



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

TAMIZAJE DE FRAXE MEDIANTE PCR  
EN PACIENTES CON RETRASO MENTAL  
IDIOPATICO

TRABAJO DE INVESTIGACION

QUE PRESENTA:

DRA. SILVIA VIDAL MILLAN

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN  
GENETICA MEDICA

TUTOR DE TESIS:

DRA. ARIADNA GONZALEZ DEL ANGEL





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.

*Pedro A. Sanchez Márquez*  
*Pedro A. Sanchez Márquez*

Dr. Pedro A. Sanchez Márquez

SUBDIRECTOR GRAL. ENSEÑANZA

*Luis Heshiki Nakandakari*  
*Luis Heshiki Nakandakari*

Dr. Luis Heshiki Nakandakari

JEFE DEPTO DE ENSEÑANZA PRE Y  
POSGRADO

*Victoria del Castillo Ruiz*  
*Victoria del Castillo Ruiz*

Dra. Victoria del Castillo Ruiz

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

*Ariadna González del Angel*  
*Ariadna González del Angel*

Dra. Ariadna González del Angel

TUTOR DEL TRABAJO DE  
INVESTIGACION



**TAMIZAJE DE FRAXE MEDIANTE PCR EN PACIENTES CON RETRASO MENTAL  
IDIOPATICO**

Vidal S., González del Angel A., Del Castillo V., Saldaña Y., Orozco L.

Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Investigación en Genética Humana.

Instituto Nacional de Pediatría, México D.F.

Palabras clave: Síndrome de X frágil, FRAXE, FMR-2.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena Orozco por permitir la realización de esta tesis en su laboratorio y por compartir los conocimientos de su equipo de trabajo.

A la Dra. Ariadna González por su dedicación y paciencia así como por sus conocimientos durante la realización de este trabajo y mi formación como Genetista.

A la Dra. Victoria del Castillo por sus enseñanzas en el área de la Genética clínica.

Al Dr. Miguel Angel Alcantara por su colaboración en la realización de este trabajo.

A mi compañera de residencia Dra. Astrid Rasmussen por su amistad

A mi esposo Dr. Alejandro Campos por su apoyo cariño y paciencia durante la realización de mi especialidad.

A mis padres Andres Vidal y María de los Angeles Millán, así como a mis hermanos Fernando, María de los Angeles, Patricia, Adriana, Francisco y Enriqueta por el cariño y apoyo que siempre me brindan.

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Procedimientos experimentales.....	8
Resultados.....	11
Discusión.....	13
Tablas.....	16
Figuras.....	19
Bibliografía.....	23

## RESUMEN

Anterior a este trabajo se analizaron mediante PCR y Southern blot 40 pacientes con retraso mental idiopático (RMI) con el fin de establecer si el síndrome de X frágil (Xfra) era el responsable de su retraso mental (RM), sin embargo sólo el 5% de los pacientes estudiados presentó una mutación completa por expansión de CGG en el gen *FMR-1*. Por lo anterior en este trabajo se estudio al resto de los pacientes para definir si FRAXE era la etiología del RM y para ello se caracterizaron los repetidos GCC localizados en la región 5' del gen *FMR-2* mediante PCR.

En los pacientes analizados no se demostró una mutación completa por expansión de tripletes GCC en *FMR-2*, descartándose que FRAXE condicionara el RM, lo anterior puede ser porque el tamaño de la muestra era pequeño o bien porque los pacientes se seleccionaron de un hospital de tercer nivel. Existe la posibilidad de que este padecimiento este subdiagnosticado en hospitales de primer y segundo nivel por lo que consideramos se requiere continuar con este tipo de estudios para definir la frecuencia de FRAXE en nuestro país así como el cuadro clínico que presentan estos pacientes. Así mismo consideramos que como parte integral del estudio de pacientes con RMI se debe incluir el estudio molecular de Xfra y FRAXE mediante un tamizaje inicial por PCR ya que este ofrece muchas ventajas en ahorro de costos y tiempo para la detección de estos pacientes, y dejar el Southern blot únicamente para los casos en los que no se encuentra amplificado en el PCR y para la detección de mujeres afectadas y portadoras sintomáticas, para permitir así brindar un asesoramiento genético adecuado e incluso diagnóstico prenatal.

# TAMIZAJE DE FRAXE MEDIANTE PCR EN PACIENTES CON RETRASO MENTAL IDIOPATICO

## INTRODUCCION

Los sitios frágiles sensibles a folatos ocurren en los cromosomas en alrededor del 5% de la población general, estos también se denominan sitios frágiles raros y a la fecha se conocen aproximadamente 24. Estos sitios frágiles se inducen al cultivar las células en medios deficientes de ácido fólico y timidina, o en presencia de antagonistas de folatos como metotrexato o de un inhibidor de la timidilato sintetasa como la fluorodeoxiuridina (Verma y Babu., 1989) y aparecen como regiones no teñidas, constricciones u ocasionalmente como rupturas en cromosomas metafásicos (Hecht y cols., 1990). Se han identificado tres sitios frágiles sensibles a folatos en la región q27-q28 del cromosoma X: FRAXA (en Xq27), FRAXE y FRAXF (en Xq28) (Oberlé y cols., 1991; Yu y cols., 1991; Sutherland y Baker.,1992; Ritchie y cols., 1994). Además existe un sitio frágil denominado común, ya que se expresa sin la presencia de medios de cultivo deficientes de folatos, este se denomina FRAXD y se localiza muy proximal a FRAXA en Xq27 (Sutherland y Baker., 1990).

## Síndrome de X Frágil y FRAXA

El síndrome de X frágil (Xfra) o también conocido como síndrome de Martin-Bell se asocia con el sitio frágil FRAXA, anteriormente se pensaba que era la forma más común de retraso mental ligado a X con una frecuencia de 1/2500 varones, actualmente mediante estudios moleculares, se estima una frecuencia de 1/4000 - 1/6000 varones en países occidentales (Murray y cols., 1996; Turner y cols., 1996; Morton y cols., 1997; van Rijn y cols., 1997). Fenotípicamente se caracteriza por retraso mental de grado variable, en la infancia los pacientes suelen presentar macrocefalia, hipotonía así como frente, mandíbula y pabellones auriculares



prominentes. La macroorquidia que se detecta en el 90% de los pacientes se observa en etapa postpuberal. Otros hallazgos poco frecuentes son déficit de atención, crisis convulsivas, alteraciones conductuales como hiperactividad y movimientos estereotipados de manos (Rousseau y cols., 1991; Nussbaum y Ledbetter., 1995).

El gen responsable de esta entidad se denomina *FMR-1* (por fragile X mental retardation) y la mutación encontrada en más del 90% de los pacientes es una amplificación inestable del trinucleotido CGG (localizado en la región 5' no traducible del exón 1 del gen *FMR-1*) y la metilación de la isla CpG adyacente al extremo 5' del gen, lo que condiciona que el gen no se transcriba y se presente el fenotipo de esta enfermedad ( Nelson., 1993; Tarleton y cols., 1993; Nussbaum y Ledbetter., 1995). En sujetos normales, el número de repetidos CGG varía entre 6 y 50 veces, esto constituye un polimorfismo heredado de manera estable en forma mendeliana ligado a X (Rousseau y cols., 1991). Aquellos individuos con 52 a 193 copias (premutación) se denominan varones transmisores y mujeres portadoras y son clínicamente sanos, sin embargo al transmitir la premutación a su descendencia, ésta es inestable por lo que incrementa a más de 200 copias con la metilación de la isla CpG adyacente, a lo que se denomina mutación completa y los individuos presentan manifestaciones clínicas de Xfra. Otras mutaciones en el gen *FMR-1* descritas son deleciones submicroscópicas que afectan todo o parte del gen *FMR-1* o mutaciones puntuales (De Boulle y cols., 1993; Meijer y cols., 1994).

## FRAXF

Existe otro sitio frágil denominado FRAXF, este se localiza en la región Xq28 a más de 1 Mb de FRAXA y por lo menos a 500 kb de FRAXE. El gen de FRAXF presenta un repetido GCC localizado en la región 5'. La mayoría de los individuos sanos tienen entre 12 y 26 repetidos siendo el alelo más común de 14, mientras que en individuos que expresan el sitio frágil tienen una expansión de más de 300 tripletes. Hasta la fecha no se ha demostrado que esta expansión

sea responsable de un fenotipo determinado o de retraso mental (RM) y su frecuencia real se desconoce, aunque se cree que es raro (Hirst y cols., 1993; Ritchie y cols., 1994).

## FRAXE

Se han descrito algunas familias cuya expresión de FRAXE se asocia con retraso mental moderado, en algunos pacientes se han reportado alteraciones de lenguaje, retardo en aprendizaje para leer y escribir, déficit de atención y alteraciones de conducta, lo que hace extremadamente difícil establecer el diagnóstico clínico ya que los pacientes no presentan dismorfias, aunque se sugiere por algunos autores que aquellos que fueron estudiados en etapas tempranas de la vida, probablemente desarrollen un fenotipo determinado en la vida adulta (Hamel y cols., 1994; Mulley y cols., 1995; Knight y cols., 1996). El análisis de los casos familiares en este grupo de pacientes sugirieron que FRAXE condiciona retraso mental ligado a X; sin embargo a la fecha aún existe controversia ya que FRAXE también se ha reportado en individuos sin retraso mental (Sutherland y Baker., 1992; Flynn y cols., 1993).

Se ha tratado de establecer la frecuencia de FRAXE, sin embargo, hay pocas familias reportadas y su frecuencia real no se conoce aunque se ha estimado que su prevalencia sea 4 veces menor que la de FRAXA o 1/50000 varones (Knight y cols, 1996; Murray y cols, 1996; Brown, 1996).

Clínica y citogenéticamente es difícil distinguir pacientes con Xfra de FRAXE; por lo que actualmente se considera que la única forma de hacer el diagnóstico diferencial es mediante técnicas moleculares.

El gen responsable de FRAXE denominado *FMR-2* fue clonado por Gecz y cols. y por el grupo de Gu y cols. en 1996, se localiza a ~600 kb distal de FRAXA (Sutherland y Baker., 1992) está compuesto de 22 exones con tamaños de 34 a 1011 pb (para lo exones internos) y 4246 pb (exon 21 A). Tiene dos grandes exones internos el 3 de 861 pb y el 11 de 1011 pb los cuales por

su gran tamaño se consideran atípicos. Al igual que *FMR-1* el gen *FRM-2* tiene en su región 5' un trinucleotido repetido GCC y una isla CpG adyacente. Se ha identificado un gran marco de lectura abierto de ~1311 aminoácidos (Gecz y cols., 1996; Gu y cols., 1996). En individuos normales se encuentran de 6 - 25 copias del repetido GCC y la isla CpG adyacente no se encuentra metilada siendo el alelo más común de 15 copias, mientras que los varones con más de 200 copias expresan FRAXE, su isla CpG está metilada y sufren de retraso mental, similar al comportamiento observado en *FMR-1* con relación a la mutación completa por aumento de repetidos. Las mujeres con más de 200 copias también expresan el sitio frágil y en ocasiones presentan retraso mental, en tanto que los individuos portadores presentan una amplificación entre 116 -133 copias son citogenéticamente negativos y tienen fenotipo normal. La expansión puede disminuir cuando pasa de un varón a su hija portadora pero se refiere que no disminuye cuando pasa de madre a hijo afectado; sin embargo estudios en una familia descrita por Knight y cols (1996) demostraron una disminución de la expansión cuando pasó de una portadora ( $\Delta=1700\text{pb}$ ) a su hijo afectado ( $\Delta=1300\text{pb}$ ). Por otro lado se ha visto por estudios moleculares que los individuos FRAXE positivos pero fenotípicamente normales presentan mosaicos con amplificaciones pequeñas no metiladas (133 copias) y amplificaciones grandes metiladas (366 copias). Esto podría explicar la penetrancia variable en el fenotipo clínico observado en otras familias con FRAXE en las cuales el retraso mental aparentemente no es coheredado con la expresión del sitio frágil (Sutherland y Baker, 1992).

En un estudio realizado por Zhong y cols. (1996) se observaron las diferencias entre los rangos de repetidos en *FMR-2* en tres diferentes poblaciones. Se analizaron 665 cromosomas de los cuales 416 muestras eran de euro-americanos residentes de Nueva York, 157 de origen chino y 92 de finlandeses, de estas había 459 muestras que eran de sujetos normales y 206 con mutación en *FMR-1*. Se encontraron 27 alelos diferentes con un rango de 4 a 39 repetidos de GCC, el repetido más común entre los euro-americanos y los finlandeses fue de 16, mientras que

en los chinos fue de 18.

Por otra parte a diferencia con *FMR-1* donde existen interrupciones por secuencias AGG dentro del repetido CGG, la secuenciación de *FMR-2* no mostró imperfecciones dentro del repetido GCC, por lo que el tamaño y rango limitado del repetido y la ausencia de estas interrupciones sugiere que el mecanismo que lleva a la mutación completa de *FMR-2* pueda ser diferente de la observada en *FMR-1* (Zhong y cols., 1996).

Parece existir una correlación entre el grado de RM de los pacientes y el incremento de la expansión del trinucleótido aunque en general el RM en FRAXE es moderado (Knigh y cols, 1993). Por otro lado también en este gen, al igual que en *FMR-1* han sido caracterizadas deleciones en un número pequeño de pacientes (Gedeon y cols.,1995; Geetz y cols., 1996).

El gen *FMR-2* se expresa como un transcrito de 9.0 kb principalmente en cerebro y placenta (Gedeon y cols., 1995; Gu y cols.,1996). La función exacta de la proteína no se conoce pero algunos hallazgos han demostrado que la proteína FMR-2 tiene gran similitud con la proteína AF4 (Gu y cols.,1992; Morrisey y cols.,1993) así como también con la LAF4 (Ma y Staudt,1996). El gen AF4 fue originalmente aislado de una traslocación t(4;11)(q21;q13) en la leucemia aguda linfoblástica en tanto que LAF4 fue aislado de células de linfoma de Burkitt (Ma y Staudt,1996). Se sabe que esta familia de genes son reguladores de la transcripción, presumiblemente se traducen en grandes proteínas hidrofílicas (140 kDa) ricas en residuos de serina y prolina y se localizan dentro del núcleo de las células (Geetz y cols., 1997).

Una isoforma pequeña de la proteína FMR-2 de ~1.5 kb denominada Ox19 fue detectada por Chakrabarti y cols en 1996. Estudios moleculares con Ox19 demuestran que esta isoforma pequeña tiene una expresión significativamente menor que la forma completa de 9.0 kb (Geetz y cols.,1997).

Actualmente, la caracterización de la expansión de trinucleótidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su confirmación por Southern blot así como la observación de

la metilación de la isla CpG por enzimas de restricción permite la identificación de los individuos afectados por una mutación completa y de los portadores de premutaciones. Estos avances han permitido brindar un diagnóstico y un asesoramiento genético a las familias con este padecimiento (Knight y cols, 1993; Hamel y cols, 1994; Mulley y cols, 1995; Gecz y cols, 1997).

## JUSTIFICACION

En el Instituto Nacional de Pediatría existe un gran número de pacientes con retraso mental idiopático que acuden a la consulta externa de Genética, algunos de ellos, tienen características clínicas compatibles con Xfra, varios son casos familiares y en un estudio previo se consideró como posibilidad diagnóstica al síndrome de Xfra; por lo que se realizó el análisis molecular del gen *FMR-1* mediante PCR y Southern blot buscando aumento en los repetidos CGG, en este estudio se encontró la mutación completa en el 5% de la población estudiada (n = 40) quedando el 95% de los casos sin diagnóstico (González del Angel., 1997), por lo que una segunda posibilidad es que el RM se deba a mutaciones en *FMR-2*.

Dado lo anterior, en este estudio se realizó el tamizaje mediante PCR para identificar a los posibles individuos afectados con FRAXE en una población de pacientes masculinos con retraso mental idiopático, en los cuales previamente se había establecido que no presentaban mutaciones por aumento de trinucleótidos CGG en el gen *FMR-1*.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### Captación y estudio clínico de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 43 individuos masculinos con retraso mental idiopático (RMI) que acudieron a la consulta de Genética. A todos los pacientes se les elaboró una historia clínica completa con árbol genealógico. A todos los casos índice se les realizó previamente tamiz metabólico en orina, cariotipo en sangre periférica con bandas G y una tomografía axial computada de cráneo con el fin de descartar otras patologías responsables del retraso mental, así como estudio molecular de *FMR-1* para descartar síndrome de X frágil mediante PCR y Southern Blot.

### Obtención de DNA

Para la obtención de DNA de los pacientes con RMI y de sus familiares de primer grado, se extrajeron de 10 a 15 ml de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante. El DNA se obtuvo a partir de leucocitos por la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (Blin y Stafford., 1976).

### Cuantificación del DNA

Se diluyó 1  $\mu\text{l}$  de la muestra de DNA en 249  $\mu\text{l}$  de agua estéril y se registró la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. Para cuantificar la concentración de DNA se aplicó la siguiente fórmula:

$$(\text{D.O}) (\text{F}) (\text{dil}) = (\text{DNA}) (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

donde:

D.O = densidad óptica a 260 nm.

F = constante equivalente a 0.05 (50 ng de DNA = 1 D.O)

dil = volumen de dilución equivalente a 250  $\mu\text{l}$ .

### Integridad del DNA

La integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis, mezclando 1  $\mu\text{l}$  de la muestra con 2  $\mu\text{l}$  de colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05% : 0.05%) y 7  $\mu\text{l}$  de agua estéril. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 minutos a 100 voltios en un gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio; posteriormente el DNA se observó en un transiluminador con luz ultravioleta y se tomaron las fotografías.

### Tamizaje de FRAXE mediante PCR.

Con el fin de contar con un método rápido y no radioactivo para identificar pacientes con aumento en el número de repetidos GCC en el gen *FMR-2* y su posterior confirmación por Southern blot se estandarizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo a Wang y cols.,1995. Se mezclaron 2 µl de DNA de cada muestra con 20 pmol de los iniciadores:

598 5'GCGAGGAAGCGGCGGCAGTGGCACTGGG3'

603 5'CCTGTGAGTGTGTAAGTGTGTGATGCTGCCG3'

2.5 U de Taq polimerasa, buffer de reacción 1X, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 127.5 µg/ml de albúmina sérica bovina, 200 µM de cada uno de los trinucleótidos dATP, dCTP, dTTP; así como 150 µM de dGTP, 50 µM de 7-deaza-2'dGTP y 10% de dimetilsulfóxido todo en un volumen final de 50µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 480) bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial durante 13 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C por 45 segundos, alineación a 63°C por 90 segundos y extensión a 70°C por 2 minutos. Las muestras fueron sometidas a una extensión final a 72°C por 3 minutos.

Se tomaron 15 ml del producto para analizarlo por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. El producto de amplificación esperado tiene un tamaño mínimo de 306 pb en los varones normales; mientras que la ausencia de la amplificación sugiere la presencia de premutaciones o mutaciones completas que deben confirmarse por Southern blot. Este estudio no es útil para el tamizaje en mujeres ya que la presencia del alelo normal enmascara el resultado.



## RESULTADOS

### Estudio clínico y genético

Se analizaron 43 pacientes masculinos que acudieron por retraso mental idiopático (RMI) a la consulta externa de Genética del Instituto Nacional de Pediatría. Las edades oscilaron entre 12 meses a 27 años. Los pacientes se clasificaron en dos grupos de acuerdo a los antecedentes familiares de retraso mental (RM). Las características clínicas que se buscaron en estos pacientes, fueron con base en las presentadas en el síndrome de X frágil ya que inicialmente se les realizó búsqueda molecular de Xfra y aquellos varones que resultaron negativos se incluyeron en este estudio.

En el grupo I se incluyeron 11 pacientes con edades de 3 a 14 años con antecedentes familiares de RM sin una forma de herencia definida (figura 1). Los pacientes 6 y 8 presentaban cara alargada; el 3 y 4 frente prominente; el 1 y 5 pabellones auriculares grandes y 1, 3, 4, 7, 9 tenían crisis convulsivas. Los pacientes 2 y 6 presentaban un coeficiente intelectual (CI) de 50; mientras que el 1, 3, 9 y 11 presentaban un coeficiente global de retraso de 60%, 41%, 58% y 51% respectivamente. Con respecto a los pacientes 4 y 8 se refiere una conducta autista. En el resto de pacientes no se estableció el grado de RM. Cinco de estos pacientes mostraron TAC anormal, siendo el hallazgo en todos ellos de atrofia corticosubcortical leve, sin otros datos de disgenesia cerebral, hallazgo que no explica el RM (Tabla 1).

El grupo II estuvo constituido por 32 pacientes que eran casos únicos de RM en la familia (figura 2), las edades de estos se encontraban entre 2 y 27 años, sólo uno presentaba cara alargada, 5 con frente prominente, 8 con pabellones auriculares grandes y 8 de ellos con crisis convulsivas.

Los pacientes 7 y 18 presentaban un CI de 54 y 31. Mientras que los pacientes 3, 12, 14, 27, 28 y 29, tenían un coeficiente global de retraso de 18%, 42%, 67%, 25%, 60% y 40%

respectivamente, el paciente 11 mostró deficiencia mental superficial y el 21, conducta autista. El resto de ellos no contaba con estudio psicológico para determinar el grado de RM. En cuanto al paciente 32 era adoptado por lo que se desconocen los antecedentes familiares (Tabla 2).

#### Cuantificación e integridad del DNA

En todos los casos la concentración de DNA osciló entre 0.8 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y la integridad de este fue óptima en todos los casos (Fig. 3).

#### Estudio molecular del gen *FMR-2* por PCR

El tamizaje inicial mediante PCR se realizó a todos los pacientes, lo cual permitió flanquear la región del gen *FMR-2* donde se localizan los repetidos GCC. El producto de PCR observado tuvo un peso molecular de 291 - 366 pb en todos los casos, lo cual indica que el número de repetidos oscila entre 6 - 53 copias del trinucleótido GCC que es lo considerado como normal (Fig. 4), el análisis se realizó en 2 o 3 ocasiones por muestra.

## DISCUSION

En las últimas décadas, la aplicación de la Biología Molecular a la medicina, ha revolucionado los métodos de diagnóstico de enfermedades como Xfra y FRAXE, donde los estudios tradicionales son inciertos y el cuadro clínico es sumamente variable por lo que la detección tanto de pacientes afectados como de portadores es muy difícil.

Xfra y FRAXE son indistinguibles mediante estudios clínicos y por los métodos convencionales de citogenética, por lo que estos deben ser estudiados a nivel molecular para lograr un diagnóstico diferencial certero.

Los genes responsables de Xfra y FRAXE fueron identificados en 1991 (Yu y cols) y en 1993 (Knight y cols) respectivamente, en ambos la mutación más frecuente es un aumento en el número de repetidos CGG para el primero y GCC para el otro, que se asocia a una metilación de la isla CpG en la región promotora de estos genes lo que origina una pérdida de función del gen y como consecuencia el fenotipo de los pacientes (Pieretti y cols., 1991; Gecz y cols., 1996).

Dadas las dificultades en el diagnóstico y a que en nuestro país se desconoce la frecuencia de estos padecimientos, es necesario contar con estrategias de diagnóstico molecular que simplifiquen la identificación de los casos afectados y a los portadores de la enfermedad ya que los métodos convencionales de citogenética pueden dar falsas positivas o negativas y no es posible diferenciar si se trata de FRAXA o FRAXE.

En la consulta externa de Genética del INP acuden un gran número de pacientes con RM en los cuales no se ha determinado la causa del mismo. En este trabajo se analizó una población de 43 pacientes masculinos con RMI mediante PCR con el fin de encontrar una mutación completa en *FMR-2*. Anteriormente en estos mismos pacientes se realizó la búsqueda de mutación completa en *FMR-1*; la población estudiada, estaba constituida por 31 varones y 9 mujeres, sólo dos de estos pacientes contaban con antecedentes familiares de RM lo que sugirió una forma de herencia dominante ligada a X, 14 pacientes con antecedentes familiares pero sin una forma de

herencia definida y 24 casos únicos en las familias.

En el estudio previo se estableció que Xfra es el responsable del RM en el 5% de la población estudiada quedando 95% de los casos sin causa del RM por lo que se decidió estudiar los pacientes restantes para detectar mutaciones en el gen *FMR-2*, mediante un tamizaje inicial con PCR. Este es un método rápido de realizar y de bajo costo para identificar probables pacientes con FRAXE tomando en cuenta que el diagnóstico certero se establece mediante el análisis de la región de los repetidos por Southern blot.

Al realizar el análisis del expandido GCC mediante PCR, no se encontró ningún individuo afectado con FRAXE en nuestra población. Existen estudios más amplios como el de Holden y cols (1996), quienes analizaron una población de 396 individuos de 2 centros para personas con RM, todos ellos negativos para la expansión del repetido en *FMR-1*. Clínicamente estos individuos presentaban un gran rango de retraso mental ya que 284 de ellos (61.1%) estaban severamente afectados y 46 tenían RM moderado. En cuanto al rango de repetidos en *FMR-2* este fue de 5 - 38 no encontrando individuos con expansión. El alelo más frecuente fue de 15 repetidos de GCC (35.2%), el siguiente más común fue 16 (15.5%) y 18 repetidos el siguiente (11.9%). Los 21 individuos con alelos mayores de 25 repetidos tuvieron un patrón normal por Southern blot. Esto de acuerdo a lo encontrado también por Allingham y Ray (1995), en 300 pacientes masculinos, cuyo rango de repetidos varió de 7 - 35, pero sólo ~2% de los cromosomas analizados tuvieron ~25 repetidos, se menciona que ninguno de estos pacientes tenía RM severo y una buena proporción de pacientes fue referido por más de una indicación (por ejemplo: RM con hiperactividad o autismo y dismorfias), por lo tanto esta población podría incluir candidatos para cualquier forma de RM ligado a X. Por otro lado, destaca el estudio de Holden y cols (1996) en el cual en 19 familias con 2 o más individuos autistas, no encontraron expansión en *FMR-1*, *FMR-2* o FRAXF, lo que sugiere que la expansión en estos tripletes repetidos en estos sitios no son los responsables de fenotipos clínicos de autismo, síndrome de Asperger o autismo atípico en

las múltiples familias estudiadas.

La mutación en *FMR-2* parece ser menos frecuente que la encontrada en *FMR-1* entre los pacientes estudiados, pero debido al fenotipo moderado que muestran los individuos portadores de FRAXE, estos probablemente no acuden tan frecuentemente a solicitar atención médica como los portadores de Xfra, por lo que no se debe descartar la posibilidad de un subdiagnóstico en la población.

El no identificar en este estudio pacientes con FRAXE podría deberse a que la muestra estudiada es pequeña y seleccionada en un hospital de tercer nivel. Es posible que los pacientes con FRAXE que presentan RM moderado se encuentren en hospitales de primero y segundo nivel o en escuelas especiales. Por esta razón este trabajo sienta las bases para el estudio de otras poblaciones como las mencionadas.

Así mismo, mientras se desconozca la frecuencia tanto de FRAXE como de FRAXA en nuestra población consideramos que como parte integral del estudio de pacientes con RMI se debe incluir el estudio molecular de Xfra y FRAXE mediante un tamizaje inicial mediante PCR ya que este ofrece muchas ventajas en ahorro de costos y tiempo para la detección de estos pacientes, y dejar el Southern blot únicamente para los casos en los que no se encuentra amplificado en el PCR y para la detección de mujeres afectadas y portadoras asintomáticas, para permitir así brindar un asesoramiento genético adecuado e incluso diagnóstico prenatal.

**TABLA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL GRUPO DE PACIENTES CON ANTECEDENTE DE RETRASO MENTAL SIN UNA FORMA DE HERENCIA DEFINIDA.**

No. Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Grado de parentesco de familiares con RM	2	2	2	1	2	1 y 2	3	1	2	1 y 3	2
RM por rama materna						+					
RM por rama paterna	+	+	+		+		+		+	+	+
Edad en años	3	6	2	12	14	10	5	4	3	6	4
<b>Características clínicas</b>											
Cara alargada	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Frente prominente	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pabellones grandes	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Prognatismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroorquidismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crisis convulsivas	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
CGR	60%	50%	41%	CA	NR	50%	NR	CA	58%	NR	51%
<b>Estudios de laboratorio</b>											
TAC de cráneo	NI	Anl	Anl	NI	NI	NI	Anl	NI	NI	Anl	Anl

RM: retraso mental, CGR: coeficiente global de retraso, TAC: tomografía computada de cráneo, + presente, - ausente, NI: normal, Anl: anormal.

TABLA 2. CARACTERISTICAS CLINICAS DEL GRUPO DE PACIENTES CON RETRASO MENTAL SIN ANTECEDENTES FAMILIARES.

No. Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Edad en años	6	7	3	8	3	14	5	4	5	2	18	2	5	10	2	6
<b>Características clínicas</b>																
Cara alargada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frente prominente	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Pabellones grandes	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Prognatismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroorquidismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crisis convulsivas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
CGR	NR	NR	18%	NR	NR	NR	46%	NR	NR	NR	DMS	42%	NR	67%	NR	NR
<b>Estudios de laboratorio</b>																
TAC de cráneo	Anl	Anl	Anl	NI	NI	NI	NI	NI	NI	Anl	Anl	Anl	NI	Anl	NI	NI <sup>1</sup>

CGR: coeficiente global de retraso, TAC: tomografía computada de cráneo, + presente, - ausente, DMS: deficiencia mental superficial, NR: no realizado, NI: normal, Anl: anormal.

TABLA 2. CONTINUACION.

No. Paciente	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Edad en años	12	9	2	5	7	2	6	9	9	5	16	6	1	4	27	13
Características clínicas																
Cara alargada	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frente prominente	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Pabellones grandes	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Prognatismo	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Macroorquidismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crisis convulsivas	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
CGR	NR	69%	NR	NR	CA	NR	NR	NR	NR	NR	25%	60%	40%	NR	NR	NR
Estudios de laboratorio																
TAC de cráneo	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NR	NI	NI	Anl	NR	NI	NR	NI	NR	NR

CGR: coeficiente global de retraso, TAC: tomografía computada de cráneo, + presente, - ausente, NR: no realizado, NI: normal, Anl: anormal.



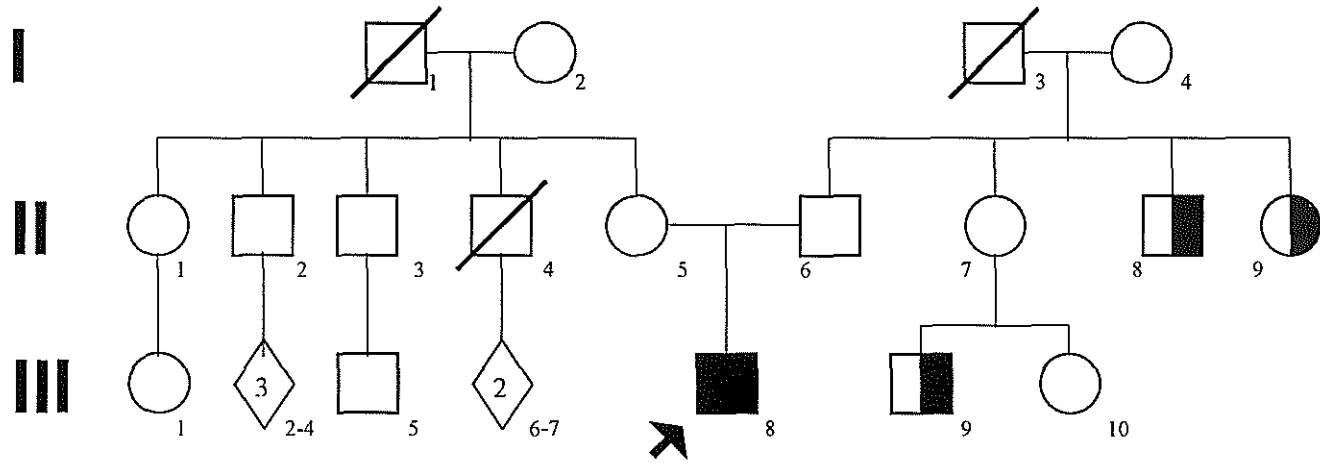


Figura 1. Árbol genealógico del paciente 1 con antecedente de retraso mental (RM) sin un patrón de herencia definido. La flecha indica el caso índice; II<sub>8</sub> y II<sub>9</sub>, RM, alteración conductual y agresividad, III<sub>9</sub>, RM principalmente en lenguaje.

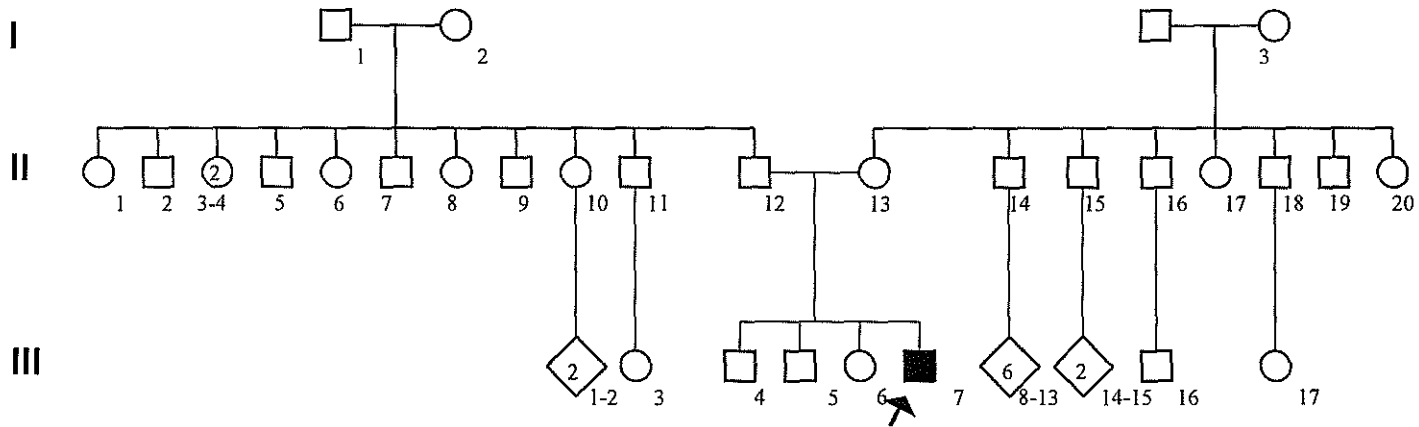


Figura 2. Árbol genealógico del paciente 12 sin antecedentes familiares de retraso mental (RM). La flecha indica el caso índice.

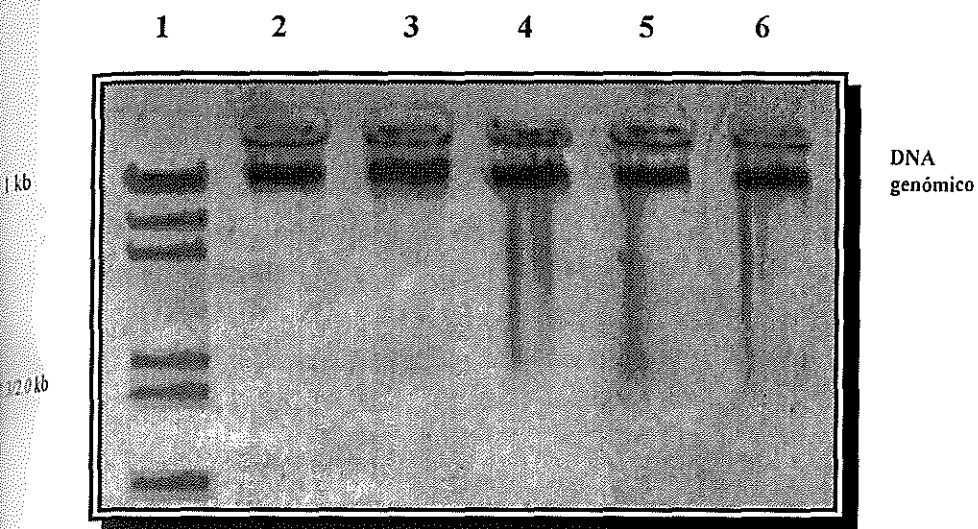


Figura 3. Integridad de DNA genómico. Carril 1, marcador de peso molecular fago  $\lambda$ /HindIII; carriles 2 al 6, DNA de pacientes con retraso mental idiopático.

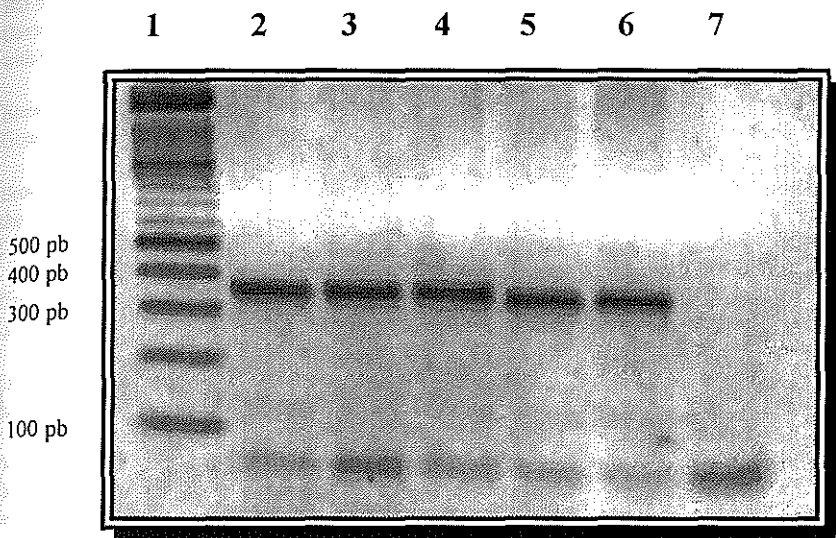


Figura 4. Estudio de los repetidos GCC en el gen FMR-2 por PCR. Carril 1, marcador de peso molecular ladder 100 pb; carriles 2 al 5, pacientes con retraso mental idiopático sin aumento de repetidos GCC; carril 6, control normal; carril 7, blanco.

## BIBLIOGRAFIA

- Abrams M. T., Doheny K. F., Mazzoco M. M., Knight S. J. L., Baumgardner L., Freud L. S., Davies K. E., Reiss A. L. (1997). Cognitive, behavioral, and neuroanatomical assesment of two unrelated male children expressing FRAXE. *Am. J. Med. Genet.* 74, 73-81
- Allingham-Hawkins D.J y Ray P. N. (1995). FRAXE expansion is not common etiological factor among developmentally delayed males. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 72-76.
- Barnicoat A. J., Wang Q., Turk J., Green E., Mathew C. G., Flynn G., Buckle V., Hirst M., Davies K., Bobrow M. (1997). Clinical, cytogenetic, and molecular analysis of three families with FRAXE. *J. Med Genet.* 34, 13-17.
- Brown T. W. (1996). The FRAXE syndrome: Is it time for routine screening?. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 903-905.
- Brown T. C., Tarleton J. C., Go R. C. P., Longshore J. W., Descartes M. (1997). Instability of the FMR2 trinucleotide repeat region associated with expanded FMR1 alleles. *Am. J. Med. Genet.* 73, 447-455.
- Carbonell P., López I., Gabarrón J., Bernabé M. J., Lucas J. M., Guitart M., Gabau E., Glover G. (1996). FRAXE mutation analysis in three spanish families. *Am. J. Med. Genet.* 64, 434-440.
- Chakrabarti L., Knight S. J. L., Flannery A. V., Davies K. E. (1996). A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site. *Hum. Mol. Genet.* 5, 275-282.
- De Boulle K., Verkerk A. J., Reyners E., Vits L., Hendrickx J., Van Roy B., Van Den Bos F., de Graaff E., Oostra B. A., Willems P. J. (1993). A point mutation en the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* 3, 31-35.
- Flynn G. A., Hirst M. C., Knight S. J. L., Macpherson J. N., Barber J. C. K., Flannery A. V., Davies K. E., Buckle V. J. (1993). Identification of the FRAXE fragile site in two families ascertained for X linked mental retardation. *J. Med. Genet.* 30, 97-100.
- Geetz J., Gedeon A. K., Sutherland G. R., Mulley J. C. (1996). Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nature Genet.* 13, 105-108.
- Geetz J., Bielby S., Sutherland G. R., Mulley J. C. (1997). Gene structure and subcellular localization of FMR2, a member of a new family of putative transcription activators. *Genomics* 44, 201-213.
- Geetz J., Oostra B. A., Hockey A., Carbonell P., Turner G., Haan E. A., Sutherland G. R., Mulley J. C. (1997). FMR2 expression in families with FRAXE mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* 6, 435-441.
- Gedeon A. K., Keinänen M., Kääriäinen H., Geetz J., Baker E., Sutherland G. R., Mulley J. C. (1995). Overlapping submicroscopic deletion in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: Identification of a gene near FRAXE. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 907-914.

González del Angel A. (1997). Diagnóstico molecular del síndrome de X frágil en pacientes con retraso mental idiopático. Tesis de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular CINVESTAV. IPN.

Gu Y., Shen Y., Gibbs R. A., Nelson D. L. (1996). Identification of FMR2 , a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nature Genet.* 13, 109-113.

Hamel B. C. J., Smits A. P. T., Graaff E., Smeets D. F. C. M., Schoute F., Eussen B. H. J., Knigh S. J. L., Davies K. E., Assman-Hulsman C. F. C. H., Oostra B. A. (1994). Segregation of FRAXE in a large family : Clinical, psychometric, cytogenetic and molecular data. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 923-931.

Hirst M. C., Barnicoat A., Flynn G., Wang Q., Daker M., Buckle V. J., Davies K. E., Bobrow M. (1993). The identification of a third fragile site , FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum. Mol. Genet.* 2, 197-200.

Holden J. J. A., Julien-Inalsingh C., Chalifoux M., Wing M., Scott E., Fidler K., Swift I., Maidment B., Knigh S. J. L., Davies K. E., White B. N. (1996). Trinucleotide repeat expansion in the FRAXE locus is not common among institutionalized individuals with non-specific developmental disabilities. *Am. J. Med. Genet.* 64, 420-423.

Holden J. J. A., Wing M., Chalifoux M., Julien-Inalsingh C., Schutz C., Robinson P., Szatmari P., White B. N. (1996). Lack of expansion of triplet repeats in the FMR1, FRAXE, and FRAXF loci in male multiplex families with autism and pervasive developmental disorders. *Am. J. Med. Genet.* 64, 399-403.

Knight S. J. L., Flannery A. V., Hirst M. C., Campbell L., Chistodoulou Z., Phelps S. R., Pointon J., Middleton-Price H. R., Barnicoat A., Pembrey M. E., Holland J., Oostra B. A., Bobrow M., Davies K. E. (1993). Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell.* 74, 127-134.

Knight S. J. L., Voeckel M. A., Hirts M. C., Flannery A. V., Moncla A., Davies K. E. (1994). Triplet repeat expansion at the FRAXE locus and X linked mild mental handicap. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 81-86.

Knight S. J. L., Ritchie R. J., Chakrabarti L., Cross G., Taylor G. R., Mueller R. F., Hurst J., Paterson J., Yates J. R. W., Dow D. J., Davies K. E. (1996). A study of FRAXE in mentally retarded individuals referred for fragile X syndrome (FRAXA) testing in the United Kingdom. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 906-913.

Meadows K. L., Pettay D., Newman J., Hersey J., Ashley A. E., Sherman S. L. (1996). Survey of the fragile X syndrome and the fragile X E syndrome in a special education needs population. *Am. J. Med. Genet.* 64, 428-433.

Meijer H., de Graaff E., Merckx D. L. M., Jongbloed R. J. E., de Die-Smulders C. E. M., Engelen J. J. M., Fryns J. P., Curfs P. M. G., Oostra B. A. (1994). A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR-1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3, 615-620.

Morton J. E., Bunday S., Webb T. P., MacDonald F., Rindl P. M., Bullock S. (1997). Fragile X syndrome is less common than previously estimated. *J. Med. Genet.* 34, 1-5.

Mulley J. C., Yu S., Loesch D. Z., Hay D. A., Donnelly A., Gedeon A.K., Carbonell P., López I., Glover G., Gabarrón I., Yu P. W. L., Baker E., Haan E. A., Hockey A., Knight S. J. L., Davies K. E., Richards R. I., Sutherland G. R. (1995). FRA<sub>XE</sub> and mental retardation. *J. Med. Genet.* 32, 162-169.

Murgia A., Polli R., Vinanzi C., Salis M., Drigo P., Artifoni L., Zacchello F. (1996). Amplification of the Xq28 FRA<sub>XE</sub> repeats: Extreme phenotype variability?. *Am. J. Med. Genet.* 64, 441-444.

Murray A., Youings S., Dennis N., Latsky L., Linehan P., McKechnie N., Macpherson J., Pound M., Jacobs P. (1996). Population screening at the FRA<sub>XA</sub> and FRA<sub>XE</sub> loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum. Mol. Genet.* 5, 727-735.

Murray A., Macpherson J. N., Pound M., Sharrock A., Youings S. A., Dennis N. R., McKechnie N., Linehan P., Morton N. E., Jacobs P.A. (1997). The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRA<sub>XA</sub> and FRA<sub>XE</sub> alleles during transmission. *Hum. Mol. Genet.* 6, 173-184.

Nelson D. L. (1993). Fragile X syndrome: Review and current status. *Growth Genetics and Hormones* 2, 1-4.

Nussbaum R. L. y Ledbetter D. H. (1995). The fragile X syndrome. En *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver, C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (New York, USA: McGraw-Hill, Inc.) pp.795-810.

Ritchie R. J., Knight S. J. L., Hirst M. C., Grewal P. K., Bobrow M., Cross G. S., Davies K. E. (1994). The cloning of FRA<sub>XF</sub>: trinucleotide repeat expansion and methylation at a third fragile site in distal Xqter. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2115-2121.

Rousseau F., Heitz D., Biancalana V., Blumenfeld S., Kretz C., Boué J., Tommerup N., Van Der Hagen C., DeLozier-Blanchet C., Croquette M., Gilgerkrantz S., Jalbert P., Voelckel M., Oberlé I., Mandel J. L. (1991). Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N. Engl. J. Med.* 325, 1673-1681.

Russo S., Selicorni A., Bedeschi M. F., Natacci F., Viziello P., Fortuna R., Pagani G., Dalpra L., Larizza L. (1998). Molecular characterisation of FRA<sub>XE</sub> positive subjects with mental impairment in two unrelated Italian families. *Am. J. Med. Genet.* 75, 304-308.

Sutherland G. R. y Baker E. (1992). Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum. Mol. Genet.* 1, 111-113.

Syrrou M., Georgiou I., Grigoriadou M., Petersen M.B., Kitsiou S., Pagoulatos G., Patsails P. C. (1998). FRA<sub>XA</sub> and FRA<sub>XE</sub> prevalence in patients with nonspecific mental retardation in the Hellenic population. *Gen. Epidemiol.* 15, 103-109.

Tarleton J. C. y Saul R. A. (1993). Molecular advances in fragile X syndrome. *The Journal of Pediatrics.* 122, 169-185.

Turner G., Webb T., Robinson H. (1996). Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 64, 196-197.

Van Rijn M., de Vries B. B. A., Tibben A., Van den Ouweland A. M. W., Halley D. J. J., Niermeijer M. F. (1997). DNA testing for fragile X syndrome : implications for parents and family. *J. Med Genet.* 34, 907-911.

Verma R. S. Y Babu A. (1989). *Human chromosomes manual of basic techniques.* (USA: Pergamon Press) pp. 117-124.

Wang Q., Green E., Bobrow M., Mathew C. G. (1995). A rapid, non radioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J. Med. Genet.* 32, 170-173.

Yu S., Pritchard M., Kremer E., Lynch M., Nancarrow J., Baker E., Holman K., Mulley J. C., Warren S. T., Schlessinger D., Sutherland G. R. Richards R. I. (1991). Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252, 1179-1181.

Zhong N., Ju W., Curley D., Wang D., Pietrofesa J., Wu G., Shen Y., Pang C., Poon P., Liu X., Gou S., Kajanoja E., Ryyänen M., Dobkin C., Brown T. (1996). A survey of FRAXE allele sizes in three populations. *Am. J. Med. Genet.* 64, 415-419.