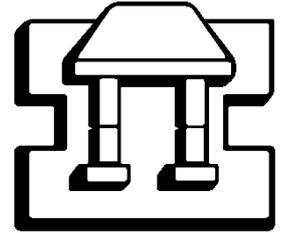




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA. HOSPITAL DE PEDIATRÍA. CMNSXXI. IMSS

**DISTRIBUCIÓN DE REPETIDOS *CGG* Y  
PATRÓN DE INTERRUPCIONES *AGG* DEL GEN  
*FMR1* EN MESTIZOS E INDÍGENAS MEXICANOS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

**P R E S E N T A**

**CASTILLO GONZÁLEZ NOEMÍ GRISEL**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. MIGUEL A. VELÁZQUEZ FLORES

CODIRECTOR:  
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

México, D.F.

2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## ÍNDICE

<b>1. AGRADECIMIENTOS</b> -----	6
<b>2. RESUMEN</b> -----	7
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> -----	8
<b>3.1. Síndrome de X Frágil</b> -----	9
<b>3.2. Patrón de herencia</b> -----	10
<b>3.3. Manifestaciones Clínicas</b> -----	12
<b>3.4. Diagnóstico Molecular</b> -----	13
<b>3.4.1. RT- PCR</b> -----	14
<b>3.4.2. Southern-Blot</b> -----	15
<b>3.4.3. Inmunohistoquímica</b> -----	16
<b>3.4.4. Análisis de raíz de cabello</b> -----	16
<b>3.5. Tratamiento</b> -----	17
<b>4. LA PROTEÍNA FMRP</b> -----	18
<b>5. GEN <i>FMRI</i></b> -----	23
<b>5.1. Morfología</b> -----	23
<b>5.2. Evolución en mamíferos</b> -----	24
<b>5.3. Interrupciones AGG asociadas a la inestabilidad del triplete CGG</b> -----	26
<b>5.4. Metilación del gen</b> -----	28
<b>5.5. Prevalencia en la población mundial</b> -----	30
<b>5.6. Polimorfismos en poblaciones Americanas</b> -----	32
<b>6. ANTECEDENTES</b> -----	34
<b>7. JUSTIFICACIÓN</b> -----	36
<b>8. HIPÓTESIS</b> -----	36
<b>9. OBJETIVO</b> -----	36
<b>9.1. Objetivo Particular</b> -----	36
<b>10. METODOLOGÍA</b> -----	37
<b>10.1. Poblaciones de estudio</b> -----	37
<b>10.2. Extracción de DNA por el método de Sales</b> -----	37
<b>10.3. Prueba de Integridad de DNA en geles de agarosa</b> -----	38
<b>10.4. Pruebas de Amplificación</b> -----	38
<b>10.4.1. Separación electroforética en gel de agarosa</b> -----	39
<b>10.5. Purificación de geles de Agarosa</b> -----	39
<b>10.6. Secuenciación</b> -----	40

<b>11. RESULTADOS</b> -----	41
11.1.    Integridad de DNA-----	41
11.2.    Amplificación de repetidos CGG por PCR-----	42
11.3.    Secuenciación-----	44
<b>12. DISCUSIÓN</b> -----	45
<b>13. CONCLUSIÓN</b> -----	49
<b>14. BIBLIOGRAFÍA</b> -----	50
<b>15. ABREVIATURAS</b> -----	54

### ÍNDICE DE FIGURAS

1. Cromosoma X Fragil-----	9
2. Patrón de herencia del SXF-----	11
3. Herencia del SXF vista por PCR-----	11
4. Rasgos fenotípicos de individuos con SXF-----	12
5. Amplificación del gen <i>FMRI</i> mediante RT-PCR-----	14
6. Análisis por Southern Blot con la sonda StB12.3-----	15
7. Inmunohistoquímica de linfocitos humanos-----	16
8. Detección de la proteína FMRP en raíz de cabello -----	17
9. Western blot de FMRP -----	18
10. Representación de la estructura de la proteína FMRP (3D) -----	19
11. Interacción de los genes y las proteínas de la red de <i>FMRI</i> -----	19
12. Regulación de FMRP por receptores de glutamato y de BDNF -----	21
13. Efecto de la ausencia de FMRP -----	22
14. Localización de repetidos CGG he interrupciones AGG del <i>FMRI</i> -----	23
15. Tipos de alelos del gen <i>FMRI</i> humano -----	24
16. Explicación esquemática del deslizamiento de la polimerasa -----	26
17. Posición y metilación de las islas CpG en el gen <i>FMRI</i> -----	28
18. Procesos de metilación del DNA-----	29
19. Haplotipos de <i>FMRI</i> identificados en población canadiense -----	32
20. Haplotipos de <i>FMRI</i> identificados en población Brasileña-----	33
21. Diagnóstico molecular del SXF 2010-2011-----	34
22. Prueba de PCR-RT para la detección de transcritos del gen <i>FMRI</i> -----	35
23. Condiciones de amplificación de repetidos CGG -----	39

24. Integridad del DNA de las poblaciones indígenas-----	41
25. Amplificación del gen <i>FMR1</i> en indígenas y mestizos mexicanos -----	42
26. Longitud del fragmento en pb, obtenido en poblaciones Mexicanas -----	43
27. Número de repetidos en poblaciones Mexicana -----	43
28. BLAST de la secuencia obtenida, del gen <i>FMR1</i> -----	44
29. Secuencia obtenida a partir del DNA de un hombre mestizo -----	44
30. Número de repetidos reportados para la población mundial -----	46
31. Número de repetidos reportados en poblaciones americanas estudiadas-----	47

### INDICE DE TABLAS

1. Interacción de proteínas con <i>FMRP</i> -----	20
2. Repetidos <i>CGG</i> del gen <i>FMR1</i> en diferentes mamíferos-----	25
3. Distribución continental de repetidos <i>CGG</i> del gen <i>FMR1</i> -----	30
4. Prevalencia continental del <i>SXF</i> -----	31
5. Condiciones de amplificación de repetidos <i>CGG</i> -----	38



*“Debemos dejar de ver el mundo de la ciencia desde un enfoque reduccionista,  
por que las respuestas a sus cuestionamientos  
están en el entendimiento sistémico”*

**Dr. Diego Julio Arenas Aranda**

## 1. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, por darme las herramientas para concluir con esta etapa de mi vida, gracias a mi padre por regalarme los hábitos de la disciplina, la dedicación y el perfeccionismo para cada cosa que emprendo en mi vida. Gracias a mi madre por darme el espíritu de lucha y enseñarme a evitar la autocompasión para conseguir mis metas. Gracias mis hermanas por creer en mí y no perder la fe aunque este fuera un proceso largo. Gracias a mi mamá Vitori, por que aunque siempre me hizo falta que viera como el esfuerzo valió la pena, ella siempre estará presente en mi corazón y en todos mis logros. Gracias a Rafael, por acompañarme en esta aventura y alentarme a terminar la carrera; gracias por darme las más grandes alegrías de mi vida, ser mamá. Gracias a todas las personas que contribuyeron en mi enriquecimiento intelectual y fomentaron en mí el hábito de cuestionarme el entorno en el que vivo, especialmente a mis asesores de tesis, Miguel, Ruth, Xchel, Alex y Metztli quienes me mostraron la mayor paciencia y aliento cuando los experimentos no salían en el tiempo esperado. Gracias al Dr. Diego julio Arenas Aranda, por regalarme el amor a la ciencia, el hambre de conocimiento, la humildad para aceptar mis errores y mostrarme la sencillez que puede tener la persona más brillante que conocí algún día. Gracias a mis grandes amigos y jefes laborales, ejemplo de gente luchadora y exitosa, Arq. Valentín Reyes Jiménez y Luis Gutiérrez Canseco, que me apoyaron en este largo camino y que me concedieron los permisos para salir temprano, estudiar, hacer mis tareas y preparar presentaciones en horario laboral, aunque no fuera su obligación apoyarme. Gracias a mi ex entrenador y ex padrino de AA, Maximino Mendoza, por no solo fomentar en mí el amor al deporte, si no por darme el mayor de los regalos, conocer a Dios, por que si no me hubiera mostrado el camino, tal vez yo no estaría este día escribiendo estas palabras para las personas más importantes de mi vida.

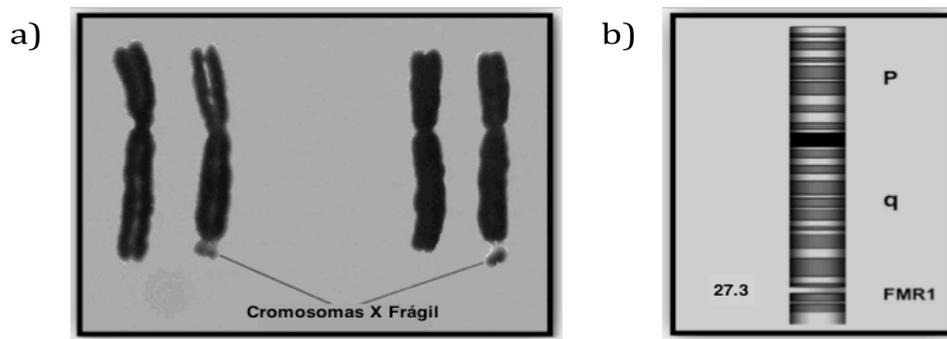
Agradezco infinitamente a cada persona presente en estas palabras, pero sobre todas las cosas, te agradezco a ti mi **Dios** por nunca abandonarme y por acompañarme en cada paso de esta vida tan llena de lucha aunque hubiera perdido el camino. Gracias por bendecirme de esta forma tan perfecta, por que mi vida jamás hubiera tomado este rumbo de no haber llegado tu a ella para cambiarla.

## 2. RESUMEN

El Síndrome de X Frágil (SXF), es una enfermedad neurológica hereditaria causada por la pérdida de la Proteína Asociada al Retraso Mental X Frágil (FMRP). Genéticamente hablando, el SXF es el resultado de la expansión del triplete CGG en la región no codificadora del extremo 5' del gen Gen 1 de retraso mental X Frágil (*FMRI*), lo cual induce la metilación de la secuencia, inactiva al gen y bloquea la síntesis de la proteína FMRP. El diagnóstico molecular realizado en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría en CMNSXXI del IMSS, en 60 pacientes con diagnóstico clínico de Discapacidad Intelectual (DI) y SXF positivo, mediante el análisis de la presencia del transcrito de la proteína FMRP por medio de RT-PCR punto final, arrojó que únicamente un paciente tenía ausencia del transcrito en cuestión ( $P=0.016\%$ ). Con base en estos resultados, el objetivo del presente estudio, es determinar si la baja incidencia de pacientes con SXF está asociada al número de tripletes repetidos CGG y de interrupciones AGG presentes en poblaciones indígenas y mestizas establecidas en México. **Material y métodos:** Para cumplir el objetivo planteado, se amplificó la región no codificadora del extremo 5' del gen *FMRI*, por PCR punto final, usando como buffer una mezcla de Formamida-BSA-DMSO (método modificado de Martínez-López). La amplificación se hizo a partir de muestras de DNA de diferentes poblaciones mexicanas: Otomíes, Tarahumaras, Mixtecos, Nahuas, y Mestizos. Asimismo, la región amplificada de una muestra control fue secuenciada para establecer su número de repetidos e interrupciones. **Resultados:** Nuestros resultados indican que el uso de Formamida-BSA-DMSO, aunado al reactivo CG-Melt favorece la amplificación de la región polimórfica del gen en individuos normales. El tamaño de repetidos CGG encontrados en la población mexicana fue corto (15-23) en comparación con las poblaciones caucásicas estudiadas del mundo (33-29). **Conclusiones:** El número de repetidos GCG es polimórfico, como se refleja en las poblaciones indígenas Mixteca, Tatahumara y Mestiza, aunque algunas poblaciones parecen tener cierta homogeneidad como las poblaciones indígenas Otomís, Nahuas y Zapotecas. Todas estas poblaciones estudiadas, presentaron un número de repetidos corto, por lo que se concluye que este polimorfismo está relacionado con la baja incidencia del SXF en población mestiza mexicana.

### 3. INTRODUCCIÓN

La discapacidad intelectual (DI) se define como una condición de desarrollo detenido o incompleto del cerebro. Se caracteriza especialmente por la alteración de habilidades que se manifiestan durante el periodo de desarrollo y que contribuyen al nivel global de inteligencia, es decir; habilidades cognitivas, motoras, de lenguaje y sociales (Organización Mundial de la Salud, 2004). Para evaluar el coeficiente intelectual (IQ), generalmente se utilizan pruebas con una media de 100 y una desviación estándar de 1.5; en este contexto, la DI se determina mediante la evaluación de un  $IQ < 70$  (Ropers, 2010). Tanto factores genéticos como ambientales son la causa de numerosos casos de DI, de los cuales, un rango de entre 30-50% siguen siendo desconocidos (Daily et al., 2000). Se cree que las anomalías en los genes ligados al cromosoma X, son responsables de aproximadamente el 10% de los varones afectados por DI, colocando al Síndrome de X frágil (SXF) como su causa más común (Ropers y Hamel, 2005). El SXF fue descubierto en 1943 por Martin y Bell al estudiar un pedigrí de 11 varones afectados por retraso mental, que sugería una herencia ligada al sexo. Los individuos presentaban rasgos fenotípicos como: Cejas y ojos separados, cara alargada, asimetría facial y orejas prominentes. Sin conocimiento de la anomalía citogenética, el cuadro clínico de la enfermedad fue denominado como Síndrome de Martin-Bell, en honor a los autores del trabajo (Martin y Bell, 1943). En el año de 1969, el Dr. H. Lubs describió una anomalía cromosómica en dos hermanos con retraso mental y en su madre. La anomalía consistía en un estrechamiento (casi ruptura) de la zona distal del brazo largo del cromosoma X (Fig.1a), que el Dr. Lubs denominó inicialmente como “marcador X” (Lubs, 1969). Posteriormente, el aspecto de fragilidad que daba esta zona cromosómica se llamó “sitio frágil”. El término acabó popularizándose y finalmente le dio el nombre definitivo a esta enfermedad: Síndrome de X Frágil. Después de que en el año de 1977, el investigador australiano G. Sutherland demostrara la fragilidad cromosómica en cariotipos hechos en medios carentes de ácido fólico (Fig.1a), con la ayuda de técnicas de bandeado cromosómico se confirmó que el sitio frágil se localiza en el brazo largo del cromosoma X en la banda 27.3 (Fig. 1b) y que se visualiza como una constricción secundaria en la banda 28 (GIRMOGEN, 2006).



**Fig. 1** Cromosoma X; **a)** Cromosomas X Frágil. Se observa la constricción secundaria de Xq28 en medios carentes de ácido fólico; **b)** Localización del gen FMR1 en el cromosoma X; ( Imagen tomada de Raymond, 2006).

### 3.1 Síndrome de X Frágil

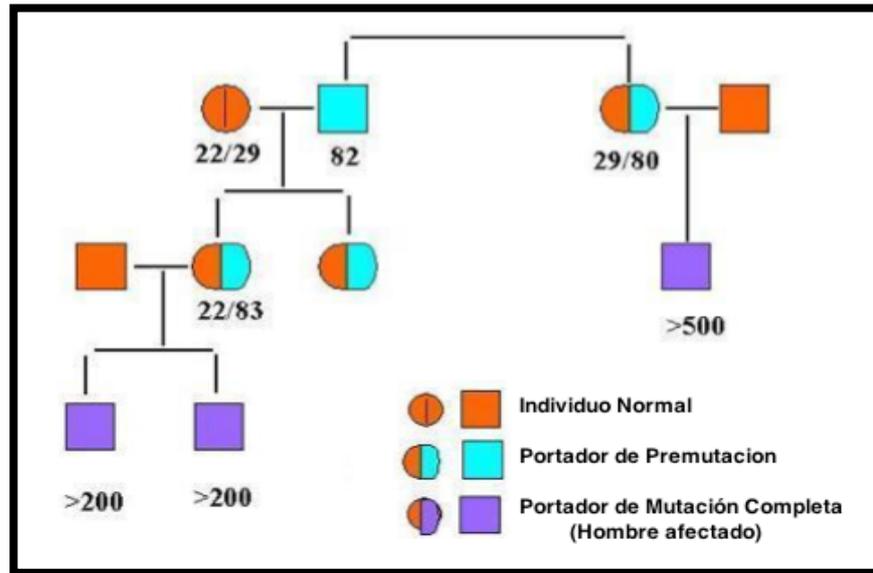
El SXF es una enfermedad neurológica hereditaria causada por la pérdida de la Proteína Asociada al Retraso Mental X Frágil (FMRP), que regula la traducción de proteínas cerebrales (Gross et al., 2010). La pérdida de FMRP altera la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje y la memoria (Mientjes et al., 2005). Genéticamente hablando, el SXF es el resultado de la expansión del triplete CGG en la región no codificadora del extremo 5' del gen *FMRI*. Esta modificación da lugar a la adición de un grupo metilo en la secuencia, lo que inactiva al gen y anula la síntesis de la proteína FMRP (GIRMOGEN, 2006). De acuerdo al número de tripletes repetidos CGG que contenga la región no codificadora del gen *FMRI*, éste se puede clasificar en tres estados: normal (N), con repeticiones de 5 a 55 tripletes; premutación (PM), con repeticiones de 55 a 200 tripletes; y mutación completa (MC), con expansiones superiores a 200 tripletes. En individuos afectados, la MC contiene generalmente, de 1, 000 a 2,000 repeticiones (Kremer et al., 1991; Yu et al., 1991). El SXF ha sido estudiado y caracterizado en diversas poblaciones del mundo (Peprah, 2012). Los últimos estudios acerca la prevalencia (número de individuos afectados desde el 2000) en la población mundial, estiman que su frecuencia en varones es de 1 de cada 4,000 nacimientos y en mujeres 1 de cada 8,000 (Coffee et al., 2009; Garber et al., 2006; Crawford et al., 2001; Murray et al., 1996; Turner et al., 1996). En México, no existen estudios acerca de la prevalencia de la enfermedad pero se ha caracterizado el gen *FMRI* en población normal obteniendo un número de repeticiones variado de entre 16-40 repetidos (Rosales- Reynoso et al., 2005).

### 3.2 Patrón de herencia

El análisis de segregación realizado en familias con X frágil, por parte de Sherman y sus colaboradores (1984), reveló que este síndrome presenta un patrón de herencia que lo diferencia de otras alteraciones genéticas ligadas al cromosoma X. Este hecho fue puesto de manifiesto en 1985, en lo que se llegó a denominar como ‘La paradoja de Sherman’:

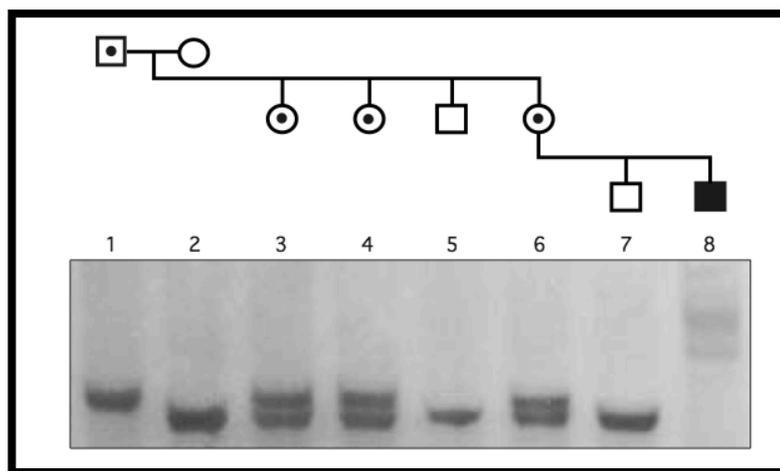
1. No se pueden predecir nuevas mutaciones y todas las madres de los niños afectados resultan ser portadoras.
2. Un 20% de los varones que portan la mutación no expresaban ningún síntoma.
3. Una elevada proporción de mujeres portadoras presentan cierto tipo de déficit mental, mucho menor que los varones.
4. El riesgo de X frágil en los descendientes depende del sexo y del fenotipo del progenitor portador.

Hoy en día, se sabe que el SXF es un trastorno mendeliano de tipo semidominante ligado al cromosoma X con penetrancia incompleta en las mujeres, por lo que sólo el 20% de éstas se ven afectadas, mientras que el 80% de los varones presentan la mutación completa (Felix, 2007; Davidow et al., 1994). La mutación completa se puede transmitir de mujeres portadoras a sus hijos varones mientras que los hombres portadores transmiten la premutación a sus hijas, que a su vez, tienen riesgo de transmitir la mutación completa a sus hijos varones (Fig.2). Las mujeres transmisoras de premutación son portadoras sanas y tienen un riesgo del 50% de transmitir la mutación completa en cada embarazo. (Bronwen y Pirkko, 2000). El riesgo de tener un descendiente afectado con mutación completa, oscila entre el 50-70% si son varones y entre el 3.5-25% si son mujeres. El riesgo de manifestar la enfermedad en una familia con antecedentes de retraso mental, depende del sexo y de la generación a la que pertenezca el individuo (Felix, 2007; Vega et al., 2004).



**Fig.2** Patrón de herencia del SXF. La figura muestra como una madre portadora de la premutación hereda siempre la mutación completa a sus hijos varones, mientras que el padre portador de la premutación solo la hereda a sus hijas. (Tomado de Zeesman et al., 2004).

Las personas con PM pueden tener niveles reducidos de la proteína FMRP, pero la cantidad disponible es suficiente para que las neuronas se desarrollen normalmente; por eso se les denomina portadores “asintomáticos”. Por otra parte, una PM tiende a cambiar de tamaño al pasar de una generación a otra, transmitiéndose de forma inestable y con diferentes consecuencias según el receptor sea hombre o mujer (Fig.3) (GIRMOGEN, 2006).



**Fig. 3.** Herencia del SXF vista por PCR. La MC causante del síndrome (línea 8) se hereda siempre de la madre, mientras que la PM puede heredarse tanto de la madre como del padre. En el ejemplo aquí representado, vemos cómo un varón con PM (línea 1 y señalada en el árbol genealógico mediante un punto) la transmitió a sus hijas, pero no a su hijo, mientras que una de éstas la ha transmitido como MC a uno de sus dos hijos (Tomada de GIRMOGEN,2006).

### 3.3 Manifestaciones Clínicas

En los recién nacidos, el peso al nacer puede ser elevado y se puede observar macrocefalia relativa con una gran fontanela anterior. Por lo general, los pacientes varones adultos tienen estatura alta, testículos grandes, macrocefalia relativa, frente prominente, hipotelorismo, cara larga y estrecha, hipoplasia del tercio medio facial, paladar muy arqueado, mandíbula prominente y orejas grandes (Fig. 4). Este fenotipo, que tiende a ser más marcado con la edad, depende de la presencia de hipotonía muscular congénita acompañada de hiperlaxitud de la articulación (Terracciano et al., 2005). Es muy común el retraso en el habla, además de algunas convulsiones durante la infancia (Musumeci et al., 1991).



**Fig. 4.** Rasgos fenotípicos de individuos con Síndrome de X-frágil. a) (de izquierda a derecha) cejas y ojos separados, cara alargada y asimetría facial, paladar pequeño con dientes prominentes b) (de izquierda a derecha) orejas prominentes e hiperlaxitud de las extremidades (Tomado de a) GIRMOGEN, 2006; b) <http://biogenetica-imaroca.blogspot.mx>)

Un niño con SXF, generalmente es hiperactivo debido a un desequilibrio en las vías sinápticas excitadoras e inhibitoras del Receptor de Glutamato (GluR) y del Receptor de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Este desequilibrio se ha estudiado en cerebros postmortem de pacientes con SXF, en los que se observa un cambio en la morfología de las espinas dendríticas al aumentar de tamaño (Irwin et al., 2001).

El diagnóstico clínico de SXF, se hace a menudo en los niños pequeños de aproximadamente 3 años de edad que presentan retraso en el habla (Bailey et al., 2009). El comportamiento de estos niños, normalmente incluye el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH), impulsividad y ansiedad significativa, así como lenguaje repetitivo, tendencia a morderse las manos, mecerse, y algunas veces golpearse la cabeza (Cordeiro et al., 2011; Sullivan et al., 2006). Estos comportamientos, junto con déficits sociales y de lenguaje, a menudo conducen a un diagnóstico de trastorno autista (ASD) antes del diagnóstico de SXF. Otras observaciones clínicas en la familia pueden revelar el fenotipo de SXF, a veces, una historia familiar de DI, problemas neurológicos (como temblor, ataxia o la demencia en uno de los abuelos) o menopausia precoz (antes de los 40 años de edad), dará lugar al diagnóstico clínico de SXF en la familia. Esto es debido a que en los portadores de la premutación suele observarse una neurodegeneración progresiva con la edad (García-Arocena et al., 2010).

### **3.4 Diagnóstico Molecular**

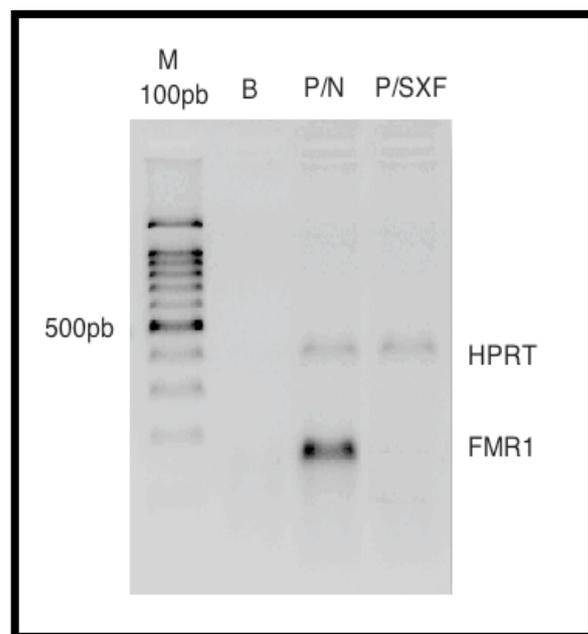
El diagnóstico molecular del SXF debe realizarse mediante el estudio del gen o su transcrito. Actualmente, no debe aceptarse un resultado obtenido mediante un estudio citogenético ya que suele ser poco exacto. Esto es por que para observar el sitio frágil característico, es necesario cultivar las células del paciente (linfocitos o fibroblastos) en un medio carente de ácido fólico y desoxitimidintrifosfato (dTTP) durante, al menos, un ciclo celular. Es decir, es necesario que ocurra la etapa de síntesis de DNA al menos una vez para que esta constricción se manifieste. Que aparezca o no en una célula de una persona afectada es un hecho probabilístico y su presencia suele darse de 5%-20% de las células, por lo que es necesario observar muchas células antes de poder dar un diagnóstico citogenéticamente negativo. El análisis molecular se realiza aplicando 3 técnicas fundamentales; el Southern Blot, que determina el número de repetidos CGG; la PCR que evalúa el estado de metilación de las islas CpG; y la RT-PCR, que detecta la presencia o ausencia del transcrito de la proteína FMRP (Milá et al., 1996; Krayer et al., 1994). Actualmente, las técnicas más comunes utilizadas para el diagnóstico del SXF son:

### 3.4.1 RT- PCR.

Esta técnica de diagnóstico molecular tiene como finalidad detectar transcritos de la proteína FMRP, a partir de RNA total extraído de una muestra de sangre periférica. La RT-PCR emplea una transcriptasa inversa para realizar la síntesis del DNA complementario (cDNA) al RNA por lo que el desarrollo inicial de una RT-PCR es:

- 1° Retrotranscripción a partir del RNA
- 2° Amplificación a partir del cDNA

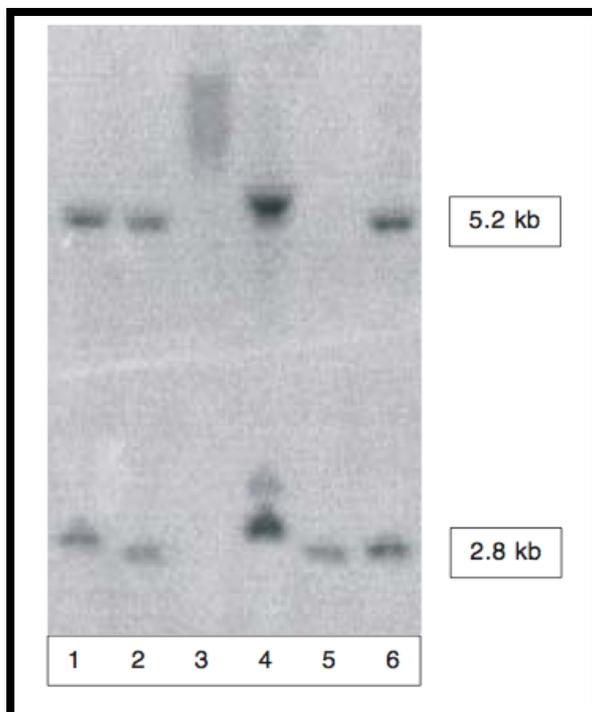
Esta prueba nos permite saber si el gen está activo dentro de la maquinaria celular, al detectar la presencia del transcrito (Fig. 5) ya que en una persona con SXF, el gen *FMRI* se encuentra inactivo por lo que no produce su transcrito y por tanto, tampoco la proteína para la que codifica (FMRP). La limitación de esta técnica se encuentra en que no proporciona información sobre el número de repetidos CGG, por lo que no detecta premutaciones, además, no permite diagnosticar a mujeres debido a que tienen 2 cromosomas X y pueden ser tanto homocigotas como heterocigotas (Durán et al., 2001). Esta técnica es útil para diagnosticar a varones con DI, que cuenten con un historial clínico en el que convergen las características determinantes de SXF.



**Fig. 5.** Amplificación del gen *FMRI*, mediante RT-PCR. En el carril 1 se observa el marcador de 100pb, en el carril 2 el blanco (sin RNA), en el carril 3 los amplicones obtenidos del transcrito del gen *FMRI* y el gen constitutivo HPRT usado como control de prueba en un paciente normal, en el carril 4 se observa la ausencia del transcrito del gen *FMRI* en un paciente con SXF. (Imagen obtenida del diagnóstico molecular realizado en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, CMNSXXI, IMSS)

### 3.4.2 Southern-Blot.

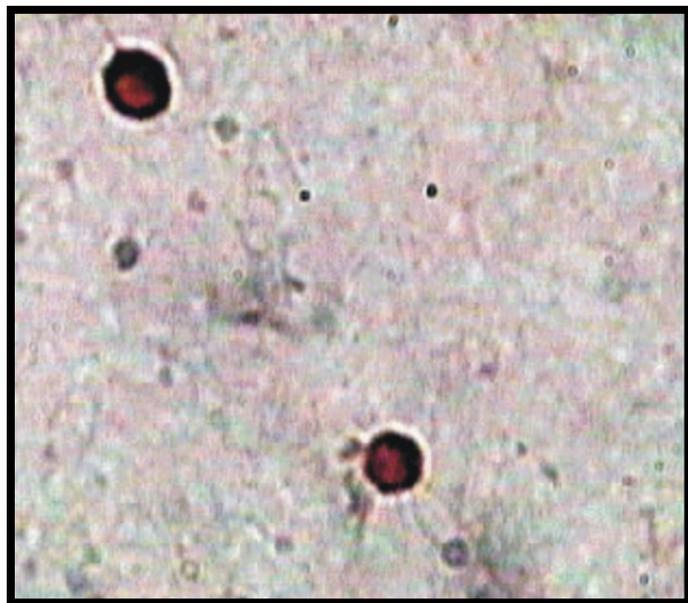
Este procedimiento permite visualizar en forma directa el tamaño de los repetidos CGG tanto en individuos normales, premutados y los que presentan la mutación completa en ambos sexos, lo que no es posible con otras pruebas. Puede usarse asociada o no a PCR (Khaniani et al., 2008 y Sinden, 1999), permite conocer el estado de metilación de la isla CpG adyacente al gen *FMR1* y es por esto que se identifica a personas que presentan la mutación completa. El DNA del individuo en estudio se digiere con las enzimas de restricción EcoRI que restringe una región del gen de 5.2 kb y con EagI que es una enzima sensible a metilación, posteriormente se hibrida con una sonda marcada radiactivamente, la sonda molecular nos sirve como herramienta para detectar la presencia del DNA complementario y hacer evidente el tamaño de los repetidos. En un varón normal se obtendrá solamente una banda no metilada de 2.8 Kb, mientras que una mujer normal mostrará una banda no metilada de 2.8 kb y una banda metilada de 5.2 Kb que corresponde al gen *FMR1* normal presente en el cromosoma X activo e inactivo, respectivamente (Fig. 6) (Sinden, 1999 y Van, 2006).



**Fig. 6.** Análisis por Southern Blot con la sonda StB12.3, que reconoce el DNA complementario después de una doble digestión con las enzimas EagI/EcoRI. Carriles 2 y 6: mujeres sin expansión mostrando dos bandas normales de 5,2 kb y 2,8kb (con y sin metilación respectivamente), correspondientes al cromosoma X inactivo y activo. Carril 5: hombre sin expansión, con banda normal de 2,8kb y cromosoma X activo. Carriles 1 y 4: mujeres portadoras con PM y carril 3: hombre portador con MC. (Imagen tomada de GIRMOGEN, 2006)

### 3.4.3 Inmunohistoquímica.

Esta técnica se realiza generalmente en linfocitos y debe ser siempre confirmada por PCR y/o Southern (Rifé et al, 2003). Se basa en el reconocimiento de una o varias epitopes (secuencias de aa) de la proteína FMRP, mediante un anticuerpo, de esta manera se garantiza un método histoquímico que permite identificar la presencia o ausencia de la proteína a través del color. El núcleo del linfocito se tiñe de color rojo y el escaso citoplasma se tiñe de carmelita oscuro, aparentando un halo que rodea a la célula cuando está presente la proteína (Fig. 7) (Ramos, 2001).



**Fig. 7.** Inmunohistoquímica de linfocitos humanos. Dos linfocitos humanos rodeados de un halo carmelita detectando la presencia de la proteína FMRP. (imagen tomada de [http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol23\\_4\\_04/fig1002404.jpg](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol23_4_04/fig1002404.jpg))

### 3.4.4 Análisis de raíz de cabello

Este estudio se hace obteniendo cabellos del paciente de varias zonas de la cabeza, siendo visible el folículo piloso, posteriormente se pone a incubar con anticuerpos monoclonales de ratón para FMRP, visualizándose posteriormente con un complejo anticuerpo-antígeno. Después las raíces de cabello se observan a un microscopio estereoscópico. Los FMRP positivos son de color rojo (Fig. 8) (Ramos, 2001 y Verkerk y et al., 1999). En los individuos normales hay presencia de la proteína en más del 70% de los cabellos analizados y en los individuos afectados la proteína está

ausente. Esta técnica no distingue entre individuos portadores de premutación e individuos normales. Resulta de utilidad para realizar estudios preliminares, cribados y sobre todo cuando hay que enviar muestras desde lugares mal comunicados y en los que el envío de sangre pudiera verse afectado (Ramos, 2001).



**Fig.8.** Detección de la proteína FMRP en la raíz del cabello, mediante inmunohistoquímica en un individuo normal y en uno positivo para el SXXF. (Imagen tomada de <http://www.eur.nl/FGG/CG1/fragx>)

### 3.5 Tratamiento

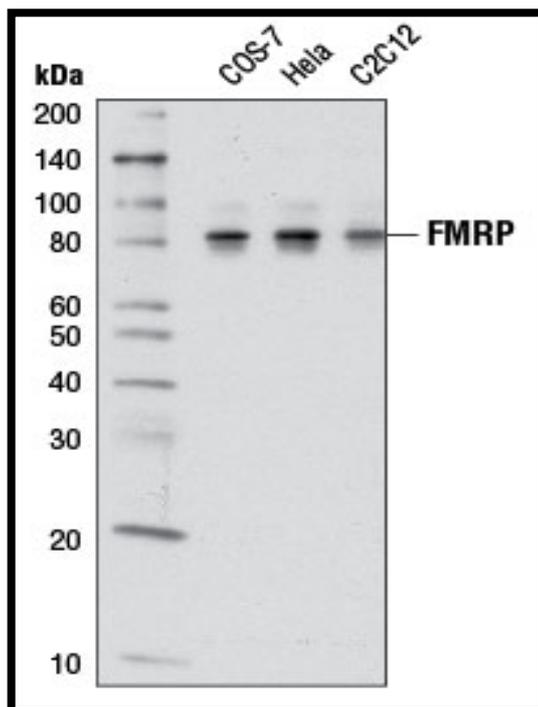
La intervención óptima para restituir la función de la proteína FMRP en el SXXF sería el mejor enfoque para un tratamiento efectivo. Si bien existen diversos proyectos de investigación, actualmente no se contempla a corto o mediano plazo una alternativa terapéutica que permita incidir directamente sobre el núcleo disfuncional del SXXF. Actualmente, las líneas de investigación más prometedoras en marcha intentan:

- 1) Reestablecer el gen *FMRI* para generar la proteína de forma normal
- 2) Permitir la liberación de la proteína de forma alternativa
- 3) Sustituir la función de la proteína regulando los RNA mensajeros para los que es flanco.

Aun alcanzando de forma óptima alguno de estos objetivos terapéuticos, es difícil imaginar que se pudieran restituir íntegramente las funciones neurocognitivas que no se establecieron durante el desarrollo (GIRMOGEN, 2006).

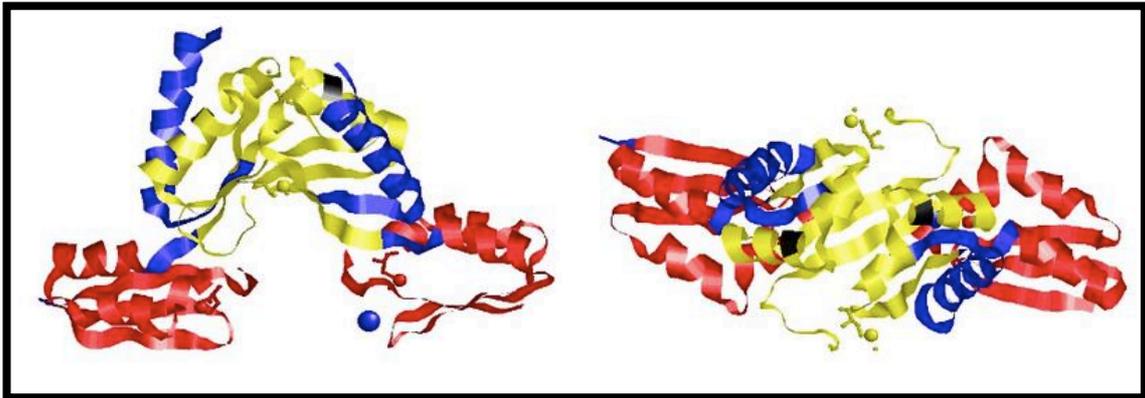
#### 4. LA PROTEÍNA FMRP

La proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) presenta un tamaño de 632 aminoácidos y tiene un peso de 71.174 kDa (Fig. 9). La proteína FMRP forma parte del complejo CYFIP1-EIF4E-FMR1, el cual se une al RNAm, mediando la represión traduccional. Su interacción con el RNA citoplasmático del cerebro aumenta la unión específica al complejo. (Base de datos de UniProt, 2012)



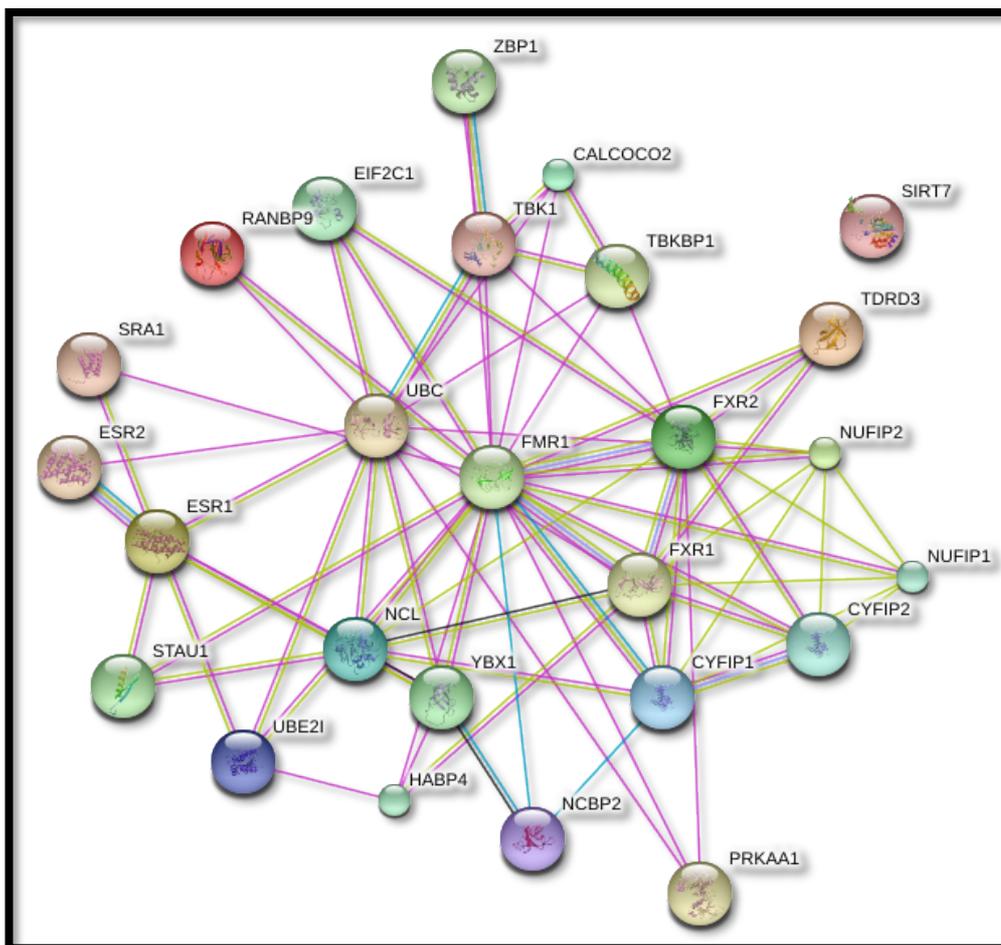
**Fig. 9.** Western blot de FMRP. Se muestran diferentes líneas celulares utilizando anticuerpo G468 para FMRP. El marcador en kDa en el primer carril. En los carriles subsecuentes las expresión de FMRP en las diferentes líneas celulares. (Imagen tomada de <http://www.cellsignal.com/products/4524.html>)

Determinada por rayos X, la proteína FMRP es un heterodímero cuya estructura cuaternaria consiste en un pliegue compuesto por dos repeticiones de un dominio KH (KH1 y KH2), seguido de una estructura alfa hélice corta. La orientación relativa de los dominios, así como la localización de un residuo de isoleucina (posición 304), cuya mutación a asparagina está asociada con una forma severa del síndrome del X frágil, se muestra en la Figura 10 de color negro. Esta mutación perturba la estructura y desestabiliza la proteína.



**Fig. 10.** Representación de la estructura de la proteína FMRP (izquierda visión frontal; derecha visión en planta). Se observa el dominio KH1 (rojo), el dominio KH2 (amarillo), el sitio donde se produce la mutación (negro) y en azul el resto de la proteína (imagen tomada de: <http://btg12-grupo7.wikispaces.com/3.+Resultados+y+discusión>)

La proteína FMRP interactúa con FXR2, IGF2BP1, NUFIP1, NUFIP2, MCRS1 y RANBP9, como se observa en el siguiente mapa de interacción proteica (Figura 11).



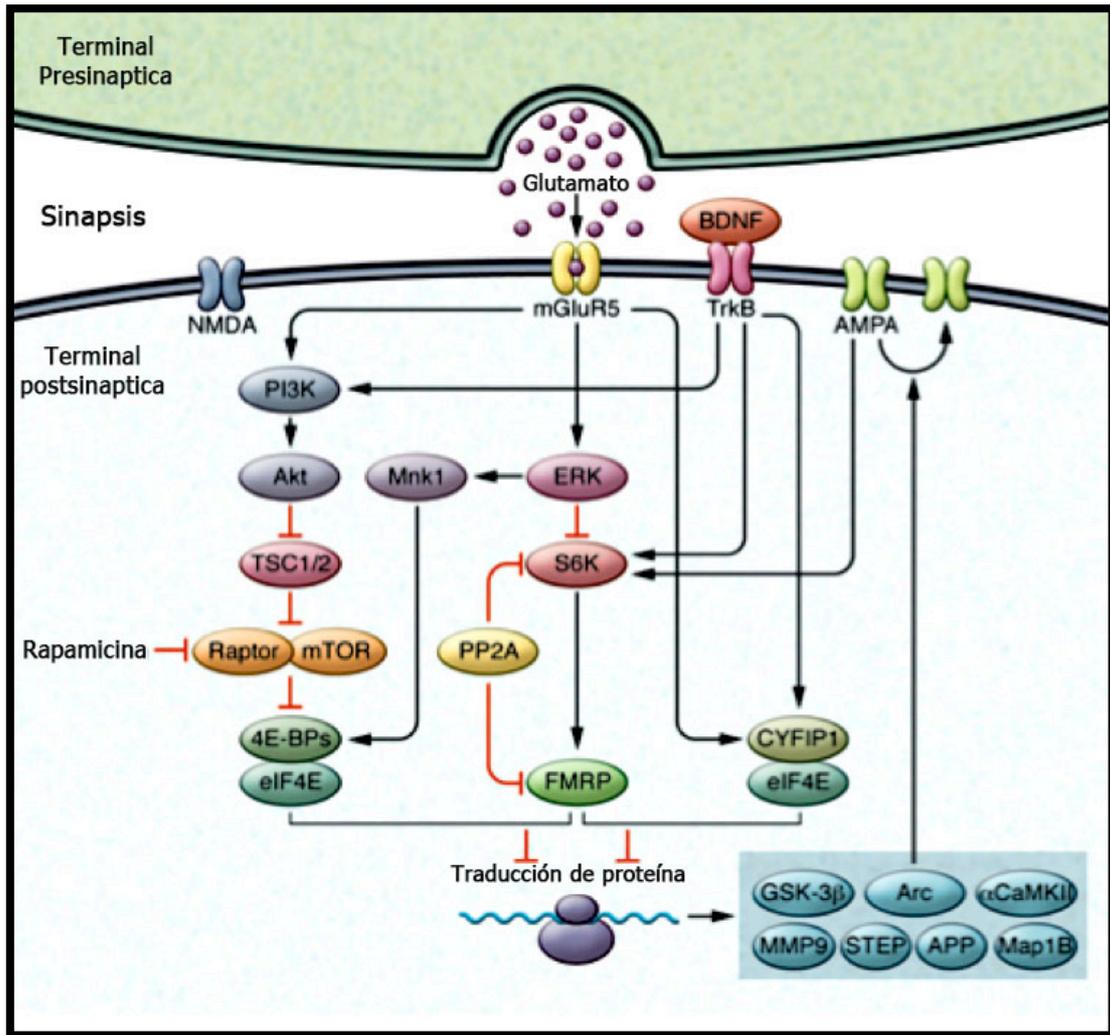
**Fig.11.** Interacción de los genes y las proteínas de la red de FMR1, siendo las de importancia principal FXR1, FXR2, IGF2BP1, NUFIP1, NUFIP2, MCRS1 y RANBP9. (Imagen tomada de Base de datos Gene Cards, 2013)

Las interacciones entre CYFIP1-EIF4E-FMR1 son esenciales para la estabilidad del dominio N-terminal. Las dos repeticiones, a pesar de tener una estructura similar, tienen diferentes propiedades dinámicas y funcionales. La segunda repetición es más flexible y es la encargada de interactuar con la lisina metilada y con 82-FIP, uno de los "compañeros" nucleares de la proteína FMRP. El dominio N-terminal contiene una señal de localización nucleolar con estructura 3D (Callejo Garcia et al., 2013). Las funciones y nombres de las proteínas que interactúan principalmente con FMRP se muestran en la siguiente tabla:

GEN	FUNCIÓN
<i>CYFIP1</i>	Proteína citoplasmática 1 de interacción FMR1, implicada en la formación de las ondulaciones de la membrana y protuberancias del axón. Se une a la actina F, pero no al ARN (1253 aa)
<i>EIF2C1</i>	Factor de iniciación de la traducción eucariótica 2C, 1; requeridos para mediar el RNA por silenciamiento génico (RNAi). Se une a RNA cortos tales como microARN (miARN) o RNAs de interferencia cortos (siRNAs), y reprime la traducción de los ARNm que son complementarias a ellas. Carece de actividad endonucleasa (857 aa).
<i>FMR1</i>	Proteína 1 asociada con retraso mental X frágil, la proteína de unión al ARN que juega un papel en el transporte intracelular de ARN y en la regulación de la traducción de los ARNm diana. Puede jugar un papel en el transporte de ARNm desde el núcleo hasta el citoplasma (632 aa).
<i>FXR1</i>	X frágil retraso mental, autosómico homólogo 1; ARN-proteína de unión requerida para el desarrollo embrionario y postnatal de tejido muscular. Puede regular el transporte intracelular y la traducción local de determinados mRNAs (por similitud) (621 aa)
<i>NUFIP2</i>	Proteína nuclear 1 que interactúa con FMRP en la unión de RNA (495 aa)
<i>FXR2</i>	Homólogo autosómico 2 asociada al retraso mental X frágil, la proteína de unión al ARN (673 aa).
<i>NUFIP2</i>	Proteína nuclear de X interacción 2 asociada al retraso mental, liga RNA Mensajeros (695aa)

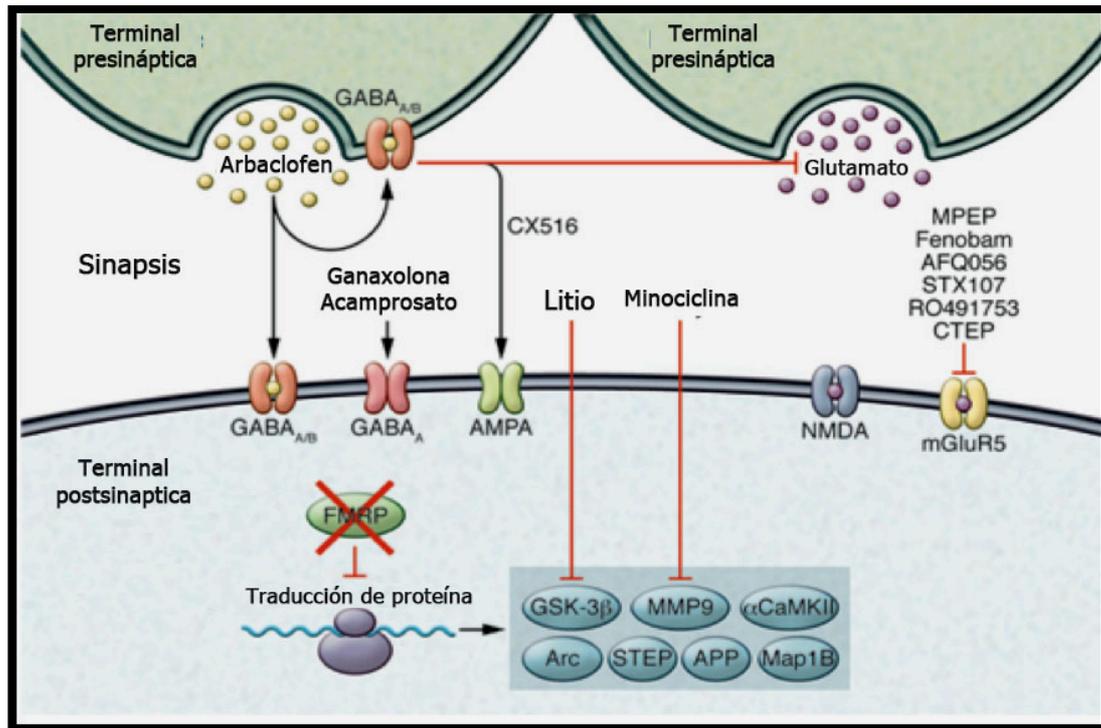
**Tabla 1.-** Interacción de proteínas con FMRP. Proteínas que muestran mayor interacción con la proteína FMRP de acuerdo a la red del gen FMR1. (Tabla modificada de Base de datos Gene Cards., 2013)

La proteína FMRP, es una proteína de unión al RNA que está implicada en el control de la traducción de una gran variedad de RNAs mensajeros. La función biológica de FMRP es de regulador negativo de la síntesis de proteínas, función que es estimulada por el receptor metabotrópico de glutamato tipo I (mGluR) (Fig. 12); de acuerdo a se postula que FMRP tiene una función esencial en los mecanismos de plasticidad sináptica (Bear et al., 2006).



**Fig. 12.** Regulación de FMRP por receptores de glutamato y de BDNF. Una cascada compleja de moléculas río abajo de glutamato (NMDA, AMPA, mGluR5) y los receptores de BDNF modulan la actividad de FMRP en las sinapsis. (Imagen tomada de Bagni et al., 2012)

La proteína FMRP regula la producción de proteínas cerebrales al asociarse a los ribosomas. En estudios neuronales recientes, hay evidencia de que FMRP está localizada en la sinapsis neuronal y la pérdida de ésta altera la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje y la memoria (Fig. 13). En las neuronas, la proteína FMRP participa en la exportación nuclear, así como en la estabilidad y localización de ciertos RNAs mensajeros en las dendritas (Mientjes et al., 2005; Mila y Mallolas, 2001). La dinámica celular de la proteína es compleja, se mueve dentro del núcleo y se asocia con otras proteínas, RNAs y ribosomas (Mientjes et al., 2005; Mila y Mallolas, 2001).



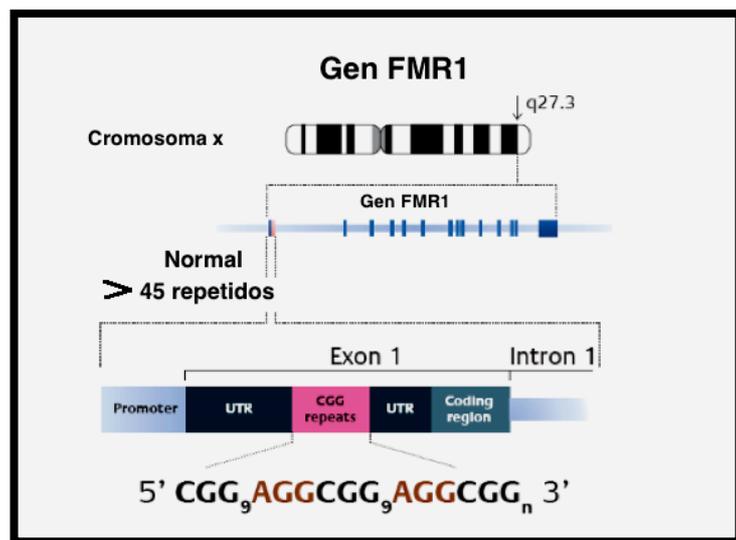
**Fig.-13.** Efecto de la ausencia de FMRP. La falta de FMRP, conduce a una síntesis desregulada de moléculas con funciones claves en las sinapsis, como el aumento de concentración en los niveles de Arc,  $\alpha$ CaMKII, MMP9, GSK-3 $\beta$ , mGluR y NMDA, y la disminución de GABA y la actividad del receptor AMPA. (Tomado de Bagni et al., 2012)

El nivel de déficit de la proteína FMRP se correlaciona con una menor altura corporal, longitud de la cabeza y longitud de los miembros, además de un aumento en la capacidad de extensión de las extremidades. En los varones, el déficit de FMRP tiene un efecto significativo en la disminución del ancho facial y en el aumento de la longitud de la cabeza y del tamaño de las orejas. La mayor longitud de la cabeza probablemente se relaciona con un aumento en el tamaño cerebral observado con técnicas de neuroimagen en pacientes con SXF, comparados con controles. En las mujeres, las orejas prominentes y la longitud de la mandíbula se relacionaban con este déficit (Hagerman et al., 2007).

## 5. GEN *FMRI*

### 5.1 Morfología

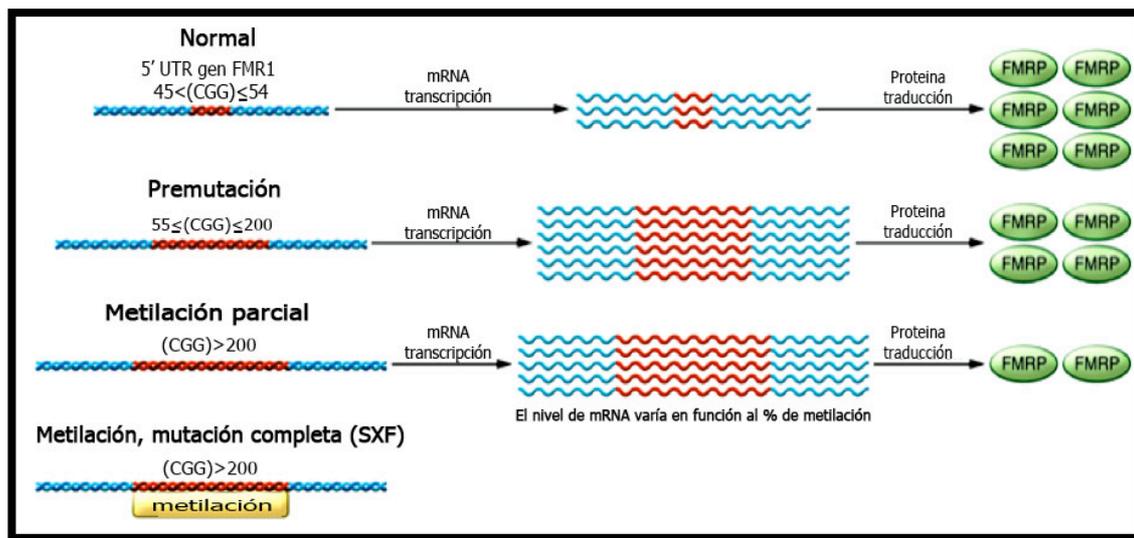
El gen 1 de Retraso Mental X Frágil (*Fragile X Mental Retardation-1*) tiene una longitud de 40 kilobases (Kb). El RNAm codificante es de 3.9 kb y consiste de 0.2 kb en la región 5' sin traducir; la región codificante es de 1.9 kb mientras que la región sin traducir 3' tiene una longitud de 1.8 kb. El gen está compuesto de 17 exones y está sujeto a empalme (“*splicing*”) alternativo de los exones 12 y 14 con el exón 15 (Brouwer et al., 2007; Marquis et al., 1995). Una característica de este gen es el polimorfismo localizado en la región no codificadora del extremo 5' dentro del exón 1, que consiste en repetidos de tripletes CGG que están interrumpidos por la secuencia AGG cada 9 a 10 repetidos (Fig. 14) (Feliz, 2007; Felix et al., 2006).



**Fig. 14.** Localización de repidos CGG he interrupciones AGG del gen *FMRI* en el cromosoma X y su composición molecular, incluyendo el polimorfismo presente en el exón 1. (Imagen tomada de [http://www.iqb.es/monografia/diseases/e015\\_01.htm](http://www.iqb.es/monografia/diseases/e015_01.htm))

Como se mencionó anteriormente, la población normal presenta entre 5 y 55 repeticiones del triplete CGG, mientras que los individuos con PM tienen entre 55 y 200 repeticiones. Los individuos que presentan una MC contienen expansiones superiores a 200 CGG (Fig. 15) (Kremer et al., 1991; Yu et al., 1991). Existe una zona gris de 45 a 60 repeticiones, la cual no se define con precisión si corresponde a una premutación, ya que suele ser transmitidas de forma estable o expandirse en raras ocasiones. Los problemas neurológicos secundarios del SXF como tremor y ataxia

están asociados con un trastorno neurodegenerativo identificado recientemente en los portadores de la PM. Estos trastornos se basan en la correlación existente entre el número de repetidos CGG y la cantidad de proteína FMRP traducida, la cual se va perdiendo con el transcurso de la edad (García et al., 2010).



**Fig. 15.** Tipos de alelos del gen *FMR1* humano. De acuerdo con el grado de expansión del triplete CGG y el nivel de transcripción del RNAm y los cambios en la traducción del RNAm de FMRP, se generan cuatro alelos: normal, PM (premutación, UMF ( expansiones mayores a 200 repetidos y gen no metilado) y FM (mutación completa). (Tomado de Bagni et al.,2012)

## 5.2 Evolución en mamíferos

Eichler y sus colaboradores (1995) realizaron un estudio en diferentes mamíferos para determinar la evolución del gen *FMRI*, secuenciando la región 5' no traducida del gen de 44 especies. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la repetición CGG está presente en todas las especies, lo que sugiere la conservación de la repetición por más de 150 millones de años a partir de la radiación de mamíferos. La mayoría de los mamíferos estudiados poseen pequeñas repeticiones contiguas (número de repeticiones media =  $8,0 + / - 0,8$ ), pero en los primates, las repeticiones son más grandes (media =  $20,0 + / - 2,3$ ) y más altamente interrumpidas por tripletes AGG. El análisis arrojó que el aumento de la repetición CGG en el gen *FMRI* a más de 20 tripletes se ha producido en tres linajes de primates diferentes: gorilas, orangutanes y el hombre (Tabla 2).

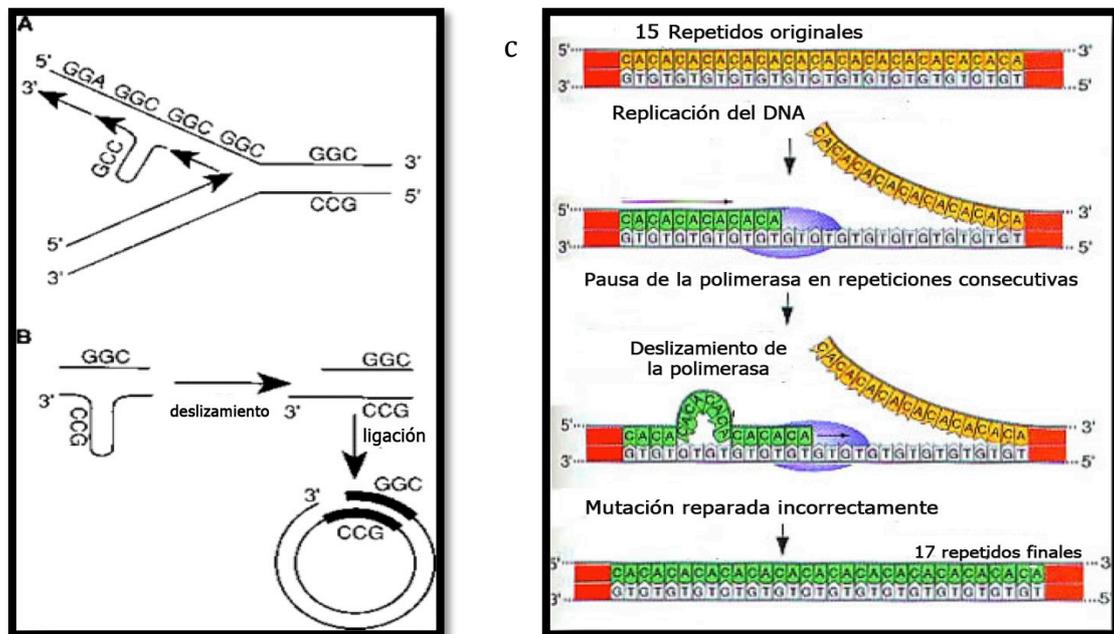
Tripletes repetidos CGG del gen FMR1 en primates			
Nombre Común	Especie	Long Rep	Secuencia de triplets repetidos
Humano	Homo Sapiens	29	(CGG)9 <b>AGG</b> (CGG)9 <b>AGG</b> (CGG)9*
Chimpancé	Pan troglodytes	38	(CGG)9 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)9 <b>AGG</b> (CGG)16
		36	(CGG)9 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)4 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)6 <b>AGG</b> (CGG)8
		35	(CGG)9 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)9 <b>AGG</b> (CGG)11
		34	(CGG)9 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)22
		30	(CGG)9 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)16 <b>AGG</b> CGG
Bonobo	Pan paniscus	39	(CGG)2CAG(CGG)12 <b>AGG</b> (CGG)7 <b>AGG</b> (CGG)15
		37	(CGG)2CAG(CGG)12 <b>AGG</b> (CGG)7 <b>AGG</b> (CGG)13
		37	(CGG)9 <b>AGG</b> (CGG)13 <b>AGG</b> (CGG)13
		37	(CGG)23 <b>AGG</b> (CGG)13
		37	(CGG)9 <b>AGG</b> (CGG)27
Gorila	G. gorilla gorilla G. gorilla beringel G. gorilla graueri	26	(CGG)8 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)3
		22	(CGG)8 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)3
Orangutan	Pongo pygmaeus	26	(CGG)9 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)2 <b>AGG</b> (CGG)2 <b>AGG</b> (CGG)8
		26	(CGG)8 <b>AGG</b> CGG <b>AGG</b> (CGG)2 <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)8
Gibón de manos blancas	Hylobates lar	24	CGG <b>CGA</b> CGG <b>CGA</b> (CGG)2 <b>CGA</b> CGG <b>CGA</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)11
		22	CGG <b>CGA</b> CGG <b>CGA</b> (CGG)2 <b>CGA</b> (CGG)5 <b>AGG</b> (CGG)9
Siamang	Hylobates syndactylus	24	CGG <b>CGA</b> CGG <b>CGA</b> (CGG)2 <b>CGA</b> (CGG)5 <b>AGG</b> (CGG)3 <b>AGG</b> (CGG)7
Babuino	Papio	32**	(CGG)12 <b>CGGG</b> (CGG)19
Macaco Rhesus	Macaca rhesus	30**	(CGG)13 <b>CGGGCGGCGGG</b> (CGG)14
Dril	Mandrillus leucophaeus	24**	(CGG)9 <b>CGGG</b> (CGG)14
Mono de Allen	Allenopithecus nigrovidis	20	(CGG)20
Mono narigudo	Nasalis larvatus	7	(CGG)7
Langur chato dorado	rhinopithecus roxellana	7	(CGG)7
Duc de canillas rojas	pygathrix nemaeus	10	(CGG)10
Colobo oriental negro	Colobus guereza	8	(CGG)8
Mono ardilla	Saimiri sciureus	25	<b>CAG</b> (CGG)5 <b>CAG</b> (CGG)6 <b>CAG</b> (CGG)12
Tití	Leontopithecus saguinus	9	CGG <b>CGA</b> (CGG)7
Loris perezoso	Nycticebus coucang	18	(CGG)11 <b>CAGCAG</b> (CGG)5
		17	(CGG)11 <b>CAGCAG</b> (CGG)4
Lemur	Lemur fulvianus	14	(CGG)14
Lemur rufo blanco y negro	Varecia variegata	7	(CGG)7

Tabla 2. Repetidos CGG del gen FMR1 en diversos mamíferos (Imagen tomada de Eichler et al., 1995)

En el hombre y en el gorila, se observaron un mayor número de interrupciones AGG generalmente distribuidas uniformemente, lo que sugiere que la ampliación histórica de los alelos ha implicado tanto la adición de matrices CGG más grandes como la adición de interrupciones AGG. Los resultados de este estudio sugieren que durante la replicación, el deslizamiento de la polimerasa y el entrecruzamiento desigual del DNA han estado operando durante la evolución de esta repetición (Eichler et al., 1995).

### 5.3 Interrupciones *AGG* asociadas a la inestabilidad del triplete *CGG*

Las estructuras secundarias formadas por el triplete repetido *CGG* ininterrumpidamente durante la replicación pueden provocar el bloqueo de la horquilla de replicación, debido a que las secuencias largas producen pausas de la polimerasa mientras que las cortas no lo hacen (Fig. 16-C). Así mismo la presencia del trinucleótido *AGG* en las repeticiones *CGG* produce una disminución en la pausa de la horquilla de replicación (Fig. 16 A-B), facilitando la progresión de la polimerasa a través de la región de repeticiones y evitando así su posterior deslizamiento (Eichler et al., 1995).



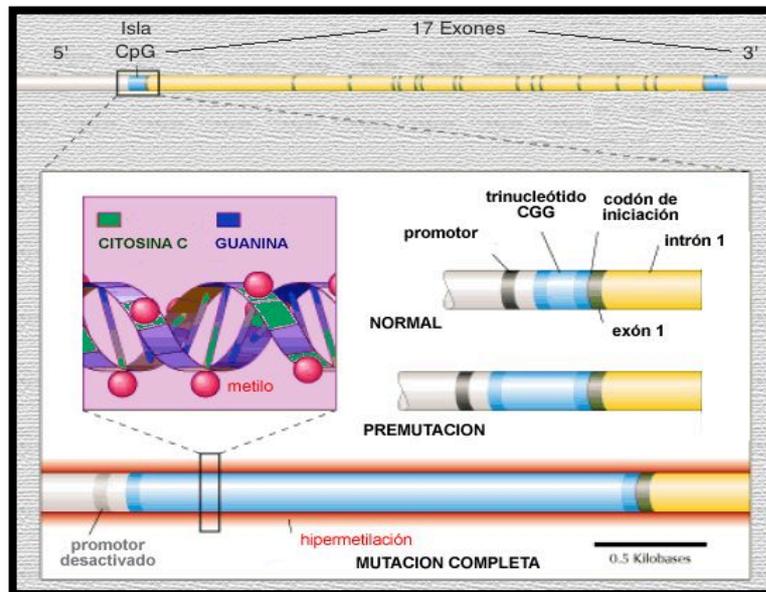
**Fig.-16** Explicación esquemática del deslizamiento de la polimerasa. (a) La cadena de GCC es la cadena de formación de horquillas predominante consiste en uno o más repeticiones, y que conduce al deslizamiento de la polimerasa. El extremo 5' de la repetición GGC/GCC, contiene las interrupciones en la repetición. (b) La inestabilidad de los repetidos *CGG* podría dar lugar a un 'hairpin loop' en el extremo 3', lo que ocasionaría el deslizamiento de la polimerasa y la expansión de repetidos. (c) Modelo para la síntesis de deslizamiento de repeticiones de trinucleótidos *GCC*. (Imagen tomada de Genes & Disease handbook)

Poblaciones diferentes han sido estudiadas para determinar el papel de los elementos que contribuyen a la expansión de repeticiones *CGG*. Los estudios incluyen individuos que presentan *DI* con y sin mutaciones completas (Jacobs et al., 1986; Arinami et al., 1986; Elbaz et al., 1998; Crawford et al., 1999).

En la actualidad, la evidencia apoya tanto en un modelo de la estructura cromosómica y un modelo replicación del ADN y las enzimas de reparación, en los trastornos de expansión. (Rodriguez et al, 2003). Los datos actuales sugieren tres vías mutacionales que podrían explicar la progresión paso a paso para del alelo con mutación completa (Eichler et al., 1996, Crawford et al., 2000). Estas vías de mutación fueron identificados a través de las asociaciones de haplotipos basados en los tres informes sobre expansiones sospechosas de repetidos CGG del gen *FMRI*. Estos tres incluyen DXS548, FRAXAC1 y FRAXAC2 (Peprah et al., 2010). Las vías de mutación para cada haplotipo se basan principalmente en el modelo multialelico de expansión de la repetición CGG a través de la pérdida de interrupciones de AGG y adición de repeticiones CGG, resultando eventualmente en la mutación completa (Eichler et al., 1996; Morton y Macpherson, 1992). La primera vía descrita, fue un haplotipo asociado a largas repeticiones CGG que contenía varias interrupciones AGG; Eichler y Nelson propusieron en el año 1996, que aún conservando las interrupciones AGG, la expansión de repetidos se debía a adiciones CGG en el extremo polar (es decir, al final de la repetición en el extremo 3'). La segunda vía fue el haplotipo asociado con patrones asimétricos de repetición CGG y se planteó la hipótesis de progresar rápidamente hacia la expansión CGG debido a la pérdida de la interrupción AGG dentro de las repeticiones CGG (Eichler et al., 1996). La tercera vía descrita fue un haplotipo que sugirió que la ausencia reinterrupciones AGG en la matriz CGG (es decir, la interrupción AGG en repetidos puros CGG) aumentó la inestabilidad de la repetición (Crawford et al., 2000). Cada mecanismo de expansión planteó la hipótesis de que es el resultado de diferentes procesos mutacionales. El proceso mutacional podría incluir varios mecanismo que median la mutación (Snow et al., 1993, Kunst y Warren , 1994; Eichler et al., 1994; Zhong et al., 1995; Eichler et al., 1996; Gunter et al., 1998; Crawford et al., 2000; Crawford et al., 2000). Si bien, uno de los mecanismos es el factor predisponente inicial, éste podría no ser el principal mecanismo por el que la repetición CGG alcanzaría el umbral de premutación. De este modo concluyen que el mecanismo de expansión exacta aún queda por esclarecerse. (Eichler et al., 1996)

## 5.4 Metilación del gen

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica. La maquinaria implicada comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las DNA metiltransferasas, desmetilasas, proteínas de unión a CpG metilados, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina. La metilación del DNA es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico. Este proceso se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina (Fig. 17). La mayoría de las 5-metilcitosinas (5mC) en el DNA, están presentes en las islas CpG (Fig. 17), como puede observarse en el gen *FMR1* cuando está metilado (Rodríguez et al., 2003).

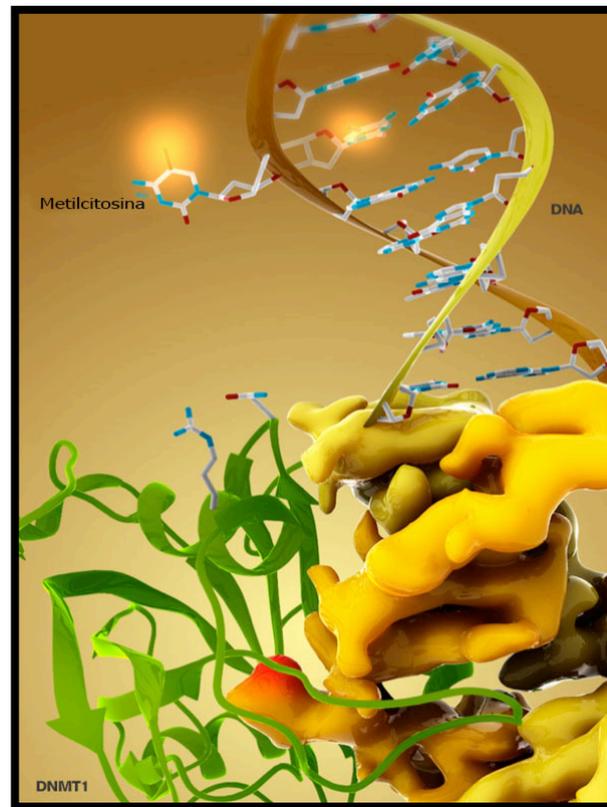


**Fig.-17** Posición y metilación de las islas CpG en el gen *FMR1*. Muestra la posición de las islas CpG en el gen *FMR1* donde se lleva a cabo la adición de un grupo metilo en las citosinas ocasionando la posterior inactivación del promotor que dará lugar a la mutación completa presente en el SXF. (Imagen tomada de [http://www.iqb.es/monografia/diseases/e015\\_01.htm](http://www.iqb.es/monografia/diseases/e015_01.htm))

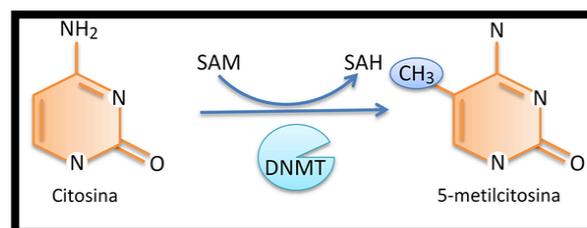
Las islas CpG son regiones de DNA que están aproximadamente en un 40% de los promotores de los genes, en donde existe una gran concentración de pares CG enlazados por fosfatos (Fig. 17) (Pintado y Morón, 2001; Garber et al., 2006). En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción. Tanto en el gen *FMR1* como en otros genes la reacción de metilación del DNA es catalizada por las DNA metiltransferasas e involucra la transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al carbono 5 de la citosina

(Fig 18 a). Se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción clasificándose en dos grupos: las ADN metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1) y las metilasas *de novo* (DNMT3A y DNMT3B)(Fig. 18 b) (Garber et al., 2006)

a)



b)



**Fig. 18.** Procesos de metilación del DNA. a) estructura tridimensional del DNA estableciendo la union de un grupo petilo en el carbono 5 de la citocina. b) proceso de union del grupo metilo al carbono 5 de la citosina incluyendo metiltransferasas de mantenimiento SAM y SAH además de las metilasas de novo representadas por DNMT (Imagen tomada de 3Dciencia.com/Visual life sciences)

La acción de las DNA metiltransferasas de mantenimiento ocasiona que el DNA sea metilado al inicio de la replicación. Sólo la cadena nueva es metilada, y por esta razón los patrones son heredados de una manera semiconservativa y pueden ser perpetuados en la población celular (Garber et al., 2006).

### 5.5 Prevalencia en la población mundial

Las estimaciones de prevalencia más bajas de SXF se han reportado en Canadá, Estonia, Japón, y Taiwán. Se estima que en estos países la prevalencia es significativamente menor si se compara con el resto de países occidentales que han llevado a cabo las pruebas de X frágil (Crawford et al., 2001). Algunas poblaciones de africanos, asiáticos, y nativos americanos fueron estudiados para los haplotipos *FMRI*, FRAXAC1 (polimorfismo de dinucleótidos repetidos de 7kb), FMRa y FMRb, estos fueron comparados con un grupo de 110 norteamericanos caucásicos (Kunst y Warren, 1994; Peprah, 2012). Los resultados obtenidos fueron que el haplotipo FRAXAC1 situado río arriba de la repetición CGG de gen *FMR1*, está relacionado con el desequilibrio en los cromosomas normales y X frágil. También demostraron que las poblaciones estudiadas, tienen distribuciones del haplotipo FRAXAC1 distintas de los caucásicos ( $P < 0,05$ ). Además encontraron el origen común del polimorfismo de los nativos americanos mixtecos y maticos. El polimorfismo FMRb también resultó ser el más frecuente en la población tibetana y de Borneo, en contraste con FMRa que es más frecuente entre los caucásicos. Las poblaciones africanas resultaron ser más heterogeneas de todas las estudiadas. De acuerdo a los estudios mencionados anteriormente, cada población presenta diversidad en número de repetidos CGG, siendo los caucásicos, la población con repeticiones de trinucleotidos más largas, mientras que los americanos presentan tallas más cortas. (Tabla.3) (Peprah, 2012).

Población	Rango de repetidos CGG	Número de retidos CGG más comunes
Americanos (descendientes de Europeos)	28 (19-56)	33,29
Americanos (descendientes de Africanos)	31 (11-46)	32,21
Americanos Mestizos	21 (15-44)	30,29
Amerindios	16 (15-43)	20,25
Asiáticos	19 (6-54)	31,29
Europeos	26 (19-50)	32,29
Africanos	24 (20-45)	30,29

Tabla 3.- Distribución continental de repetidos CGG del gen *FMR1* en individuos normales (Adaptada de Peprah, 2012).

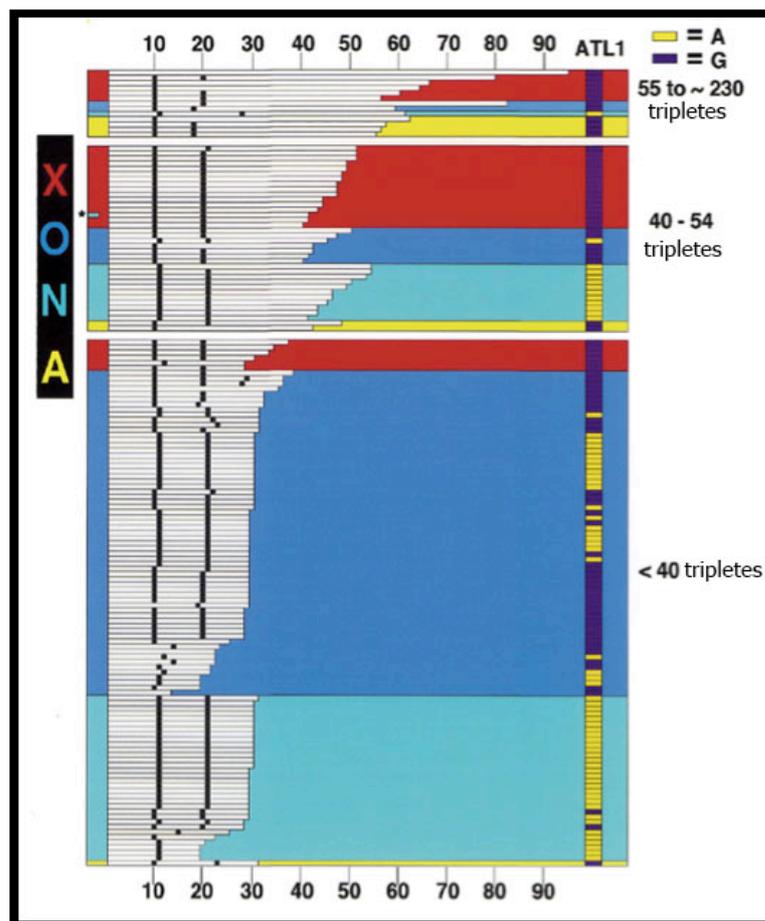
Si las secuencias ininterrumpidas de repetidos CGG son la causa de que los cromosomas normales evolucionen a cromosomas X frágil, la prevalencia de la predisposición de alelos anormales en las poblaciones no caucásicas estudiadas es  $3,5\% \pm 1,7\%$ . Si el SXF está en equilibrio, esta prevalencia se encuentra dentro del intervalo (0,5% -4%) predicho por Morton y Mac Pherson (1992) y es similar al del 2% observado en los estudios de raza caucásica (Kunst y Warren 1994). Sin embargo, estos supuestos alelos predisponentes a la expansión de repetidos que produce el SXF, no se observaron en todas las poblaciones, especialmente en las poblaciones indígenas amerindias. Esto puede ser debido al tamaño pequeño de la muestra o por la estabilidad genética de los haplotipos predisponentes al SXF, que parecen haber sufrido estas poblaciones del mundo (Kunst et al., 1996). Lo anterior puede resumirse en que estos alelos, se perdieron en las poblaciones de nativos americanos debido a las migraciones del *homo sapiens* a las Américas (Wallace y Torroni 1992) siendo este un factor importante para el mantenido estable de los alelos normales durante los últimos 7.000 años (Catherine B. et al. 1996). En los últimos años, se han realizado estudios referentes la prevalencia de la enfermedad en la población mundial que han arrojado resultados diversos. El resumen de ésta, se muestra en la Tabla 4, en ella, puede observarse el promedio del número de casos positivos por SXF, en relación con el número de casos normales, obtenido de las poblaciones estudiadas por cada continente. En esta se observa un mayor número de casos positivos en las poblaciones africana y caucásica, mientras que la asiática y la americana mostraron un menor número de casos, siendo la segunda, la que presentó un número de casos menor.

Población	No Posit/ No Est	Prevalencia (%)
Europeos	9 / 309	0.029
Americanos	12 / 6,130	0.0020
Asiáticos	9 / 2,095	0.0043
Africanos	19 / 270	0.07

**Tabla 4.** Prevalencia continental del SXF. Se muestra el número de positivos de la enfermedad respecto al número de casos estudiados en diversos países del mundo, promediado por continente (Adaptada de Sharma et al., 2000).

## 5.6 Polimorfismos en poblaciones Americanas

Los estudios de los polimorfismos del gen *FMR1* en las poblaciones americanas, se realizaron para determinar cual es el que da origen a la expansión de repetidos. Dombrowski et al. en 2002, estudia a 10,572 varones canadienses de la población general para determinar la presencia de una premutación, mediante Southern blot, identificando 13 hombres con repeticiones mayores a 54, de los cuales uno no contenía interrupciones AGG y 12 tenían dos ( $n = 9$ ) o una ( $n = 3$ ) interrupción AGG, así como todos los alelos de tamaño intermedio de tripletes CGG contenían de 40 a 54 repeticiones ( $n = 36$ ). Esta última, es una característica asociada al haplotipo predisponente para SXF (Fig. 19).

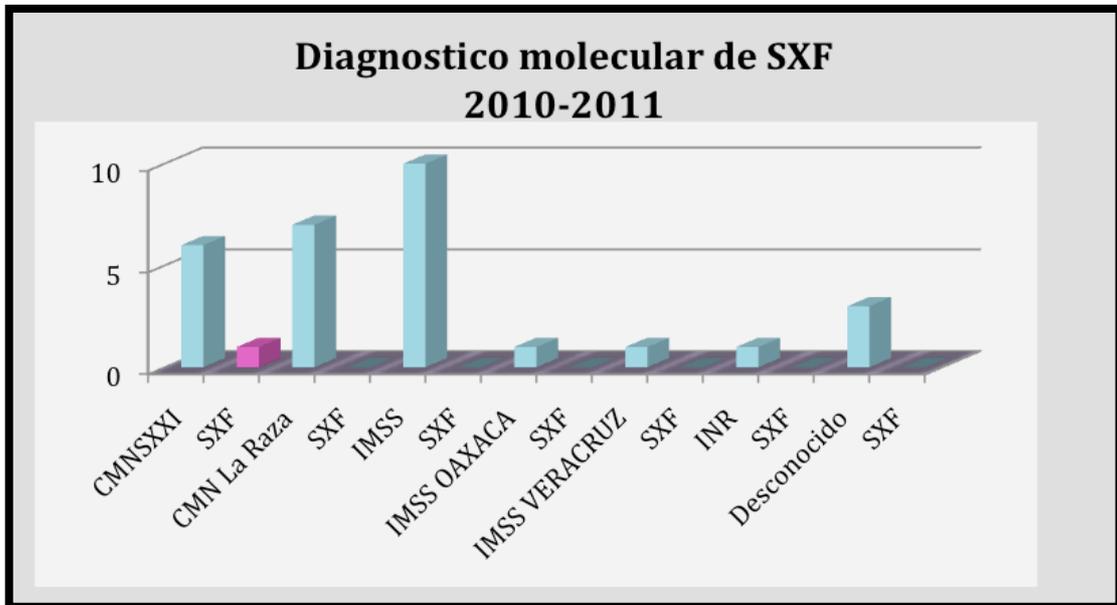


**Fig.19.** Haplotipos de *FMR1* identificados en población canadiense. Cada individuo se representa por una barra. Los bloques blancos representan la matriz CGG, los puntos negros, las interrupciones AGG. Los genotipos ATL1 están en el lado derecho de la figura (bloques de color púrpura y amarillo). Los tres locus haplotipos (DXS548-FRAXAC1-FRAXAC2) de cada cromosoma se identifica por regiones de color: rojo (X) para el haplotipo fragilidad X, verde (N) para el haplotipo más frecuente de lo normal; amarillo (A) para un haplotipo "alternativo", azul (O) para el resto de haplotipos. (Imagen tomada de Dombrowski et al. en 2002)

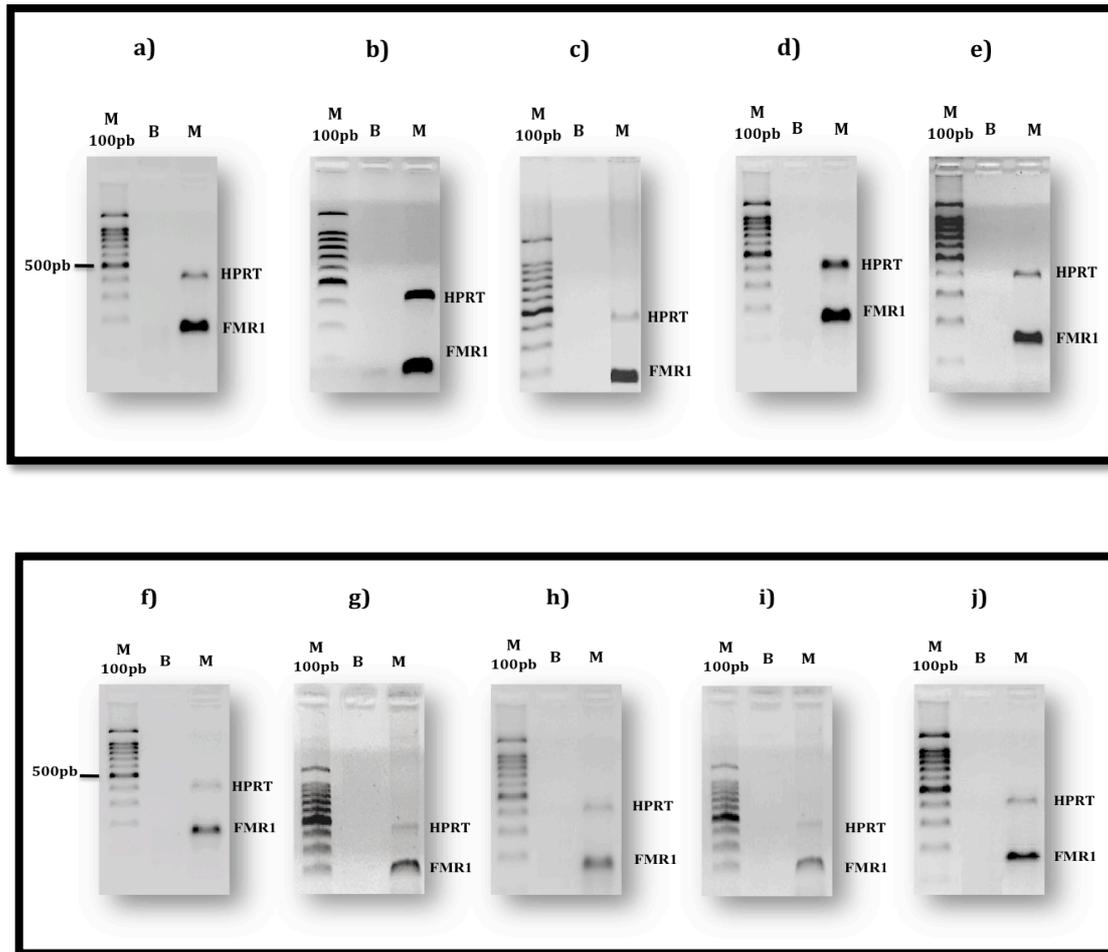


## 6. ANTECEDENTES

Realizamos el diagnóstico molecular del SXF por un periodo de 5 años, en la Unidad de Investigación Médica (UIM) en Genética Humana en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (HPCMNSXXI) perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), nuestros resultados arrojaron una baja incidencia del Síndrome de X Frágil en niños mexicanos diagnosticados previamente con retraso mental idiopático. En contraste con otras poblaciones de diversas partes del mundo, en las que el SXF es la segunda causa de retraso mental hereditario, en México los casos de niños afectados son escasos. Los niños estudiados fueron evaluados previamente por un genetista, de acuerdo al fenotipo característico descrito para SXF. Otro criterio de inclusión para el diagnóstico fue tener antecedentes de retraso mental en la familia o una madre con falla ovárica prematura. En algunos casos, también se realizamos un cariotipo en medios carentes de ácido fólico para determinar el sitio frágil del cromosoma X, según el servicio al que pertenecía el paciente. El diagnóstico lo realizamos mediante RT-PCR, detectando los transcritos del gen para determinar positivos o negativos para SXF. Los resultados obtenidos en el periodo 2010-2011 se muestran en las figuras 21, 22 a-j. (Datos no publicados)



**Fig. 21** Se muestran los casos positivos para SXF en color rosa y de Azul los negativos, según el servicio al que pertenecía el paciente. Puede observarse una baja incidencia de los diversos casos estudiados. (Datos no publicados).



**Fig. 22** Prueba de PCR-RT para la detección de transcritos del gen *FMRI* en CMNSXXI. Las letras en la parte superior de las imágenes corresponden a los pacientes evaluados en orden de aparición en la tabla antes descrita. Se observa la presencia de un fragmento del transcrito de *FMRI* (149pb) junto con el fragmento amplificado para *HPRT* (387 pb). Este último fue utilizado como control positivo de la prueba dándole mayor confiabilidad. El total de las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 2%, usando marcadores de 100pb en el primer carril, el segundo carril corresponde al blanco, y el tercero a las muestras sometidas a PCR-RT. Tanto marcador, blancos y muestras fueron teñidas directamente con syber gold antes del corrimiento. La línea más oscura que se observa en el carril de cada marcador corresponde a 500pb. (Datos no publicados)

El estudio arrojó que la incidencia del SXF de acuerdo al número de casos diagnosticados era de 1 positivo, sobre 60 negativos (0.016%), en población mestiza mexicana, dato menor que en población Europea y Africana y que a su vez, presentan los alelos predisponentes reportados para la expansión de repetidos. De acuerdo a lo anterior proponemos que la dosis génica heredada de antiguas poblaciones amerindias mexicanas a mestizos mexicanos, no presenta la morfología los alelos predisponentes a la enfermedad, por lo que partimos de esta premisa para iniciar nuestro estudio (Datos no publicados).

## 7. JUSTIFICACIÓN

La incidencia del SXF en la población mexicana es baja (0.016%) en comparación con poblaciones caucásicas (0.029 en Europeos y 0.07 de Africanos), que son susceptibles a las expansión de repetidos CGG y en las cuales este síndrome representa la segunda causa DI hereditaria. Lo anterior, sugiere que la dosis génica heredada de antiguas poblaciones amerindias mexicanas a mestizos mexicanos, no presenta la morfología los alelos predisponentes al SXF, por lo que el estudio de polimorfismos predisponentes ayuda a comprender el origen de la mutación que da lugar a la enfermedad y permiten proponer un fundamento acerca de la baja incidencia de este trastorno neurológico en México.

## 8. HIPÓTESIS

El número de repetidos CGG y el patrón de interrupciones AGG del gen *FMRI*, serán diferentes en indígenas y mestizos mexicanos sanos.

## 9. OBJETIVO GENERAL

Determinar el número de repetidos CGG y de interrupciones AGG del gen *FMRI* en indígenas y mestizos mexicanos sanos

### 9.1 Objetivo Particular

Identificar el número de repetidos CGG y el patrón de las interrupciones AGG del gen *FMRI* mediante PCR y secuenciación.

## 10. METODOLOGÍA

### 10.1 Poblaciones de estudio

Las poblaciones indígenas del presente estudio fueron Otomís, Nahuas, Mixtecos y Tarahumaras. Estas poblaciones fueron proporcionadas por el banco de muestras de DNA de la UIM en Genética Humana del HPCMNSXXI. También fue extraído mediante el método de sales, un banco de DNA de 30 individuos mestizos de diversas regiones del país. De cada población, fueron seleccionadas al azar 5 muestras para ser procesadas.

### 10.2 Extracción de DNA por el método de Sales

En un tubo Vacutainer con EDTA se vertieron 5ml de sangre periférica, que fue centrifugado 15 minutos a 2,500 rpm. Posteriormente se extrajo la capa de células blancas (500µl) para después agregar 1 ml de solución de lisis RCLB y centrifugar 10 minutos a 2,300 rpm. El sobrenadante fue decantado para agregar de nuevo 1 ml de solución RCLB y se centrifugó 10 minutos a 2,300rpm. Después de decantar el sobrenadante se adicionaron 120µl de NaCl<sub>2</sub> 5mM y se agitó por espacio de 2 minutos para después agregar 71.3µl de SDS al 10% e incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo de incubación se agregaron 410.6µl de NaCl<sub>2</sub> saturado y se agitó durante 1 minuto para después incubar 5min a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos a 15,000 rpm y después, se recuperó el sobrenadante para lavar la pastilla agregando 2 volúmenes de etanol absoluto. Se agitó brevemente e se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a Centrifugar 15 minutos a 13,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70 % para después centrifugar 5 minutos a 8,500 rpm. Para finalizar se decantó el sobrenadante y los remanentes de alcohol fueron retirados para resuspender en 100µl de agua Milli-Q almacenando a -30 °C.

### 10.3 Prueba de Integridad de DNA en geles de agarosa

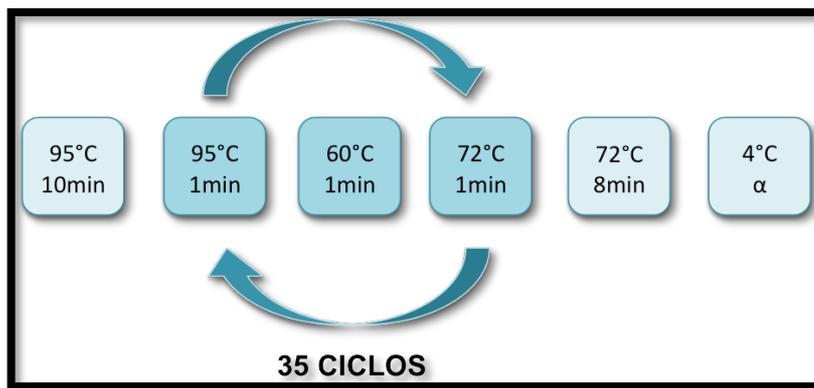
Se prepararon geles de agarosa al 1%, pesando 1gr de agarosa por cada 100ml de TBE preparado al 0.5%. Las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro de Thermo Scientific modelo Nanodrop 1000, para posteriormente cargar 200ng de cada muestra por poso, adicionando 2µl de Buffer de carga preparado al 6X y 1.5µl de Sybr Gold al 50X. En cada extremo del gel, fue cargado 1µl de marcador de 1Kb para determinar la integridad del DNA. Los geles fueron corridos en una fuente de poder a 80 Volts y 20MA por espacio de 40min para posteriormente observar bajo luz UV en transiluminador **BIO-RAD** modelo **Universal Hood II**.

### 10.4 Pruebas de Amplificación

El tamaño de los repetidos CGG de cada población fueron determinados mediante su amplificación por PCR convencional usando las secuencias sentido: 'F' GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT y antisentido: 'R' AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA, descritas previamente por *Fu et al.* (1991). La amplificación se realizó con base en una modificación del método descrito por *Martínez-López et al.* (2012). Las condiciones estandarizadas para la óptima amplificación se muestran en la tabla 5 y en la figura 23.

	B	M
<b>Buffer</b>	----	-----
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	3mM	3mM
<b>dNTPs</b>	400 µM	400 µM
<b>Oligos</b>	0.4 µM	0.4 µM
<b>caReactivo CG Melt</b>	4.5µl	4.5µl
<b>My Taq</b>	0.45U	0.45U
<b>DMSO</b>	5%	5%
<b>Formamida</b>	5% PH 8.5	5% PH 8.5
<b>BSA</b>	0,1 µg/µL	0,1 µg/µL
<b>DNA</b>	----	200ng
<b>H2O</b>	Cbp20µl	Cbp20µl
<b>TOTAL</b>	20µl	20µl

**Tabla 5.** Condiciones de amplificación de repetidos CGG para volúmenes finales de 20µl. B: Blanco, M: Muestra, Cbp: cuánto baste para.



**Fig. 23.** Condiciones de amplificación de repetidos CGG requeridas en el termociclador para la amplificación.

#### 10.4.1 Separación electroforética en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 2%, pesando 2gr de agarosa por cada 100ml de TBE preparado al 0.5%. Las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro de Thermo Scientific modelo Nanodrop 1000, para posteriormente cargar 200ng de cada muestra por pozo, adicionando 2 $\mu$ l de Buffer de carga preparado al 6X y 1.5 $\mu$ l de Sybr Gold al 50X. En cada extremo del gel, fue cargado 1 $\mu$ l de marcador de 100pb para determinar el peso de producto de PCR (270-280pb). Los geles fueron corridos en fuente de poder a 80 Volts y 20MA por espacio de 2hrs para posteriormente observar bajo luz UV en transiluminador **BIO-RAD** modelo **Universal Hood II**.

#### 10.5 Purificación de geles de Agarosa

Para la purificación fueron cortadas y pesadas las bandas amplificadas observando bajo luz UV en transiluminador **BIO-RAD** modelo **Universal Hood II**. Aproximadamente 400 $\mu$ g de gel fueron colocados en tubos eppendorf a los que se les adicionó 60 $\mu$ l de buffer L1 por cada 10mg de gel. Se incubó a 50°C por 15min mezclando cada 3min, para después colocar el gel disuelto en filtros de purificación y centrifugar a 12mil gx, por un minuto. Después de desechar el sobrenadante se adicionó 500 $\mu$ l de Buffer L1 para incubar 1min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 12mil gx por 1min y se desecho el sobrenadante. 700 $\mu$ l de Buffer L2 fueron adicionados al producto obtenido para dejar

incubando por espacio de 5min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12mil gx por 1min desechando el sobrenadante. Para asegurar la eliminación de residuos de etanol se volvió a centrifugar 1min. En nuevos tubos eppendorf fueron colocados los filtros adicionando 50 $\mu$ l de Buffer EB, para después incubar a temperatura ambiente 1min. Como paso final se centrifugó a 12mil gx por 2min para obtener el producto de PCR purificado.

### 10.6 Secuenciación

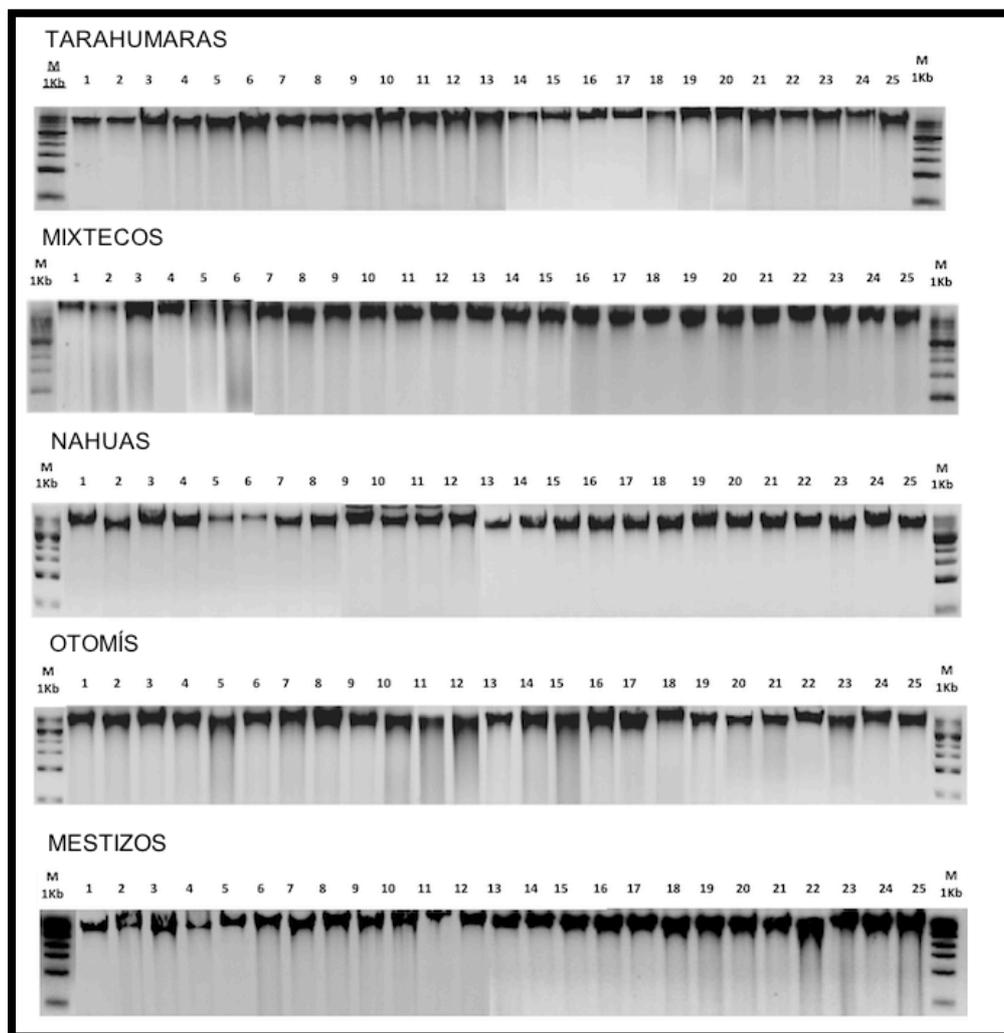
Los productos purificados (Conc. 50-130ng) fueron enviados a la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, para ser secuenciados. Los datos obtenidos fueron corroborados mediante un BLAST de secuencia, realizado en el programa de NCBI para obtener una identidad de secuencia de entre 90% y 100%.



## 11. RESULTADOS

### 11.1 Integridad de DNA

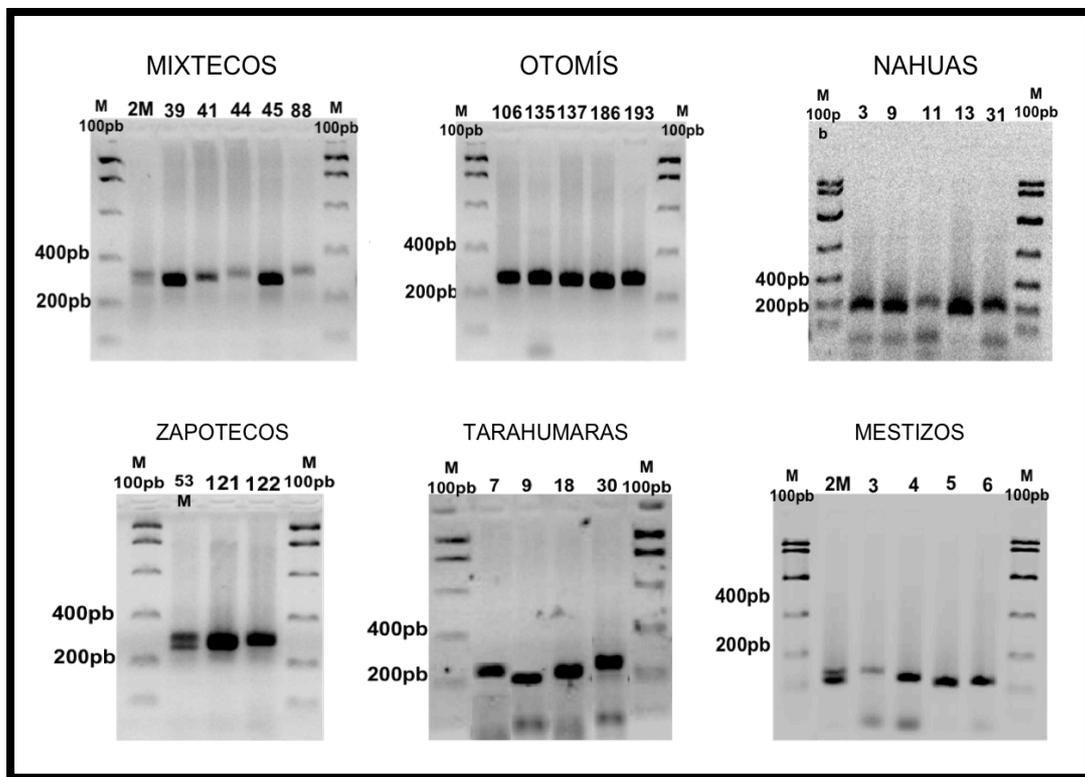
La integridad del DNA, de las poblaciones empleadas en nuestro estudio, se determinó en geles de agarosa al 1%, usando un marcador comercial de BIOlabs de 1Kb. Los resultados revelaron que el material genético está íntegro y que tiene una concentración óptima en todas las poblaciones (100 a 300 ng/ $\mu$ l) para ser procesado mediante PCR (Fig. 24).



**Fig. 24.** Integridad del DNA de las poblaciones indígenas. El DNA se observa con bandas definidas y marcadas en la mayoría de las muestras. Comparadas con el marcador, presentan también una longitud mayor o igual a 3Kb (la primera línea del marcador, de arriba a abajo, corresponde a una longitud de 3Kb)

## 11.2 Amplificación de los repetidos CGG por PCR

Para determinar si los indígenas y los mestizos mexicanos tienen el mismo número de repetidos CGG en la región no codificadora del gen *FMRI*, esta región se amplificó por PCR en punto final. Nuestros resultados indican que existen diferencias aparentes entre las poblaciones estudiadas, además revelan que algunas poblaciones parecen ser más homogéneas que otras en la longitud de la región. También revelaron que puede definirse incluso, amplicones de mujeres heterocigotas con diferencias de hasta 27 pares de bases entre los alelos del gen (Figura 25).



**Fig. 25.** Amplificación del gen *FMRI* en indígenas y mestizos mexicanos. La imagen revela las diferencias aparentes de cada población, así como una posible homogeneidad de la región no codificadora del gen, en las poblaciones otomí, nahua y zapoteca. En el carril 1 de las poblaciones mixteca, zapoteca y mestiza, puede observarse también, la heterocigocidad de algunas mujeres de las poblaciones estudiadas.

Las diferencias en los amplicones de cada individuo fueron corroboradas mediante el cálculo de la banda, con el programa **Alpha Ease**, que arrojó una aproximación respecto a la longitud en pares de bases de cada amplicón, con un margen de error de hasta 2 pares de bases. Nuestros resultados arrojaron que los rangos de longitud del fragmento en la población mexicana en general son inferiores a 303pb (Fig. 26)

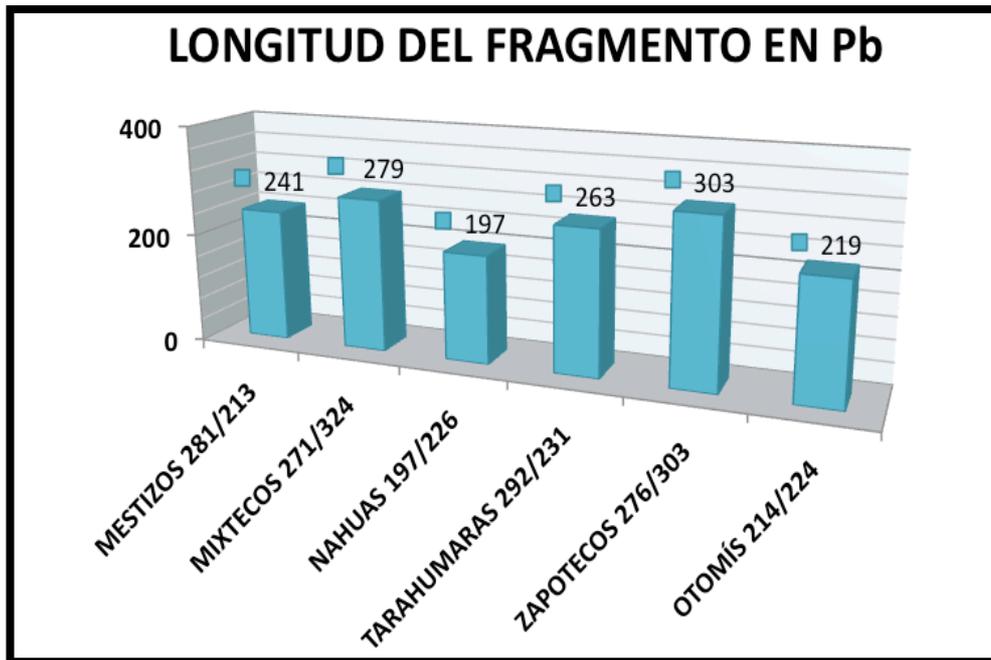


Fig. 26. Gráfica que muestra el rango de longitud del fragmento obtenido de cada población estudiada. La longitud más frecuente en cada población se observa en la cima de cada barra.

De acuerdo a la longitud de la banda de los individuos estudiados, realizamos un cálculo aproximado al número del repetidos, identificando la longitud más común en cada población. El número de repetidos encontrados, varían de entre 14 a 22 repeticiones en la población general mexicana (Fig. 27)

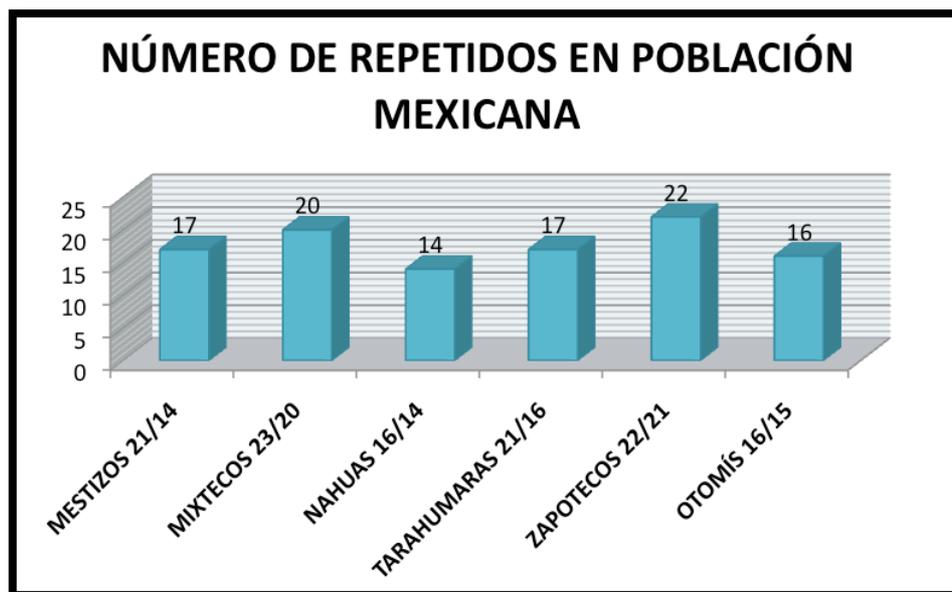


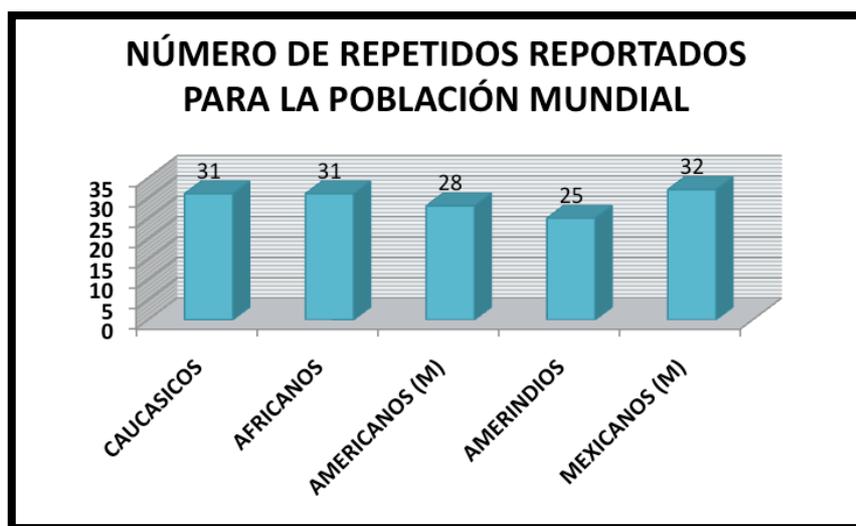
Fig. 27. Figura que muestra una aproximación del rango del número de repetidos presente en cada población estudiada. El número de repetidos más frecuente en cada población, se muestra en la cima de cada barra.



## 12. DISCUSIÓN

Diversos estudios, indican que el SXF está asociado con la expansión en el número de repetidos de la región 5' no traducida del gen *FMRI* (Eichler, et al., 1996; Dombrowski et al., 2002; Angeli y Capelli, 2004; Rosales-Reynoso et al., 2005; Barros-Núñez et al., 2008), la cual es diferente en distintos linajes (Eichler, et al., 1995). Durante la evolución del gen *FMRI*, la mayoría de los mamíferos presentó un número de repetidos cortos que se ha mantenido estable al paso del tiempo. Los análisis de ancestría realizados en esta clase de vertebrados, han revelado que el mamífero ancestral poseía una secuencia corta de repetidos CGG en el extremo 5' (4-9 repetidos CGG) y que esta secuencia no presentaba ninguna interrupción. En el orden de los primates, la evolución ha tomado un camino diferente, ya que presentan una tendencia a aumentar de longitud, dando lugar a una secuencias de 7 repeticiones CGG, pero con una modificación, la secuencia está interrumpida por un trinucleotido AGG. Tanto el aumento en la longitud de las repeticiones CGG (más allá de 20 repeticiones) como la adición de interrupciones AGG, han ocurrido de forma independiente durante la evolución del gen en los primates (Eichler, et al., 1995). El hombre al ser primate, también presenta una tendencia a la expansión de repetidos, pero en mayor magnitud, ya que puede llegar a tener un número superior a 200 copias, dando lugar al SXF (Eichler, et al., 1996; Dombrowski et al., 2002; Angeli y Capelli, 2004; Barros-Núñez et al., 2008; Rosales-Reynoso et al., 2005). Desde la separación de la línea evolutiva de los homínidos y los chimpancés (5-7 millones de años), hasta el origen del homínido moderno en el sur de Etiopía hace casi 200.000 años, el genoma humano ha sufrido un sin fin de modificaciones. Algunas de ellas conducen a daños, actualmente irreparables, en la estructura del DNA, que dan lugar a enfermedades genéticas. El carácter evolutivo en la morfología del gen *FMRI* indica que existen alelos predisponentes al SXF, que generalmente se encuentran en poblaciones caucásicas europeas, africanas y asiáticas. Estas poblaciones pertenecen a los 3 continentes colonizados en el inicio de las migraciones prehistóricas, comenzando por Africa (formación Kibish del río Omo, Etopía), siguiendo por Asia (islas del Sudeste Asiático) y Europa. (Kostenski, Rusia) y que culminaron posteriormente en Oceanía (Islas próximas a Euroasia) y América (Beringia, Siberia y Alaska) (Eichler, et al., 1996).

Después de la llegada del Homo Sapiens a América, la colonización del Nuevo continente fue inminente, y el rumbo de la evolución en los genes, como *FMRI*, en las nuevas poblaciones, tomaron caminos distintos. Nuestros resultados indican, como se esperaba, que las poblaciones amerindias establecidas en México, presentan un número de repetidos cortos (14-22) en comparación con las poblaciones caucásicas (33-29), africanas (30-29) y europeas estudiadas (29-32) (Fig. 30). Lo que coincide con los resultados obtenidos por Angeli y Capelli en 2004, acerca de repetidos cortos (23-30 repetidos) con 2 interrupciones, en población Brasileña. Nuestros resultados también coinciden con los obtenidos por Dombrowski et al. en 2002, en los que determinan que en población normal Canadiense descendiente de europeos, los repetidos son más largos (40-54) con una o dos interrupciones, lo que sugiere que la expansión de la repetición CGG podría ser causada por un haplotipo predisponente basado en la adición de repetidos CGG en extremo 5' como fue sugerido por Eichler y Nelson en 1996. Este haplotipo está presente en las poblaciones de Europa, Asia y África, continentes que fueron lugar de las primeras colonizaciones de homínidos y que presentaban la tendencia a la expansión. Asimismo, se observó que el número de repetidos es polimórfico en distintas poblaciones estudiadas. Las bandas que presentan los individuos de las poblaciones indígenas Otomís, Nahuas y Zapotecos, se observan más homogéneas que las poblaciones de individuos Mixtecos, Tatahumaras y Mestizos.



**Fig.30** Tabla que muestra el número de repetidos reportado en diversas poblaciones del mundo comparada con mexicanos y amerindios. El número de repetidos en población amerindia son más cortos que en caucásicos y africanos

El camino evolutivo inminente del gen parece haber encontrado una estabilidad del incremento de repetidos CGG en las poblaciones ancestrales establecidas en América. La reducción del tamaño de las repeticiones (Fig. 31), heredada a los nuevos colonizadores mediante la recombinación genética del mestizaje, parece haberlos protegido de la expansión que da lugar al Síndrome de X Frágil. Aunque la adición de repetidos a la secuencia del gen parece ser el predisponente inicial, puede no ser el principal mecanismo por el que la repetición CGG alcanza el umbral de premutación o mutación completa, por lo que el mecanismo de expansión exacta aún queda por esclarecerse (Eichler et al., 1996).



**Fig.31** Tabla que muestra el número de repetidos reportado para algunas poblaciones americanas estudiadas, siendo las poblaciones establecidas en México, las que presentan un número de repetidos más corto.

En población caucásica, se demostró mediante la técnica de Southern Blot, una prevalencia de 0.05% de los casos estudiados, asimismo, en la población africana, se determinó una prevalencia de 0.07% de los casos, siendo esta población, la que presenta un mayor número de casos con SXF en el mundo (Sharma et al., 2000). De acuerdo al diagnóstico del SXF, en la UIMGH del CMNSXXI, IMSS, existe una prevalencia de la enfermedad del 0.016% en la población mexicana mestiza, la cual es menor que en la población caucásica y africana. De esta manera, el comportamiento del gen en nuestra población parece no presentar los alelos predisponentes a la enfermedad.

Como se ha reportado anteriormente, la determinación del número de repetidos CGG de la región no codificadora del gen *FMRI* por PCR resulta complicado debido a la naturaleza de la región amplificada, ya que es rica en dinucleótidos CG que forman triples enlaces difíciles de romper. Debido a ello, la amplificación de la región fue realizada mediante la modificación del método de Martínez-López y colaboradores del año 2012. La modificación consiste en el empleo de la mezcla Formamida-BSA-DMSO como buffer, adicionando a este el reactivo CG Melt. Esto, debido a que la Formamida reduce la temperatura de fusión de los dúplex de ácidos nucleicos y es ampliamente usada para mejorar la especificidad en la amplificación de muchos fragmentos de DNA con alto contenido del dinucleótido CG (Sarkar et al., 1990). Debido a que la formamida no es capaz de interferir en la formación de estructuras secundarias en la hebra monocatenaria del DNA, se utilizó DMSO como agente estabilizante de dichas estructuras. El DMSO evita la interferencia en la actividad de polimerización. Ambos solventes, DMSO y formamida afectan la estabilidad térmica de los primers mientras siendo el DMSO el único regulador de la estabilidad de la hebra simple del DNA y el del perfil de la actividad catalítica de la DNA Polimerasa. Estas moléculas se han descrito como agentes potenciadores individuales para la PCR. (Freckman, et al., 1998) Diversos autores consideran que la BSA en la mezcla de reacción es indispensable por que permite superar fallos en la amplificación debido a su capacidad para proporcionar estabilidad a la Taq Polimerasa. Como la extracción del DNA genómico fue de sangre total, es posible que contaminantes en la extracción, como hemina, bilirrubina, FeCl<sub>3</sub>, fueron disminuidos con la BSA, de tal forma que la adición de BSA a la reacción de PCR brindó estabilidad a la enzima por la remoción de estos agentes interferentes. (Kreader, 1996; Alsoud WB et al., 2000). Para conocer cuál es el número de repetidos CGG en las poblaciones estudiadas, se determinó el tamaño del amplicón por medio de un software específico y secuenciación. Interesantemente, la comparación de los datos (el cálculo del tamaño) no varió más del 2 pb y demostró que el número de repetidos en los mestizos es de 14-21 lo cual no coincide con lo previamente reportado Rosales-Reynoso et al. en 2005, quienes publicaron que el 10.5% de la población mexicana tiene repeticiones mayores a 34, similares a los patrones observados en las poblaciones susceptibles a la expansión alélica. Es importante mencionar, que en la población mestiza encontramos por primera vez regiones con un tamaño de 14 a 21 repetidos, siendo la talla de 17

repetidos la más común, las cuales son más cortas que las antes publicadas y que pudieran estar asociadas a la baja incidencia (0.016%) de nuestra población de estudio (CMNSXXI, IMSS). La amplificación de esta región, indica que las poblaciones indígenas (establecidas en México) no presentan los alelos predisponentes al SXF, basados en matrices largas de repetidos CGG, lo cual parece proteger a la población mestiza de las expansiones que dan lugar a la metilación del gen y en consecuencia, a su represión.

### 13. CONCLUSIÓN

El uso de un buffer a partir de la mezcla de Formamida-BSA-DMSO a la par del reactivo CG-Melt favorece la amplificación de la región polimórfica del gen *FMRI* rico en repetidos CGG. A su vez, el uso de este reactivo también favorece la secuenciación permitiendo obtener una mayor identidad con las secuencias blanco. El uso de esta mezcla también permite resolver diferencias hasta de 16 repeticiones en mujeres heterocigotas.

Las poblaciones indígenas establecidas en México, no presentan los posibles alelos predisponentes al SXF basados en matrices largas de repetidos CGG, por lo que la dosis génica de poblaciones indígenas heredada a mestizos, parecen protegerlos de expansiones superiores que dan lugar a la metilación del gen. El número de repetidos es polimórfico en cada individuo, como se refleja en las poblaciones indígenas Mixteca, Tatahumara y Mestiza, aunque algunas poblaciones parecen tener cierta homogeneidad como las poblaciones indígenas Otomís, Nahuas y Zapotecas.

Las diferencias en el tamaño de la región amplificada están asociadas con el número de repetidos CGG e interrupciones AGG, por lo que el número de repetidos cortos observados en las poblaciones, están relacionados con la baja incidencia del SXF en población mestiza mexicana. Nuestros datos deben ser confirmados por secuenciación para tener un 100% de confiabilidad ya que presenta un margen de error de 2 repetidos. Además, esto también permitiría determinar la posición exacta de las interrupciones AGG que también juegan un papel importante en el mecanismo de expansión de repetidos.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

Alsoud WB, Radstrom P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood feces and meat. *Biochem J. Clin Microbiol*; 38: 4463-70.

Angeli C. y Capelli L. 2004. AGG Interspersion Patterns in the CGG Repeat of the *FMR1* Gene and Linked DXS548/FRAAXAC1 Haplotypes in Brazilian Populations. *American Journal of Medical Genetics*.

Antar, L.N., Afroz, R., Dichtenberg, J.B., Carroll, R.C., Bassell, G.J., 2004. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and *FMR1* mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J. Neurosci.* 24, 2648–2655.

Antar, L.N., Dichtenberg, J.B., Plociniak, M., Afroz, R., Bassell, G.J., 2005. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement to microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav.* 4 (6), 350–359.

Bailey DB Jr, Raspa M, Bishop E, Holiday D. 2009. No change in the age of diagnosis for fragile x syn- drome: findings from a national parent survey. *Pediatrics*;124 (2):527–533.

Bear MF; Huber KM; Warren ST. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci*; 24: 370-377.

Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowery J, Sherman S, Warren S. 2009. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated *FMR1* DNA. *Am J Hum Genet.*; 85:503–514.

Cordeiro L, Ballinger E, Hagerman R, Hessl D. 2011. Clinical assessment of DSM-IV anxiety disorders in fragile X syndrome: prevalence and characterization. *J Neurodev Disord*; 3(1):57-67.

Crawford D., Acuna J., Sherman S. 2001. *FMR1* and the Fragile X Syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med.*; 3:359–71.

Daily, D. K., Ardinger, H. H., and Holmes, G. E. 2000. Identification and evaluation of mental retardation. *Am.Fam.Physician* 61, 1059-1067, 1070.

Dombrowski et al. 2002. Premutation and intermediate size *FMR1* alleles in 10 572 males from the general population *Hum Mol Genet.*11(4):371-378.

Eichler EE., Kunst CB, Lugenbeel KA, Ryder OA, Davison D, Warren ST, Nelson DL. 1995. Evolution of the cryptic *FMR1* CGG repeat. *Nat Genet.* 11(3): 301-8.

Eichler EE., Macpherson M., Murray A., Jacobs P., Chakravarti A. and Nelson D. 1996. Haplotype and interspersion analysis of the *FMR1* CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Human Molecular Genetics.* 5(3) 319–330.

Felix L. 2007. Estudio Molecular de los Alelos Fundadores del Gen *FMR1* en Poblaciones Indígenas y Mestiza Mexicana. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina, UNAM.

- Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. 1998. Betaine and DMSO: Enhancing agents for PCR. *Promega Notes*; 65, 27.
- Fryns JP, Jacobs J, Kleckowska A, van den Berghe H. 1984. The psychological profile of the fragile X syndrome. *Clin Genet* 25:131 – 134.
- Fu Y-K, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richard S, Verkerk AJMH, Holden JJA, Fenwick RG Jr, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman Paradox. *Cell* 67:1047 – 1058.
- Garber K, Smith KT, Reines D, Warren ST. 2006. Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 16:270 –275.
- Garcia-Arocena D, Hagerman PJ. 2010. Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. *Hum Mol Genet*;19(R1):R83–R89.
- GIRMOGEN 2006. Síndrome X Frágil, libro de consultas para consultas y familiares. Federación Española del Síndrome X Frágil. España. <http://www.fraxa.org/pdf/LibroSXF.pdf>.
- Glover G, Bernabe MJ, Carbonell. 2001. Diagnosis of fragile X syndrome. *Rev Neurol*.
- Gross C., Nakamoto M., Yao X., Chan CB, Yim SY, Ye K., Warren S.T. y Bassell G.J. 2010. Excess Phosphoinositidie 3-Kinase Subunit Synthesis and Activyti as a Novel Therapeutic Target in Fragile X Syndrome. *J. Neurosci.* 30.
- Hagerman RJ, Hagerman PJ. 2007. Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behaviour relationship. *Nat Clin Pract Neurol.*; 3(2):107-12.
- Hernández M. A. 2009. Diagnóstico molecular del síndrome X Frágil. Tesis licenciatura pp. 6-41. UNAM FES-I. Tlalnepantla, México.
- Irwin SA, et al. 2001. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J. Med Genet*; 98(2): 161–167.
- Kreader CA. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol*; 62: 1102-6.
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST. 1991. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 252:1711-1718.
- Kunst CB, Warren ST. 1994. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 77:853-861.
- Kunst C., Chris Zeryinick, Laurie Karickhoff, Evan Eichler, Jennifer Bullard, Maryse Chalifoux, Jeanette J. A. Holden, Antonio Torroni, David L. Nelson, and Stephen T. Warren. 1996. *FMRI* in Global Populations. *Am. J. Hum. Genet.*; 58:513-522.
- Martin JP, Bell J. 1943. A pedigree of mental defect showing exlinkage. *J Neurol Psychiatry*; 6(3–4):154–157.

Martínez-López C., De la Cruz-Ruiz F., Cortes-Peñaloza JL., Cadena-Sandoval D., Zamarrón-Licona E. 2012. CG-rich genes amplified with the formamide, bovine seric albumin y dimethylsulfoxide mix. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 46 (2): 285-92.

Mientjes E, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-westerveld M, Severijnen L, Rife M, Willemsem R, Nelson D, Oostra B. 2005. The generation of conditional *FMRI* knock out mouse model to study FMRP function in vivo. *Neurobiology of Disease, science direct*. 21: 549-555.

Mingroni-Netto RC, Costa SS, Angeli CB, Vianna-Morgante AM. 1999. DXS548/FRAXAC1 haplotypes in fragile X chromosomes in the Brazilian population. *Am J Med Genet* 84:204–207.

Mingroni-Netto RC, Angeli CB, Auricchio MT, Leal-Mesquita ER, Ribeiro-dos-Santos AK, Ferrari I, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Vianna-Morgante AM. 2002. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. *Am J Med Genet* 111:243–252.

Morton NE, Macpherson JN. 1992. Population genetics of the fragile-X syndrome: multiallelic model for the *FMRI* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4214-4217.

Musumeci SA, Ferri R, Elia L. 1991. Epilepsy and fragile X syndrome: A follow-up study. *Am J Med Genet* 38:511–513.

Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Linehan P, Mckechnie N, Macpherson J, Pound M, Jacobs P. 1996. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: Molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet.*;5:727–735.

Peprah E. 2012. Fragile X syndrome: the *FMRI* CGG repeat distribution among world populations. *Ann Hum Genet.*; 76(2): 178–19.

Peprah E., He W., Allen E., Oliver T., Boyne A., Sherman S. 2010. Examination of FMR1 transcript and protein levels among 74 premutation carriers. *J Hum Genet.*; 55:66–8.

Peprah E., Allen E., Williams S., Woodard L., Sherman S. 2010. Genetic diversity of the fragile X syndrome gene *FMRI* in a large Sub-Saharan West African population. *Ann Hum Genet.*; 74:316–25.

Promega. 2009. Nucleic acids amplifications. *Protocols & Applications Guide*; 12:128.

Ramos F. 2006. Síndrome X frágil. Asociación Española de Pediatría. España. <http://www.aeped.es/protocolos/genetica/9-sxf.pdf>.

Raymond F. 2006. X linked mental retardation: a clinical guide. *Am. J. Med. Genet.* 43:193-200.

Richards RI, Holman K, Friend K, Dremer E, Hillen D, Staples A, Brown WT. 1992. Fragile X syndrome: evidence of founder chromosomes. *Nat Genet* 1:257-260.

Richards RI, Holman K, Kozman H, Dremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S. 1991. Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet* 28:818-823.

Ropers, H. H. 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11, 161-187.

Ropers, H. H., and Hamel, B. C. 2005. X-linked mental retardation. *Nat Rev. Genet.* 6, 46-57

Rosales-Reynoso MA, Mendoza-Carrera F, Troyo-Sanroman R, Medina C, Barros-Nuñez P. Genetic Diversity at the FMR1 Locus in Mexican Population. 2005. *Arch Med Res*; 36:412–417.

Sherman SL, Jacobs P A, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard Pee- bles PN, Nielsen KB. 1985. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet*; 69: 289.

Sherman SL, Morton NE, Jacobs P A, Turner G. 1984. The marker (X) syndrome. A cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet*; 48: 21.

Sarkar G, KapelnerS, Sommer S.S. 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res*; 18: 7465.

Sullivan K, et al. 2006. ADHD symptoms in children with FXS. *Am J Med Genet A.*;140 (21):2275–2288.

Tejada I. 2002. Síndrome X frágil: Genética, Fisiopatología y Diagnóstico. Hospital de Basurto Bilbao. España. <http://www.svnp.es/Documen/tejadaXfragil.pdf>

Terracciano A., Chiurazzi P., y Neri G. 2005. Fragile X Syndrome. *Am J Med Genet*, 137C:32-37

Tuner G, Webb T, Wake S, Robinson H. 1996. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*; 64:196–7.

Vega M, Ramos I, Márquez A, González J, Martínez R, Bonilla V. 2004. *X frágil en una niña: características clínicas y del genotipo.* *Vox pediátrica.* 12:26-30.

Warren ST, Nelson DL. 1994. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 271:536-542

Wolff PH, Gardner J, Lappen J, Paccia J, Meryash D. 1988. Variable expression of the fragile X syndrome in heterozygous females of normal intelligence. *AmJ Med Genet*; 30:213–225.

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.

Zeesman S, Zwaigenbaum L, Whelan D, Hagerman R, Tassone F, Taylor S. 2004. Parental Transmission of Fragile X Syndrome. *Am J Hum Genet*; 129A:184–189.

## ABREVIATURAS

SXF: Síndrome de X Frágil

FMRP: Proteína Asociada al Retraso Mental X Frágil (*Fragile X Mental Retardation Protein*)

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

DI: Discapacidad intelectual

AGG: Adenina-Guanina-Guanina

CGG: Citosina-Guanina-Guanina

cDNA: DNA complementario

CpG: Citosina y Guanina unidas por un fosfato

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

CI: coeficiente intelectual

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

RT-PCR: Reverso transcriptasa- Reacción en cadena de la Polimerasa

BSA: Albúmina Sérica Bovina

DMSO: Dimetil sulfóxido

RNA: Ácido Ribonucleico

RNA<sub>m</sub>: Ácido Ribonucleico mensajero

U: Unidad

μl: Microlitros

Kb: kilobases

min: Minuto

ml: Mililitro

mM: Milimolar

mRNAs: Mensajeros de ácidos ribonucleicos

ng: Nanogramos

mM: Milimolar



pb: Pares de bases

N: Individuo normal

PM: Individuo con premutación

MC: Individuo con mutación completa

CMNSXXI: Centro Médico Nacional Siglo XXI

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social