolism. *Molecular and Cellular Biology*; 19:5675–5684.
- 108.** Willemsen, R., Anar, B., De Diego Otero, Y., De Vries, BBA., Hilhorst- Hofstee, Y., Smits, A., van Looveren, E., Willems, P.J., Galjaard, H. y Oostra, B.A. (1999). Noninvasive test for Fragile X syndrome, using hair root analysis. *American Journal of Medicine Genetics*; 65:98-103.
- 109.** Willemsen, R., Bontekoe, C.J., Severijnen, L.A. y Oostra, B.A. (2002). Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Human Genetics*; 110:601–605.
- 110.** Willemsen, R., Hoogeveen-Westerveld, M., Reis, S., Holstege, J., Severijnen, L.A, Nieuwenhuizen, I.M., Schrier, M., van Unen, L., Tassone, F., Hoogeveen, A.T., Hagerman, P.J., Mientjes, E.J. y Oostra, B.A. (2003). The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal

- inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Human Molecular Genetics*; 12: 949–59.
- 111.** Wittenberger, M.D., Hagerman, R.J., Sherman, S.L., McConkie-Rosell, A., Welt, C.K., Rebar, R.W., Corrigan, E.C., Simpson, J.L., y Nelson, L.M. (2007). The FMR1 premutation and reproduction. *Fertility and Sterility*; 87:456–65.
- 112.** Wöhrle, D., Hennig, I., Vogel, W. y Steinbach, P. (1993). Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nature Genetics*; 4:140–142.
- 113.** Wolff, D.J., Gustashaw, K.M., Zurcher, V., Ko, L., White, W., Weiss, L., Van Dyke, D.L., Schwartz, S. y Willard, H.F. (1997). Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. *Human Genetics*; 100(2):256-61.
- 114.** Yan, Q.J., Rammal, M., Tranfaglia, M. y Bauchwitz, R.P. (2005). Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*; 49:1053–1066.

