



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DETERMINACIÓN DEL EXPANDIDO CGG DE
FMR1 EN PACIENTES MEXICANOS CON
TEMBLOR/ATAXIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

DANIHUI SÁNCHEZ GARCÍA

ASESOR: M. en C. David José Dávila Ortiz de Montellano

COASESOR: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación del expandido CGG de FMR1 en pacientes mexicanos con temblor/ataxia.

Que presenta el pasante: Danihui Sánchez García

Con número de cuenta: 310318044 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Diciembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Andrés Romero Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

A mi mamá y papá, como gratificación,
y a mi hermana, como ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es un reto personal y académico que constituye un proceso de investigación labrado a lo largo de mi experiencia como Bioquímico Dignóosla, en el que, personas importantes en mi vida profesional y personal han contribuido a mi formación de una manera concreta y práctica, o demostrándome su interés, apoyo cercanía y sacrificio.

Por ello, quiero expresar mi profundo agradecimiento a:

En primer lugar, al M. en C. David José Dávila Ortiz de Montellano, ya que sin su apoyo, esta investigación no hubiese sido posible, por confiar y creer desde un principio en mí para realizar esta investigación, que se ha convertido en una realidad y gran sueño para mí; la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, por su interés y orientación, al dirigir y supervisar esta tesis; al Dr. Aurelio Jara Prado, el cual fue fundamental en el aprendizaje de diversas técnicas de Genética Molecular.

A quienes me han visto crecer a su lado: a mi Mamá, Papá y Hermana, que no hay tinta ni papel en las imprentas para poder poner lo mucho que los amo en letras y que les estoy agradecido, por su apoyo incondicional cuando más débil me hallaba, por sus sacrificios, palabras, apoyo, ayuda y consejos a lo largo de toda mi vida, y que se encuentran a mi lado en este gran sueño. A mi familia: Lucina, Nicté, Laura, Humberto, Paula, Paola, Moisés, Rosalba, Ixchel, Ollcan, por motivarme, aconsejarme y animarme a perseguir mis sueños y ser una mejor persona. A mis niñas consentidas “Nena” y “Aruma” por esperarme cada día para sacarme una sonrisa y llenarme de felicidad.

A quienes he adoptado como familia: mis mejores amigos de la Prepa 7 Jovanna, Rosario, Marisol, Sergio, Gabriel, mis amigas forjadas en la facultad Andrea, Karina, Diana, Borre, Viry, Ana, los amigos del CELE, Alfredo, Mati, Helen, y mis amistades que hice en el INNN, Elizabeth, Gabo, Alicia, Lety, Tania e Ixiu, y que agradezco su apoyo y amistad, pero más allá de ello, por hacer este camino más ameno y divertido.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA “Dr. Manuel Velazco Suárez”

La presente investigación:

DETERMINACIÓN DEL EXPANDIDO CGG DE *FMR1* EN PACIENTES MEXICANOS CON TEMBLOR/ATAXIA

Se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular,
perteneciente a Departamento de Neurogenética del INNN bajo la
dirección del

M. en C. David José Dávila Ortiz de Montellano

Con el apoyo de CONACyT

FONSEC SSA/IMSS/ISSTE-SALUD2015-2

Expediente 26127

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS	VI
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	9
3.1. Cerebelo.....	10
3.1.1. Estructura y función.....	10
3.1.2. Neuronas cerebelosas	11
3.1.3. Vías Somatomotoras.....	12
3.1.4. Sistema Osteomioarticular.....	12
3.2. Ataxia Espinocerebelosa (SCA).....	13
3.3. Temblor Ataxia ligado al cromosoma X frágil (FXTAS)	15
3.4. Gen FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1)	15
3.5. Metilación.....	18
3.5.1. Metilación de <i>FMR1</i>	20
3.6. Interrupción AGG e inestabilidad Genética.....	20
3.7. Expresión de FMR1	21
3.7.1. Expresión de <i>FMR1</i> con FM	22
3.7.2. Expresión de FMR1 en rangos de Premutación	23
3.8. FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein)	24
3.8.1. Interacción de FMRP con otras proteínas.....	24
3.8.2. Función de FMRP	25
3.9. Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	28
3.9.1. Estructura del DNA.....	28
3.10. TP-PCR	29
3.11. mPCR.....	31
4. JUSTIFICACIÓN	34
5. HIPÓTESIS.....	36
6. OBJETIVOS	38
6.1. Objetivo General:.....	39
6.2. Objetivos Particulares:.....	39

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	40
7.1. Criterios de inclusion	42
7.2. Muestras de DNA	42
7.3. Numero de Repetidos CGG en FMR1	43
7.4. Determinación del Porcentaje de metilacion de FMR1por mPCR.	45
8. RECOPIACIÓN DE RESULTADOS.....	49
8.1 Numero de Repetidos CGG en <i>FMR1</i>	51
8.2 Determinación del Porcentaje de Metilación de FMR1 por mPCR.	53
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
9.1 EDAD DE INICIO.....	58
9.2 ANÁLISIS DE LA DETERMINACIÓN DE REPETIDOS CGG.....	59
9.3 DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS	60
9.3.1 Totalidad de las muestras y conjunto de alelos.....	60
9.3.2 Alelos en función de su longitud	63
9.3.2.1 Normales	63
9.3.2.2 Zona Gris o Intermedios	64
9.3.2.3 Premutación	64
9.4 DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	65
9.5 INTERRUPCIONES AGG	68
9.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN DEL GEN <i>FMR1</i>	69
9.7 CASO DE UNA FAMILIA 1.....	72
10. CONCLUSIONES.....	73
11. PERSPECTIVAS.....	73
12. REFERENCIAS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del Cerebelo.....	11
Figura 2.	Esquema de <i>FMR1</i> y FMRP.....	16
Figura 3.	Mecanismo que conduce a FXTAS y SXF.....	18
Figura 4.	Estructura de <i>FMR1</i> con sus 17 exones.....	22
Figura 5.	Dominios de <i>FMR1</i>	25
Figura 6.	Complejo ribonucléico mediado por FMRP.....	26
Figura 7.	Función de la FMRP en la neurona.....	27
Figura 8.	Nucleótidos y doble hélice de DNA.....	28
Figura 9.	Esquema de los <i>primers</i> para la PCR-gen específico.....	30
Figura 10.	Representación de la TP-PCR.....	30
Figura 11.	Diagrama de restricción de HpaI.....	32
Figura 12.	Representación del amplicón y resultados de digestión.....	32
Figura 13.	Ejemplo del Electroferograma en el canal FAM y en HEX.....	33
Figura 14.	Ecuación para el cálculo del porcentaje de metilación.....	33
Figura 15.	Diagrama general de trabajo.....	41
Figura 16.	Ciclos para la TP-PCR.....	43
Figura 17.	Asignación de valores para los electroferogramas.....	44
Figura 18.	Obtención de número de repetidos por Macro de Excel.....	45
Figura 19.	Diagrama general para la mPCR.....	45
Figura 20.	Ciclos para la digestión enzimática en mPCR.....	46
Figura 21.	Ciclos para mPCR.....	47
Figura 22.	Pureza de cada muestra.....	50
Figura 23.	Integridad de gDNA.....	50
Figura 24.	Electroferograma de mPCR de un masculino en FM.....	54
Figura 25.	Electroferograma de mPCR de un femenino en Normal.....	54
Figura 26.	Electroferograma de mPCR de un femenino en PM.....	55
Figura 27.	Edad de inicio de los pacientes.....	58
Figura 28.	Edad de inicio de los pacientes vs reportada en FXTAS....	59
Figura 29.	Frecuencias alélicas de la repetición CGG porcentual.....	62

Figura 30.	Distribución de las frecuencias totales.....	62
Figura 31.	Distribución de las frecuencias alélicas Normales.....	63
Figura 32.	Distribución de las frecuencias alélicas GZ.....	64
Figura 33.	Distribución de las frecuencias alélicas PM.....	64
Figura 34.	Diagrama de Venn de los genotipos principales.....	66
Figura 35.	Genotipos masculinos expresando en porcentaje.....	67
Figura 36.	Genotipos femeninos expresando en porcentaje.....	67
Figura 37.	Porcentaje de interrupciones AGG.....	68
Figura 38.	Porcentaje de metilación en alelos GZ.....	69
Figura 39.	Porcentaje de metilación en alelos en PM.....	70
Figura 40.	Intervalo promedio de metilación.....	71
Figura 41.	Árbol genealógico.....	72
Figura 42.	Electroferogramas generado por I.1.....	73
Figura 43.	Electroferogramas generado por II.1.....	73
Figura 44.	Electroferogramas generado por II.2.....	73

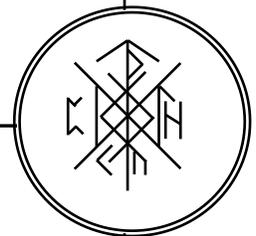
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales tipos de Ataxia con su gen causal.....	14
Tabla 2.	Volúmenes para la TP-PCR.....	43
Tabla 3.	Volúmenes para la EC.....	44
Tabla 4.	Volúmenes para el DNA Control Mix.....	46
Tabla 5.	Volúmenes para el Control FAM y Digestión HEX.....	46
Tabla 6.	Volúmenes para la mPCR.....	47
Tabla 7.	Volúmenes para la EC.....	47
Tabla 8.	Hallazgos en <i>FMR1</i> del número repetidos CGG.....	51
Tabla 9.	Hallazgos moleculares de <i>FMR1</i> , Electroferogramas.....	51
Tabla 10.	Hallazgos para el porcentaje de metilación en <i>FMR1</i>	53
Tabla 11.	Frecuencias alélicas de la repetición CGG.....	61
Tabla 12.	Prevalencia de alelos normales, GZ y PM de <i>FMR1</i>	63
Tabla 13.	Distribución de frecuencias genotípicas de CGG.....	66
Tabla 14.	Porcentaje de metilación contra no metilado.....	70

ABREVIATURAS

FMR1	Fragile X Mental Retardation 1
FMR1	Fragile X Mental Retardation 1
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
SCA	Spinocerebellar Ataxia / Ataxia Espinocerebelosa
FXTAS	Temblor Atáxico Ligado al Cromosoma X
FOP	Falla Ovárica Prematura
SXF	Síndrome de X Frágil
GZ	Alelo en Zona Gris o Intermedio
PM	Alelo en Premutación
FM	Alelo con Mutación Completa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TP-PCR	Triple <i>Primer Repeat</i> – Reacción en Cadena de la Polimerasa
mPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Metil Específica
DNApol	DNA Polimerasa
IRM	Imagen por Resonancia Magnética
TAC	Tomografía Axial Computarizada
PET/CT	Tomografía por Emisión de Positrones – Tomografía Computada
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
CGG	Trinucleótido Citosina – Guanina - Guanina
AGG	Trinucleótido Adenina – Guanina – Guanina
UTR	Unstranslate Tándem Repeat
5-mC	5-metilCitosina
Dnmt-1	Dimetiltransferasa-1
mGluR	Receptor de Glutamato
NES	Señal de Exportación Citoplasmática
NLS	Secuencia de Transporte de Localización Nuclear
mRNP	Ribonucleoproteína mensajera
LTD	Long Term Depression Depresión de Termino Largo
RNAi	Ácido Ribonucleico Interferente
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA
PCR/EC	Reacción en Cadena de la Polimerasa / Electroforesis Capilar
EC	Electroforesis Capilar
Ctrl Dig	Control de Digestión
Ctrl Ref	Control de Referencia
FAM	6-carboxifluoresceina
HEX	6-carboxihexaclorofluoresceina
ds-DNA	Ácido Desoxirribonucleico de Doble Cadena
%Met	% de Metilación
gDNA	Ácido Desoxirribonucleico Genómico
ng/μL	Nanogramos / microlitro
GS	Escaneo Génico

1. RESUMEN

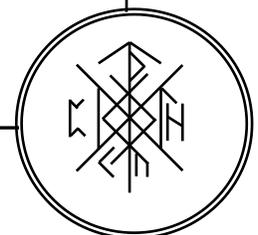


RESUMEN

El Temblor/Ataxia Ligado al Cromosoma X Frágil (FXTAS) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que presenta un modo de herencia ligada al cromosoma X, el cual se debe a un estado de Premutación en el gen *FMR1*, en el que depende del número de repeticiones CGG en la región 5' no codificante así como el estado de metilación que presente el mismo. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez" (INNN), en el departamento de Genética y Biología Molecular, se ha trabajado en los aspectos moleculares de las ataxias hereditarias desde 1994, y en el 40% de los casos no se ha logrado establecer un diagnóstico específico.

Es por ello que se ha planteado determinar el número de repetidos del trinucleótido expandido CGG del gen *FMR1* en pacientes mexicanos con temblor/ataxia de etiología no determinada mediante un análisis de fragmentos empleando la técnica de TP-PCR (por sus siglas en inglés *Triplet-Repeat Primer*) con el uso del Kit comercial AmplideX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®), y de una Reacción en Cadena de la Polimerasa específica de Metilación (m-PCR) empleando el Kit comercial AmplideX® mPCR *FMR1* (Asuragen®), para conocer la frecuencia de alelos en Zona Gris y Premutación así como el porcentaje de metilación para poder otorgar un diagnóstico certero ante dicho padecimiento. Mostrando que la prevalencia de alelos potencialmente inestables en zona gris y premutación (44 a 124 repeticiones CGG) es superior a la estimada, la cual es de un 5 % como máximo, obteniéndose un 6.13 %. Para el porcentaje de metilación se encontró un rango de entre el 8% y el 99%, siendo la media de 52%, dicho porcentaje de metilación hallado en las muestras es un factor importante para conocer la razón de la patología presente en los pacientes aunado a rasgos de espectro autista y de déficit cognitivo. Con base en los resultados obtenidos, el médico genetista puede otorgar un diagnóstico certero así como brindar un asesoramiento genético, al tener conocimiento del número de repetidos CGG, número de interrupciones AGG y el porcentaje de metilación de *FMR1*.

2. INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Existen múltiples alteraciones del movimiento, y el temblor, junto con la ataxia, se encuentran entre las más frecuentes. Corresponden a múltiples entidades clínicas y suelen presentarse más como un síntoma que como una entidad clínica específica [1, 2].

El temblor se define como un movimiento involuntario y rítmico de una o varias regiones del cuerpo y es uno de los signos neurológico más frecuentes [3]. El temblor más frecuentes es el temblor esencial, una entidad monosintomática, heterogénea y de edad de inicio variable, al ser etiquetado como un padecimiento benigno, poco es conocido de su etiología, su frecuencia y si realmente corresponde a una entidad aislada o bien es un síntoma que esconde una etiología más comprometedor para el paciente [4].

El temblor de intención es una característica importante de diversas entidades genéticas, donde se incluyen las ataxias espinocerebelosas hereditarias autosómicas dominantes (SCA por sus siglas en inglés), principalmente las tipo 1, 2 y 3, y entidades como el Temblor Ataxia ligado al cromosoma X frágil (FXTAS) [3].

El término “ataxia” es utilizado desde la época de Hipócrates, su significado literal es de desorden o confusión [10]. En el ámbito médico, se entiende por ataxia a un trastorno neurológico de la coordinación de los movimientos, debido a la lesión del cerebelo, sus vías aferentes y/o eferentes, la médula espinal, los nervios periféricos y/o el tallo cerebral. Mientras que FXTAS es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por un temblor intencional y ataxia de la marcha progresivos de aparición tardía [11].

Las ataxias corresponden a un extenso grupo de enfermedades que ocasionan temblor y trastornos del equilibrio y de la marcha así como de la coordinación de los movimientos, lenguaje, por lo que en conjunto podrían considerarse como temblor/ataxia. Entre las diversas etiologías podemos encontrar intoxicaciones con

metales o sustancias químicas, infecciones y factores hereditarios, entre otras las cuales otorgan su clasificación a este desorden [12].

El primer punto a considerar es el cuadro hereditario, el cual proporciona información de historia familiar con este padecimiento, se debe determinar su modo de herencia y si el conjunto de signos y síntomas pueden ser asociados para emitir un diagnóstico oportuno y certero. Cuando se presentan casos *de novo* o con patrón hereditario concreto es necesario la evaluación mediante técnicas de neuroimagen como el uso de la Imagen por Resonancia Magnética (IRM), Tomografía Axial Computarizada (TAC) o Tomografía por Emisión de Positrones – Tomografía Computada (PET/CT) con el fin de excluir etiologías secundarias o adquiridas como tumores y/o infartos. El alcoholismo, los traumatismos espinocerebelosos, la esclerosis múltiple y problemas vasculares son considerados como causas de este padecimiento; otras causas son las tóxicas por antiepilépticos, litio, radioterapia; y finalmente las infecciones, procesos neoplásicos, errores metabólicos o priones son consideradas entidades etiológicas [13].

Se puede clasificar las ataxias en dos grandes grupos; las ataxias adquiridas, las cuales son por degeneración alcohólica cerebelosa, degeneración cerebelosa paraneoplásica, ataxias inmunomediadas, ataxias asociadas a deficiencias vitamínicas, ataxias relacionadas con eventos infecciosos; y ataxias hereditarias, que engloban un amplio número de patologías y se9 pueden dividir en autosómicas dominante como las ataxias espinocerebelosas (SCAs, por sus siglas en inglés, que incluye más de 40 tipos), ataxias recesivas como la ataxia de Friedreich, las ligadas al cromosoma X como FXTAS y las de herencia mitocondriales, donde suele ser más un síntoma de diversas entidades [14].

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velazco Suárez de México se cuenta con la infraestructura para el diagnóstico de los cuadros de temblor/ataxia más frecuentes.

Se sabe que dentro del territorio nacional las SCAs más frecuentes son la tipo 2 seguida de la tipo 3 (que a nivel mundial es la más frecuente) y finalmente la tipo

10, que generalmente es acompañada de crisis convulsivas, y la tipo 17, que funge como diagnóstico diferencial de la enfermedad de Huntington. Otros tipos de SCA no se han identificado, salvo la SCA 7, la cual es frecuente en poblaciones de Veracruz debido a un efecto fundador en nuestro país y se caracteriza por presentar alteración visual en todos los casos [15].

Temblor/Ataxia ligada al Cromosoma X Frágil (FXTAS)

Diversos autores han observado que en individuos con temblor/ataxia la prevalencia de alteraciones en el gen *FMR1* de retraso mental ligado al cromosoma X (OMIM *309550) [8] varía de 0-4% [5], esta proporción aumenta (5%) en los pacientes en que se ha descartado el diagnóstico de SCA, por lo que debe considerarse la siguiente causa genética de temblor y/o ataxia más frecuente y tiene otras implicaciones fenotípicas y reproductivas [6, 7] por lo que se recomienda considerarla como parte del abordaje de los pacientes con ataxia y temblor/ataxia. Aunque se ha señalado al temblor como signo básico para el diagnóstico de FXTAS, este puede variar en su severidad, estar ausente, tener una intensidad leve hasta ser severo e incapacitante [2].

El síndrome X frágil (SXF) es la causa más común de retraso mental familiar, afecta a uno de cada 2.500 varones y a una de cada 8.000 mujeres de la población. Es causado por una expansión del trinucleótido CGG en *FMR1*, el cual presenta valores mayores a 200 repetidos; se ha descrito que uno de cada 1233 varones y una de cada 411 mujeres son portadores de la premutación (PM) en *FMR1* (en el que se observan un total número de repeticiones CGG entre 50 y 200).

En los portadores de alelos en PM se ha descrito un espectro de patologías que pueden resumirse en 2 cuadros clínicos completamente distintos del retraso mental, la falla ovárica premutada (FOP) y un tipo de ataxia con temblor denominada FXTAS (por sus siglas en inglés “*fragile X tremor ataxia syndrome*”, que se puede traducir como -síndrome de temblor y ataxia asociado a X frágil) [16].

Este cuadro fue descrito por primera vez por Hagerman, et al, en el año de 1994 [7] en varones portadores de la PM. Esta patología se ha visto que comienza generalmente a partir de la quinta década de vida con un temblor de intención y una ataxia de tipo cerebelosa. Posteriormente aparecen dificultades para vestirse, conducir, escribir y comer. El curso del FXTAS es progresivo, con pérdidas de memoria y de la función ejecutiva, ansiedad, neuropatía periférica, temblor esencial y disfunción autonómica. Además, algunos pacientes pueden presentar otros síntomas como parkinsonismo, disautonomía o afectación de nervio periférico [17].

Otros pacientes portadores de la PM pueden presentarse con síntomas aislados que no cumplen los criterios de FXTAS pero pueden delimitarse dentro de este espectro.

Es conocido que los alelos en zona gris o intermedios (GZ) y PM al ser sometidos a meiosis pueden expandirse a rangos de mutación y ocasionar, en la descendencia SXF, este fenómeno fue conocido como “paradoja de Sherman”.

Mediante estudios volumétricos de IRM se ha puesto de manifiesto que, en los portadores de la PM, el cerebelo, el complejo de amígdala e hipocampo, el caudado, la ínsula, el tálamo izquierdo y el giro precentral y poscentral derecho están alterados y que los cambios en el caudado y la ínsula están relacionados con los niveles de mRNA de *FMR1*.

La literatura reporta que por medio de pruebas moleculares, los portadores de la PM muestran un aumento de los valores de mRNA de *FMR1* y un ligero descenso de los valores de proteína FMRP (proteína sintetizada por *FMR1*). Estas variaciones se correlacionan con el número de repeticiones CGG. En el límite superior de la PM (de 100 a 200 repeticiones CGG), la cantidad de mRNA de *FMR1* se ve incrementada unas 5 veces, mientras que los valores de proteína parecen estar reducidos [18]. El FXTAS afecta también a mujeres, aunque con una incidencia menor, debido a que se trata de una afectación asociada a un gen ligado al cromosoma X y hay efecto de compensación por el alelo normal en el otro cromosoma X.

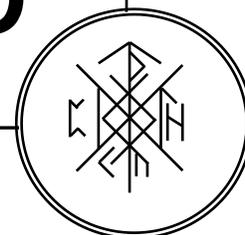
FMR1 contiene una región 5' no traducida de repetidos CGG que es polimórfica en la población general [8], variando en longitud de 6 a 55 triples aproximadamente. En la población normal mexicana su longitud abarca de 26-43 repetidos [19], siendo el más frecuente de 32 repetidos, seguido de 30 y 34 repetidos [20].

Se reporta que dentro de los alelos de *FMR1* normales cuando presentan hasta 40 repeticiones CGG, de 41 - 54 repetidos considerándolos en zona gris o alelos intermedios (GZ), la premutación (PM) se considera entre 55 y 199 repetidos, mientras que la mutación (FM) es considerada cuando se encuentran 200 o más repetidos [21] la mutación en *FMR1* inhibe su expresión como consecuencia de su metilación anormal [22]. Esto provoca la ausencia de FMRP, lo que desemboca en un trastorno del neurodesarrollo que ocasiona discapacidad intelectual severa de etiología hereditaria ligada al cromosoma X y con fenómeno de anticipación [23].

En México, el alelo normal de *FMR1* más frecuente es de 32 repetidos CGG (entre 16 y 40 repetidos), sin embargo no se han realizado estudios para la búsqueda sistemática de alelos en rangos de PM y GZ en pacientes adultos mexicanos con enfermedades neurodegenerativas posiblemente asociadas a *FMR1*.

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNN), en el departamento de Genética y Biología Molecular, se ha trabajado en los aspectos moleculares de las ataxias hereditarias desde 1994, y en el 40% de los casos (que representa cerca de 560 pacientes en las últimas dos décadas) no se ha logrado establecer un diagnóstico específico [9]. Por lo que se considera importante caracterizar molecularmente a la población con sospecha de FXTAS y es por ello que la presente investigación abordara este tema.

3. MARCO TEÓRICO



MARCO TEÓRICO

3.1. Cerebelo

El término “Cerebelo” proviene del latín “*cerebellum*”, que significa cerebro pequeño, posee forma de abultamiento voluminoso ovoide, sus medidas aproximadas son de 10 cm de ancho, 5 cm de altura y posee un peso entre 130-145 gr. Se localiza en la fosa craneal posterior y se sitúa por detrás de la protuberancia y el bulbo raquídeo; y por debajo del lóbulo occipital, de este lóbulo está separado por una porción de las meninges (duramadre) que es la envoltura del cerebro [24].

3.1.1. Estructura y función

El cerebelo se organiza en folios que se colocan uno tras otro en el eje rostrocaudal y transversalmente sobre el tronco del encéfalo. La corteza del cerebelo consta de cinco tipos neuronales (células de Purkinje, estrelladas, en cesto, de Golgi y de los granos), todos de carácter inhibitor salvo la célula de los granos. Las vías aferentes a la corteza cerebelosa llegan en forma de fibras musgosas y trepadoras y aportan información de origen somatosensorial, vestibular, acústico y visual, así como de los planes motores de la corteza cerebral y de otros centros motores troncoencefálicos y espinales. La única vía de salida de la corteza cerebral son los axones de las células de Purkinje que proyectan sobre los núcleos profundos del cerebelo. Éstos, a su vez, proyectan sobre distintos centros motores del tronco del encéfalo y, a través del tálamo, sobre diversas zonas de la corteza cerebral. Desde el punto de vista funcional, el cerebelo se organiza en pequeños módulos, idénticos en estructura, que se diferencian en el origen de sus aferencias y en el destino final de sus vías eferentes. El cerebelo realiza funciones de tipo coordinador o integrador en relación con procesos motores y cognitivos [25].

El cerebelo posee múltiples funciones, entre todas ellas la función principal es de integrar las vías sensitivas y las vías motoras. Existe una gran cantidad de haces nerviosos que conectan el cerebelo con otras estructuras encefálicas y

con la médula espinal. El cerebelo integra toda la información recibida para precisar y controlar las órdenes que la corteza cerebral manda al aparato locomotor a través de las vías motoras [26].

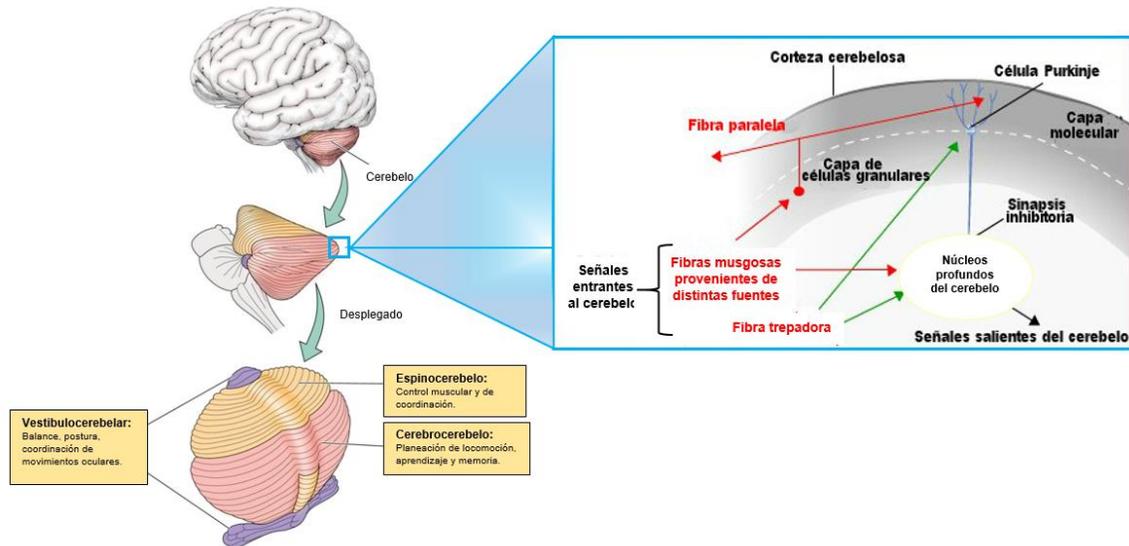


Figura 1. Ubicación del cerebelo (figura lateral izquierda) y Comunicación entre neuronas presentes en corteza cerebelosa (figura lateral derecha). Modificado de Fine, et al, (2002). [26]

3.1.2. Neuronas cerebelosas

Las neuronas cerebelosas contribuyen al movimiento mediante el control de la actividad de las motoneuronas superiores. Los circuitos neuronales conectan al cerebelo con las áreas motoras de la corteza cerebral, por medio del tálamo, y el tronco encefálico. Ya que una de las principales funciones del cerebelo es monitorizar las diferencias entre los movimientos deseados y los movimientos realizados. Entonces, envía la información a las motoneuronas superiores para reducir los errores en los movimientos, de esta manera el cerebelo coordina los movimientos del cuerpo y ayuda a mantener la postura normal y el equilibrio [27].

Por ello, lesiones a nivel del cerebelo no suelen causar parálisis pero sí desordenes relacionados con la ejecución de movimientos precisos, mantenimiento del equilibrio y la postura y aprendizaje motor. Los primeros estudios realizados por fisiólogos en el siglo XVIII indicaban que aquellos

pacientes con daño cerebelar mostraban problemas de coordinación motora y movimiento. Durante el siglo XIX comenzaron a realizarse los primeros experimentos funcionales, causando lesiones o ablaciones cerebelares en animales. Los fisiólogos observaban que tales lesiones generaban movimientos extraños y torpes, descoordinación y debilidad muscular. Estas observaciones y estudios llevaron a la conclusión de que el cerebelo era un órgano encargado del control de la motricidad. Sin embargo, las investigaciones modernas han mostrado que el cerebelo tiene un papel más amplio, estando así relacionado con ciertas funciones cognitivas como la atención y el procesamiento del lenguaje, la música, el aprendizaje y otros estímulos sensoriales temporales [28].

3.1.3. Vías Somatomotoras

Los circuitos neuronales del encéfalo y de la medula espinal coordinan todos los movimientos, voluntarios e involuntarios. Finalmente las señales inhibitorias y excitatorias que controlan el movimiento convergen en las neuronas motoras que se extienden desde el tronco encefálico y la medula espinal para inervar los músculos esqueléticos. Las neuronas denominadas como motoneuronas inferiores tienen sus cuerpos celulares en el tronco encefálico y en la medula espinal. Sus axones se extienden desde los núcleos motores de los nervios craneales hasta los músculos esqueléticos de todo el cuerpo. Las neuronas motoras inferiores representan la única eferencia del SNC a las fibras musculares esqueléticas [30].

3.1.4. Sistema Osteomioarticular

El sistema osteomioarticular está formado por el sistema osteoarticular (huesos, articulaciones y ligamentos) y el sistema muscular (músculos y tendones que unen los huesos). Permite al ser humano interactuar con el medio que le rodea mediante el movimiento o locomoción y sirve de sostén y protección al resto de órganos del cuerpo [29].

3.2. Ataxia Espinocerebelosa (SCA)

El término “ataxia” es utilizado desde la época de Hipócrates, su significado literal es de desorden o confusión [10]. En el ámbito médico, se entiende por ataxia a un trastorno neurológico de la coordinación de los movimientos, debido a la lesión del cerebelo, sus vías aferentes y/o eferentes, la médula espinal, los nervios periféricos y/o el tallo cerebral.

Las ataxias corresponden a un extenso grupo de enfermedades que ocasionan temblor y trastornos del equilibrio y de la marcha así como de la coordinación de los movimientos, lenguaje, por lo que en conjunto podrían considerarse como temblor/ataxia. Entre las diversas etiologías podemos encontrar intoxicaciones con metales o sustancias químicas, infecciones y factores hereditarios, entre otras las cuales otorgan su clasificación a este desorden [12].

El primer punto a considerar es el cuadro hereditario, el cual proporciona información de historia familiar con este padecimiento, se debe determinar su modo de herencia y si el conjunto de signos y síntomas pueden ser asociados para emitir un diagnóstico oportuno y certero. Cuando se presentan casos *de novo* o con patrón hereditario concreto es necesario la evaluación mediante técnicas de neuroimagen como el uso de la Imagen por Resonancia Magnética (IRM), Tomografía Axial Computarizada (TAC) o Tomografía por Emisión de Positrones – Tomografía Computada (PET/CT) con el fin de excluir etiologías secundarias o adquiridas como tumores y/o infartos. El alcoholismo, los traumatismos espinocerebelosos, la esclerosis múltiple y problemas vasculares son considerados como causas de este padecimiento; otras causas son las tóxicas por antiepilépticos, litio, radioterapia; y finalmente las infecciones, procesos neoplásicos, errores metabólicos o priones son consideradas entidades etiológicas [13].

Se puede clasificar las ataxias en dos grandes grupos; las ataxias adquiridas, las cuales son por degeneración alcohólica cerebelosa, degeneración

cerebelosa paraneoplásica, ataxias inmunomediadas, ataxias asociadas a deficiencias vitamínicas y ataxias relacionadas con eventos infecciosos; y en ataxias hereditarias, que engloban un amplio número de patologías y pueden dividirse en autosómicas dominante como las ataxias espinocerebelosas (SCAs, por sus siglas en inglés, que incluye más de 40 tipos), ataxias recesivas como la ataxia de Friedreich, las ligadas al cromosoma X como FXTAS y las de herencia mitocondriales, donde suele ser más un síntoma de diversas entidades [14].

Tabla 1. Principales tipos de Ataxia con su gen causal y locus del mismo. Ataxia de Friedreich [86], SCA 1 [87], SCA 2 [88], Enfermedad De Machado-Joseph (SCA3) [89], SCA 7 [90], SCA17 [91], Temblor Ataxia ligado al cromosoma X frágil (FXTAS) [92].

Tipo de Ataxia	Gen Causal	Locus
Ataxia de Friedreich OMIM (* 606829)	<i>FXN</i>	9q21.11
SCA 1 OMIM (* 601556)	<i>ATXN1</i>	6p22.3
SCA 2 OMIM (* 601517)	<i>ATXN2</i>	12q23-q24.1
Enfermedad De Machado-Joseph (SCA 3) OMIM (* 607047)	<i>ATXN3</i>	14q32.12
SCA 7 OMIM (* 607640)	<i>ATXN7</i>	3p14.1
SCA17 OMIM (* 600075)	<i>TBP</i>	6q27
Temblor Ataxia ligado al cromosoma X frágil (FXTAS) OMIM (* 309550)	<i>FMR1</i>	Xq27.3

3.3. Temblor Ataxia ligado al cromosoma X frágil (FXTAS)

El Temblor/Ataxia Ligado al Cromosoma X (FXTAS) es un cuadro que fue descrito por primera vez por Hagerman, et al, [7] en varones portadores de la PM que se caracteriza por un temblor de intención, ataxia de tipo cerebelosa. El curso del FXTAS es progresivo, avanzando con neuropatía periférica, parkinsonismo, déficit de memoria/cognición y problemas psiquiátricos [31]. Esta patología se ha visto que comienza generalmente a partir de la quinta década de vida

Es conocido que los alelos en GZ y PM al ser sometidos a meiosis pueden expandirse a rangos de mutación y ocasionar, en la descendencia síndrome de X frágil, este fenómeno era conocido como “paradoja de Sherman”.

La penetrancia del cuadro depende de la edad, la cual se ha observado que en un estado de PM generalmente es más baja en mujeres que en varones con PM, así mismo se ha reportado que entre la séptima y octava década de vida, las manifestaciones clínicas son más graves. El riesgo y la edad de inicio de los síntomas asociados a un FXTAS están influenciados por el número de repetidos CGG presentes en *FMR1*. Además, el sello neuropatológico de FXTAS, es decir, los números de inclusiones intracelulares en las neuronas y en los astrocitos están asociados al número de repetidos CGG que presente el individuo [32].

3.4. Gen *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1)

El gen *FMR1*, es el responsable del Síndrome de X Frágil (SXF) y se identificó en el año 1991 por clonado posicional [33]. El Síndrome de X Frágil es la causa más común de retraso mental hereditario [34].

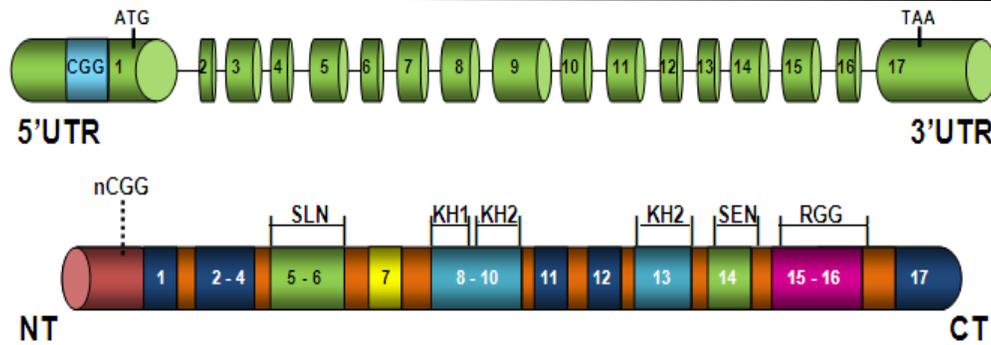


Figura 2. Esquema de *FMR1* (figura superior) y FMRP (figura inferior). 5'UTR: región 5' no codificante; ATG: codón de inicio de la traducción; TAA: codón de finalización de la traducción; 3'UTR: región 3' no codificante. La región azul del gen representa los repetidos CGG variables en población; SLN: señal de localización nuclear; SEN: señal de exportación nuclear; KH1, KH2, RGG: dominios de unión a RNA. Los números indican los diferentes exones. Modificado de Hagerman, et al, (2016). [35] y Fernandez, et al, (2013) [36].

La frecuencia estimada del SXF es de 1/4000 en hombres y 1/7000 en mujeres, siendo una de las principales características del síndrome una discapacidad de moderada a severa en hombres, macroorquidismo, cara alargada y pabellones auriculares grandes. Algunos de los pacientes con SXF pueden mostrar rasgos del espectro autista y padecer crisis epilépticas. Las mujeres también pueden estar afectadas, pero presentan un fenotipo menos severo que los hombres, el cual dependerá del grado de inactivación del cromosoma X con la mutación completa (el cual se cree es la causante de la enfermedad) [37]. Aproximadamente solo un tercio de las mujeres afectadas presentan retraso mental [38].

FMR1 se localiza en el sitio FRAXA en el brazo largo del cromosoma X, en el *locus* Xq27.3, está compuesto por 17 exones, abarca aproximadamente 18 kilobases (kb) y su producto transcripcional es un mRNA de 3.9 kb que puede sufrir de splicing alternativo y generar, por lo tanto, diferentes isoformas. Se ha sugerido que el pre-mRNA transcriptivo del gen puede generar hasta 20 isoformas diferentes de mRNA maduro [39]. La isoforma más larga de mRNA en seres humanos codifica para una proteína de 71kDa que contiene una variedad de secuencias y dominios funcionales [40], entre ellos se encuentran dos dominios de ribonucleoproteína K homologa (KH), dos dominios *Agnet-like*

en tándem dentro de las regiones N-terminales de la misma y el conjunto de residuos de arginina y glicina que constituyen la caja de RGG [93].

La región 5' no codificante de *FMR1* presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población. En la población normal esta variación oscila entre 6 y 55 repeticiones, siendo la media de 29-30 repeticiones [19].

La FM resulta generalmente en la hipermetilación de la región CpG del promotor del gen [41]. Este evento de hipermetilación conduce al silenciamiento del gen y consecuentemente la ausencia FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). La ausencia o inactividad de FMRP es la responsable de SXF.

Aún no se conoce en detalle el mecanismo molecular responsable de la expansión del número de tripletes, pero se ha sugerido que las expansiones ocurren en su mayoría en los gametos por un proceso que involucra una aberración en el mecanismo de duplicación y/o reparación del DNA, debido al deslizamiento de las enzimas sobre los fragmentos con las repeticiones [42] [43].

Los alelos normales son muy estables al transmitirse de padres a hijos. Un número de repeticiones CGG entre 41 y 54 se considera GZ y si bien, este estado del alelo no se expande a mutación completa en una generación, potencialmente puede hacerlo en dos o más [44]. Los alelos PM, por su parte, son muy inestables y pueden expandirse a FM en una sola generación. La expansión de un alelo PM al estado de FM ocurre casi exclusivamente cuando es transmitido por rama materna y rara vez por rama paterna. A su vez, se ha documentado en varios estudios que el riesgo de expansión a mutación completa a partir de la PM durante la transmisión materna, es mayor al aumentar el largo de los tripletes [46]. Por otro lado, la región de tripletes CGG puede presentar interrupciones AGG que se asociarían con la estabilidad del alelo y el riesgo de expansión a FM, sin embargo, algunos autores han demostrado que aquellos alelos sin interrupciones AGGs presentan una mayor probabilidad a la inestabilidad y expansión al estado de FM [46].

Si bien la relación entre el estado de mutación completa y el SXF se conoce desde hace dos décadas, en los últimos años se ha reportado que el estado de PM en *FMR1* está asociado a otros dos desórdenes clínicos: FOP y FXTAS.

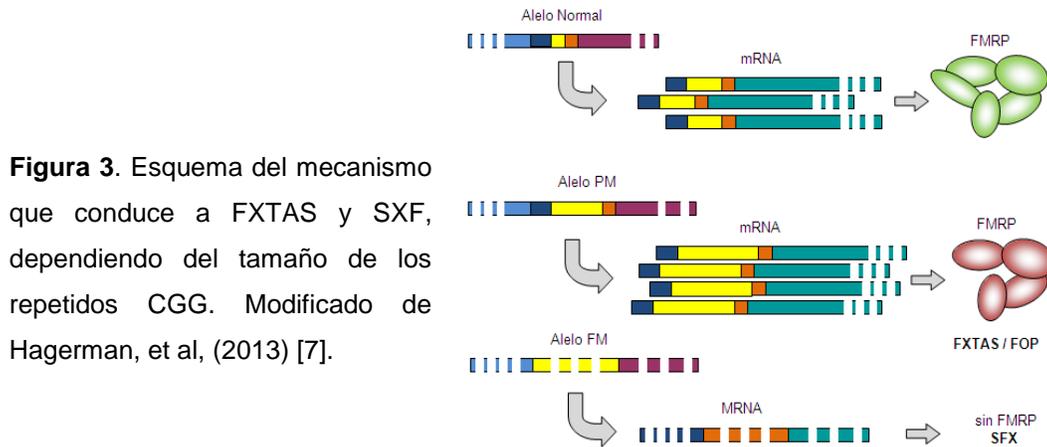


Figura 3. Esquema del mecanismo que conduce a FXTAS y SXF, dependiendo del tamaño de los repetidos CGG. Modificado de Hagerman, et al, (2013) [7].

En algunos pacientes con FXTAS que se han podido estudiar post mortem, se observó un aumento de la expresión del mRNA en cerebro [47], estos niveles aumentados de mRNA con tripletes expandidos en portadores de la PM, junto a la aparición de inclusiones intranucleares en neuronas y astrocitos de pacientes con FXTAS, llevó a postular un mecanismo de toxicidad de RNA como posible causa subyacente al desarrollo del síndrome [48].

3.5. Metilación

Las modificaciones epigenéticas pueden implicar cambios en la estructura de la cromatina que regula la expresión génica mediante la metilación de los residuos de citosina en el DNA y/o acetilación de histonas, entre otros [49].

En las células somáticas humanas, la 5-metilcitosina (5mC) constituye el 1% del total de las bases de DNA y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena de DNA, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, lo cual

permite generar una correlación inversa entre los niveles de metilación de DNA y la expresión génica [50].

Los dinucleótidos CpG no se encuentran distribuidos uniformemente en el genoma humano. Se estima que un 98% del genoma, los CpG están presentes en promedio una vez cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200 pb a varias kb que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (>60% de CG), denominadas "islas CpG". Aproximadamente un 60-90% de todas las secuencias de CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas [50] [51].

Solo una pequeña porción pero significativa de estas islas CpG que se encuentran en un estado ausente de metilación [52], puede mantenerse libre de metilación solo hasta el momento en que el gen asociado es silenciado durante el desarrollo embrionario [53]. Esto ocurre, particularmente, en algunos de los genes improntados, el cual es un proceso biológico por el cual un gen se encuentra marcado bioquímicamente indicando su origen parental, y localizados en el cromosoma X inactivo de las mujeres [49] [50] [94].

La maquinaria implicada comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las DNA-metiltransferasas, desmetilasas putativas, proteínas de unión a CpG metilados, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina.[54] La metilación del DNA es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X. En contraste, alteraciones en ella están implicadas en algunas enfermedades, especialmente aquellas relacionadas con el proceso neoplásico y en defectos en el desarrollo, como el retraso mental [55].

3.5.1. Metilación de *FMR1*

Como ya se ha mencionado, *FMR1* tiene un tamaño de 38 kb, con 17 exones, y es un gen de mantenimiento con una isla CpG en el promotor [56]. En la región 5' no codificante del primer exón contiene una región polimórfica de repetidos CGG con una distribución normal entre 6 y aproximadamente 50 tripletes y una frecuencia máxima de 29 repetidos [57]. En los pacientes con SXF, el número de tripletes se eleva a más de 200, y puede alcanzar los 1000. Estas expansiones se acompañan de la metilación aberrante del promotor, con el consiguiente silenciamiento del gen. La falta de expresión de FMRP causa los síntomas característicos de este síndrome [58]. En los portadores de PM, el tamaño de los repetidos varía entre 50 a 200, son inestables, con tendencia a expandirse en las siguientes generaciones si el alelo se transmite por vía materna. En las PM, la isla CpG del promotor no se metila y no suele aparecer sintomatología. No se conoce el mecanismo de la metilación de *novoo* del promotor, a consecuencia de la expansión de los tripletes por encima de unos 200, pero se propone que las estructuras de horquilla que forman las secuencias largas de CGG constituyen buenos sustratos para la DNA-metiltransferasa 1 (Dnmt1) [59]. También se especula con un mecanismo defensivo para mantener en silencio el DNA repetitivo [60].

FMR1 es ubicuo y de condición de gen constitucional que hace que se exprese de forma permanente en la célula; solo se observa su ausencia en el cromosoma X inactivo de las mujeres o en los pacientes con SXF [61].

3.6. Interrupción AGG e inestabilidad Genética

El mecanismo molecular específico que genera la expansión mutacional aún no está del todo claro, pero se cree que ocurra un error en el deslizamiento de la DNA polimerasa (DNApol) durante la replicación, en la formación de la doble hélice [62]. Tanto la inestabilidad como la transcripción son sensibles a la longitud del fragmento, al número de repetidos y a la metilación de las islas CpG ya que estos factores disminuyen el ensamblaje de los nucleosomas [63].

Dentro de la región CGG se encuentran interrupciones AGG en los alelos normales, que parecen conferir estabilidad a la secuencia y previenen el deslizamiento de la DNAPol durante la replicación. Las interrupciones AGG pueden modular la capacidad del fragmento para unirse a la cromatina, ya que favorecen el ensamblaje del nucleosoma cerca de las secuencias *random*, las cuales son genéticamente estables. El efecto de dichas interrupciones depende de la metilación de las islas CpG y del estado de acetilación de histonas [63].

Las secuencias AGG intercaladas y la longitud del triplete CGG, se cree que son factores determinantes para la estabilidad alélica. Estudios soportan que la pérdida de las interrupciones AGG en el extremo 3' desestabiliza la región provocando la expansión del triplete. Así mismo la presencia de estas interrupciones produce una disminución de la horquilla de replicación, provocada por las secuencias largas de los repetidos, lo cual provee una facilidad a la progresión de la replicación a través de las regiones repetidas [64].

3.7. Expresión de FMR1

El RNA mensajero (mRNA), es la molécula que transmite la información genética codificada en el DNA, determinando posteriormente el orden en que se unirán los aminoácidos en la síntesis de proteínas. Se diferencia del DNA en el azúcar que lleva en su estructura, una ribosa, en ser monocatenario, en su tamaño y en ser rápidamente degradado. Se sintetiza en el núcleo celular a partir del proceso denominado transcripción del DNA y sufre diferentes fases durante su tiempo de vida [65].

El primer intrón de *FMR1* tiene un tamaño mayor que la media, lo cual sugiere un papel importante en la regulación de la transcripción del mismo. Otra característica de la transcripción de *FMR1* es que presenta varios sitios alternativos de corte y empalme (*splicing*) que originan diferentes moléculas de mRNA. Estos sitios se encuentran en los exones 12, 14,15 y 17, pudiendo excluir por completo el exón 12 sobre todo y a veces el 14 y parcialmente el 15 y el 17. Todas estas isoformas del mRNA de *FMR1* siguen la misma pauta de

lectura, salvo excepciones en los exones 14 y 15, donde puede darse una secuencia aminoacídica diferente en el extremo carboxi-terminal de la FMRP [65]. El transcrito mayoritario en el cerebro y que más frecuentemente se expresa tiene un tamaño de 4,4 Kb.

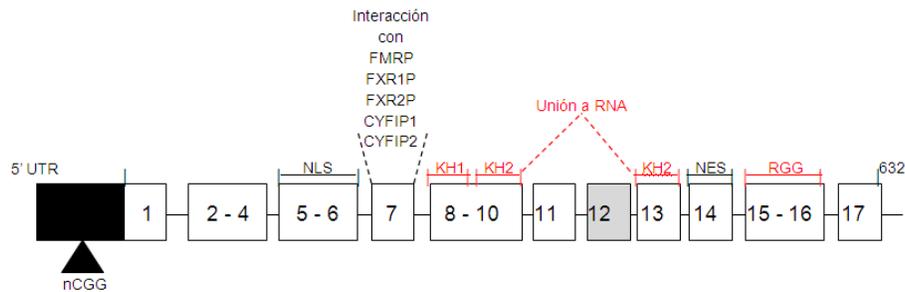


Figura 4. Estructura de *FMR1* con sus 17 exones. Se muestran los dominios funcionales de FMRP y los sitios de interacción con otras moléculas. Los motivos de unión al RNA se marcan en rojo. El exón 12 está en gris para indicar que sufre “splicing” alternativo. Modificado de Bardoni, et al, (2002) [66].

3.7.1. Expresión de *FMR1* con FM

Durante los años 90 se creyó que la FM propiciaba una reducción o ausencia de FMRP, como consecuencia directa del silenciamiento causado por la metilación de *FMR1*. Sin embargo se ha reportado que más de la mitad de los hombres con alelos con la FM e hipermetilación producen bajas cantidades de mRNA de *FMR1* y que algunos pacientes con FM incluso presentan niveles cercanos a la normalidad [67].

Se desconoce todavía el por qué algunos hombres con la FM e hipermetilación producen mRNA mientras que otros no. Se ha especulado con la idea de que la hipermetilación de una subregión de elementos CpG sea clave en el silenciamiento del gen al existir 5 lugares de interacción DNA-proteína donde se unen diferentes factores transcripcionales [68] [69].

En el caso de las mujeres con la FM, éstas presentan mRNA y FMRP, lo que es evidente dada la existencia de dos cromosomas X. Sin embargo, los niveles medios de mRNA en ellas presentan una gran variación, mucho mayor que en

los hombres [70]. No obstante, considerando la inactivación del cromosoma X, los niveles de mRNA del cromosoma X normal activo se acercan a los parámetros normales esperados. De ahí, que los hallazgos descritos en cuanto a la expresión de *FMR1* en mujeres, se correlacionan con dos observaciones básicas: el porcentaje de inactivación del cromosoma X normal y una mayor variación en la afectación clínica con una menor severidad.

3.7.2. Expresión de *FMR1* en rangos de Premutación

Se podría deducir que la actividad transcripcional de *FMR1* se encuentra disminuida en portadores, sin embargo, se ha comprobado que los niveles de mRNA se encuentran elevados en individuos con PM [71].

También se ha descrito un aumento del mRNA en mujeres portadoras de la PM, pero menos notable que en los hombres y con una mayor variación [69]. Los elevados niveles de mRNA evidenciaron la existencia de una desregulación en la expresión de *FMR1* en el rango de la PM. Por lo tanto, aunque no de manera directa, parece existir una relación entre esta anomalía en los niveles de expresión y la afectación clínica que presentan los individuos [72].

A pesar de los elevados niveles de mRNA, se ha demostrado que existe una reducción moderada de los niveles de FMRP en las personas con la PM, que parece ser gradual según aumenta el número de CGG [73]. Una posible explicación a estos bajos niveles de la proteína se debe a una deficiencia a nivel traduccional en individuos con la FM [74].

Volviendo al por qué de la presencia de esos elevados niveles de mRNA [71], se ha propuesto que podrían ser debidos a un defecto en la traducción, como mecanismo de respuesta al mismo. Es decir, la célula intentaría compensar los reducidos niveles de proteína estimulando la producción de mRNA, por lo que, además, las manifestaciones clínicas en la PM serían menores puesto que los elevados niveles de mensajero podrían parcialmente cubrir el déficit de proteína.

Otro efecto a destacar en el rango de la PM es la influencia de la expansión de los tripletes CGG en la posición del inicio de la transcripción tanto en células neuronales como no neuronales [75]. De hecho el aumento de repeticiones CGG estaría relacionado con un desplazamiento hacia arriba del codón inicio, por lo que el número de tripletes CGG modularía no solo el nivel de actividad de *FMR1* sino también la selección del lugar de inicio de la transcripción. Es decir que el mRNA de los individuos con PM diferiría del rango normal, no únicamente por la extensión del número de tripletes CGG, sino también por una extensión de la secuencia no repetitiva hacia el extremo 5'-UTR.

3.8. FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein)

La proteína codificada por *FMR1*, denominada “Fragile Mental Retardation Protein”, FMRP, tiene un peso molecular de 69 kDa. La existencia de procesos de corte y empalme alternativos da lugar a varias isoformas [65]. Se localiza primariamente en el citoplasma de células, como las neuronas, pero también ha sido localizada en el núcleo por microscopía óptica y electrónica. En las neuronas tanto FMRP, como su mRNA, se localizan en los axones y en las espinas dendríticas donde se asocia con poliribosomas y se regula de manera positiva en respuesta a la estimulación por receptores de glutamato metabotrópico (mGluRs) [76].

3.8.1. Interacción de FMRP con otras proteínas

FMR1 parece estar relacionado evolutivamente con 2 genes autosómicos parálogos con los cuales comparte un alto grado de homología en su secuencia: son los genes denominados FXR1 y FRX2, que codifican las proteínas FXR1P y FXR2P [77].

La mayoría de las proteínas funcionan como un complejo macromolecular junto con otras proteínas, cofactores o ácidos nucleicos. La FMRP interactúa con las proteínas homologas FXR1P y FRX2P en el núcleo y el citoplasma [78].

Otras proteínas que interactúan con la FMRP han sido denominadas en función de su localización celular: NUF1P1, 82-FIP, CYFIP1 y 2, etc. [66].

3.8.2. Función de FMRP

Además de los dominios descritos, que implican la unión entre la FMRP y diversos mRNA, *FMR1* presenta una señal de exportación citoplasmática (NES), lo cual sugiere un transporte desde el núcleo celular al citoplasma. Además, en 1996 se identificó una secuencia de transporte de localización nuclear (NLS), de transporte contrario, por lo que FMRP parece fluir hacia ambos lados del núcleo celular y modificar la traducción de un cierto número de transcritos a los cuales se une [79].

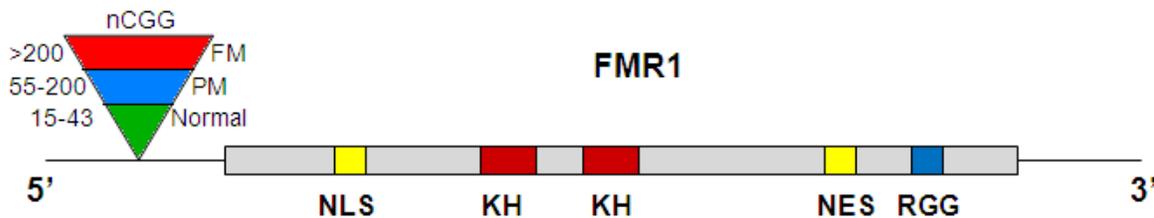


Figura 5. Representación esquemática de los dominios de *FMR1*.
Modificado de Eberhart, et al, (1996). [79]

En el modelo funcional propuesto por Eberhart, et al, (1996) [79] la FMRP es transportada primero dentro del núcleo, mediante la señal de localización nuclear NLS. Una vez en el núcleo se asocia con otras proteínas y varios mRNA para formar el complejo FMRP- mRNP. Este complejo es entonces transportado al citoplasma, vía la señal de exportación NES, donde se asocia con ribosomas, influyendo en la traducción de los mRNA que son ligandos de la FMRP. No está claro si todos los mRNPs son idénticos, exceptuando para los mRNA unidos, o si hay diferencias entre las proteínas asociadas. Si existieran diferentes complejos proteicos, cada uno podría responder de manera distinta a la ausencia de la FMRP [66].

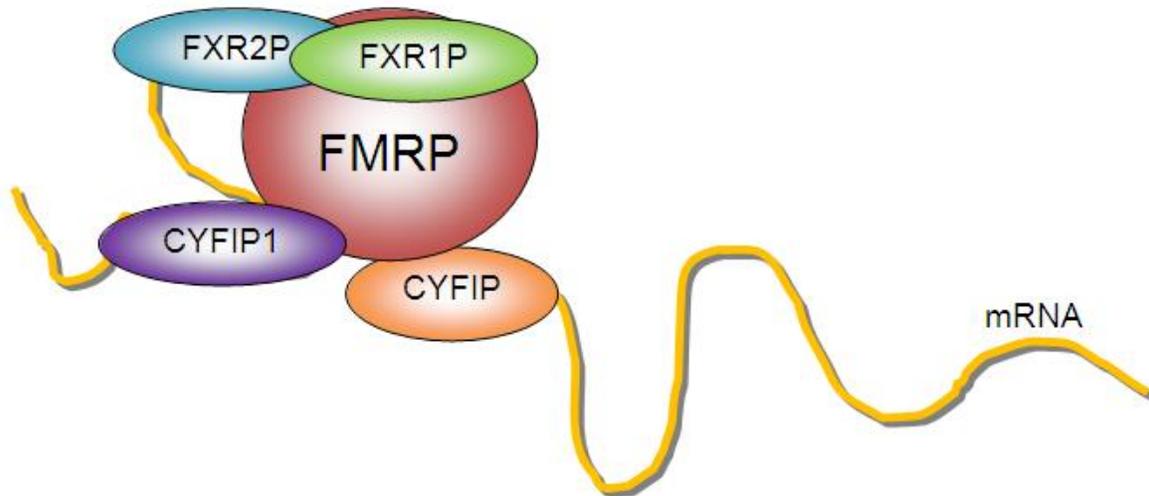


Figura 6. Esquema del complejo ribonucléico transportador del mRNA mediado por la FMRP. Modificado de Bardoni, et al, (2002) [66].

Se ha relacionado la FMRP con el receptor de Glutamato (mGluR), que intentan relacionar la proteína con ciertos parámetros clínicos en el SXF. Según esta hipótesis, la ausencia de FMRP supondría una sobre-amplificación de la respuesta del mGluR y un aumento de la plasticidad sináptica neuronal conocida como LTD (“Long Term depresión”), lo que a su vez está implicado en las anomalías morfológicas que tienen lugar en los pacientes con SXF, tales como la existencia de espinas dendríticas anormalmente largas e inmaduras [80]. En resumen, la función de FMRP sería la regulación de un gran número de genes necesarios para la correcta plasticidad sináptica, por lo que su ausencia causaría la pérdida de esa regulación.

Finalmente, sobre el modelo de regulación por parte de la FMRP se ha descrito también un posible papel de la ruta del RNA interferente (RNAi), de manera que la FMRP podría regular la traducción de sus mRNA asociados mediante la interacción con los mRNA. Esta función se sustenta en el descubrimiento de pequeños RNAs que se corresponden con los elementos repetidos CGG y que podrían derivar de un gran RNA de doble cadena

generado por la transcripción bidireccional de las secuencias repetitivas desde promotores adyacentes [81].

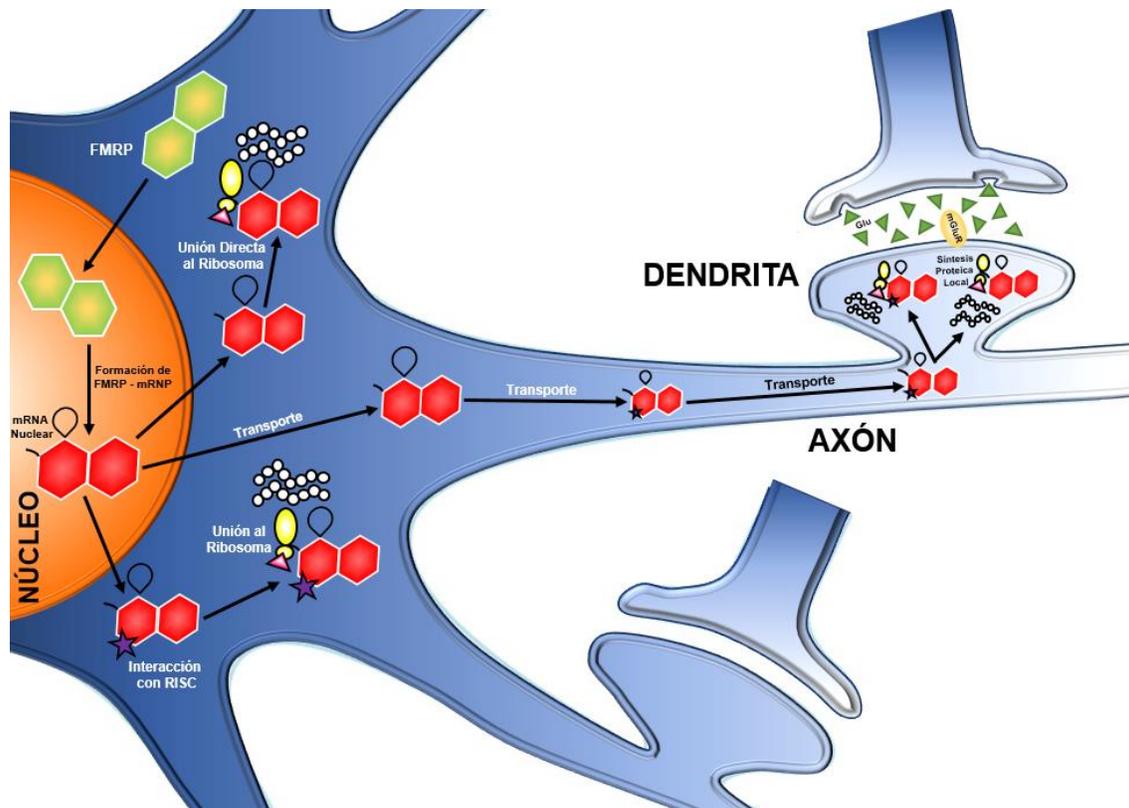


Figura 7. Modelo de función de la FMRP en la neurona. FMRP entra en el núcleo de la neurona mediante la señal NLS, donde forma un complejo con mRNA al interactuar con transcritos específicos y proteínas. Este complejo se transporta fuera del núcleo por la señal NES y una vez en el citoplasma puede asociarse directamente a ribosomas o interactuar previamente con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), de ambas maneras regulan la síntesis de proteínas en el cuerpo celular de la neurona. Asimismo los complejos pueden ser transportados dentro de las dendritas para regular la síntesis de proteínas locales en respuesta a señales de estimulación sináptica, tales como la activación del receptor del glutamato (mGluR). Modificado de Jin, et al, (2004) [81].

3.9. Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

El ácido desoxirribonucleico (DNA), es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos, y es responsable de su transmisión hereditaria. La función principal del DNA es el almacenamiento a largo plazo de información para formar otros componentes de las células, como las proteínas y las moléculas de RNA. Los segmentos de DNA que llevan esta información genética son llamados genes, pero las otras secuencias de DNA tienen propósitos estructurales o toman parte en la regulación del uso de esta información genética [95].

3.9.1. Estructura del DNA

Desde el punto de vista químico, el DNA es un polímero de nucleótidos, un polímero es un compuesto formado por muchas unidades simples conectadas entre sí, es decir, un polinucleótido. El DNA está formado por un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, por un carbohidrato de 5 átomos de Carbono, pentosa (desoxirribosa), una base nitrogenada, que puede ser Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) o Guanina (G), y un grupo fosfato que genera el enlace fosfodiéster, el cual actúa uniendo los nucleótidos entre sí. Además se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética [95].

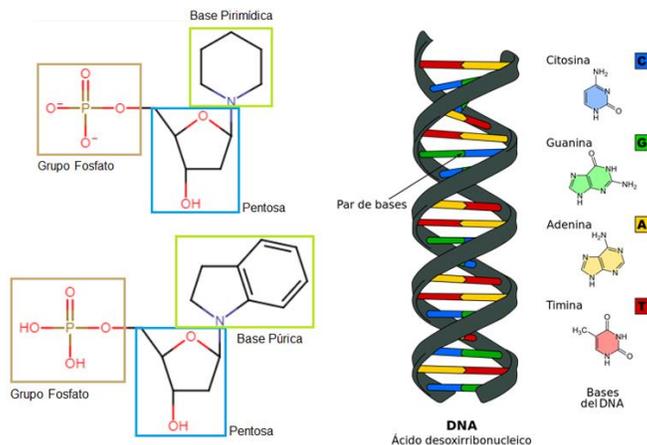


Figura 8. Lado izquierdo esquema de la conformación de los nucleótidos, lado derecho esquema de la doble hélice de DNA.

Para que la información que contiene el DNA pueda ser utilizada por la maquinaria celular, debe copiarse en Ácido Ribonucleico (RNA). Las moléculas de RNA se copian exactamente del DNA mediante la transcripción. Una vez procesadas en el núcleo celular, las moléculas de RNA pueden salir al citoplasma para su utilización posterior. La información contenida en el RNA se traduce por medio del código genético, que especifica la secuencia de los aminoácidos de las proteínas según cada codón, un triplete de nucleótidos, para cada aminoácido [95].

Las secuencias de DNA que constituyen la unidad fundamental, física y funcional de la herencia se denominan genes. Cada gen contiene una parte que se transcribe a RNA (exón) y otra que se encarga de definir cuándo y dónde deben expresarse (intrón). La información contenida en los genes se emplea para generar el RNA [95].

Dentro de las células, el DNA está organizado en cromosomas que, durante el ciclo celular, se duplican antes de que la célula se divida. Los organismos eucariotas almacenan la mayor parte del DNA dentro del núcleo celular y una mínima parte en las mitocondrias. Existen proteínas que interactúan con el DNA, como por ejemplo las histonas, proteínas estructurales que confieren estabilidad a la molécula, y los factores de transcripción, los cuales reconocen secuencias reguladoras del DNA y especifican la pauta de transcripción de los genes [95].

3.10. TP-PCR

La reacción TP- PCR (por sus siglas en inglés *Triplet-Repeat Primer*) utiliza un par de *primers* específicos de locus, *Forward* y *Reverse*, que hibrida al inicio y final de las repeticiones, además posee un *primer* adicional que amplifica a partir de múltiples sitios ya amplificados dentro de la repetición. La especificidad está dictada por el *primer* específico de locus marcado fluorescentemente. TP-PCR proporciona una escala característica en el trazado de fluorescencia que permite la identificación rápida de repeticiones patogénicas grandes [97].

El Kit comercial AmpliDeX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®), describe el proveedor que fue diseñado para identificar todos los posibles repetidos de CGG presentes en *FMR1*, esto incluye los cuatro estados, normal, GZ, PM y FM, mediante el uso de una electroforesis capilar, este mismo ensayo permite dos tipos diferentes de pruebas: una PCR-gen específica, donde los *primers Forward* y *Reverse* amplifican la longitud completa acorde al número de repetidos.



Figura 9. Representación de la localización de los *primers* para la PCR-gen específico de *FMR1*. Modificado de Seneca, et al, (2012) [96].

Y una TP-PCR (por sus siglas en inglés *Triplet-Repeat Primer*) en la región 5' no codificante de *FMR1*, la cual contiene un tercer *primer* quimérico marcado con el fluoróforo FAM, que en combinación con los *primers Forward* y *Reverse* específicos para *FMR1* logran una hibridación aleatoria con la región donde se hallan los repetidos CGG, lo que provoca la generación de varios amplicones de varios tamaños según sea el número de repetidos CGG presente en la muestra aunado al fragmento del alelo específico del propio gen [82] [83].

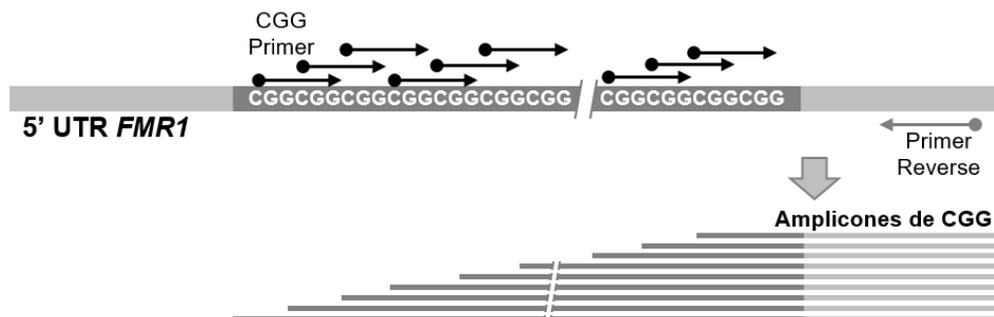


Figura 10. Representación de la TP-PCR y del tercer *primer* quimérico hibridando aleatoriamente con los repetidos CGG generando amplicones de diversos tamaños. Modificado de Seneca, et al, (2012) [96].

Todos los amplicones son analizados mediante una electroforesis capilar. La longitud del producto de PCR permite detectar con precisión cualquier alelo menor a 200 repetidos. La detección del amplicon de CGG producto de la TP-PCR, genera un único pico, siendo notorio un individuo masculino o un individuo femenino homocigoto, de lo contrario si detecta dos picos se dice que es un individuo femenino heterocigoto. También este kit puede identificar las interrupciones AGG, como una señal específica previa a la detección del alelo [83].

3.11. mPCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa específica de Metilación (m-PCR) es una técnica que ha facilitado la detección de la hipermetilación del promotor en islas CpG. La capacidad de la m-PCR para diferenciar una citosina metilada de no metilada depende de una previa modificación al DNA, ya sea por tratamiento de bisulfito de sodio, el cual actúa desaminando las citosinas del DNA convirtiendo estas en uracilo mientras que es incapaz de actuar sobre las citosinas que se encuentren metiladas, o digestión enzimática, donde el sitio de corte una enzima de restricción dependa del estado metilado o no metilado evidenciando la ausencia o presencia de un corte enzimático, seguido de una PCR sobre en DNA modificado utilizando pares de *primers* complementarios [98].

El Kit comercial AmplideX© mPCR *FMR1* (Asuragen®), describe el proveedor que fue diseñado para cuantificar porcentualmente el grado de metilación en los alelos presentes en *FMR1*. Para ellos se llevan a cabo dos reacciones por separado, las cuales parten de una mezcla de dos plásmidos: uno de Control de Digestión (CtrlDig), marcado con FAM, y uno con Control de Referencia (CtrlRef), marcado con HEX, se emplea una digestión enzimática con HpaII [82], la cual es una enzima de restricción de tipo II que es producida por el género y especie bacteriano *Haemophilus parainfluenzae* que posee una diana de restricción en el ds-DNA dependiente de una secuencia no

metilada, palindrómica y asimétrica, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos adhesivos [84].

Sitio de reconocimiento	Resultado de Corte
5'... C↓CGG ...3'	5'... C CGG ...3'
3'...GGC↑C...5'	3'...GGC C...5'

Figura 11. Diagrama de restricción de HpaII. Modificado de KEGG, sin año [84].

De lo contrario, si se encuentra una isla CpG metilada entonces la actividad catalítica se verá inhibida, lo cual se ve reflejado en la ausencia de metilación en cualquiera de los sitios de corte de la enzima resulta en digestión y por lo tanto no amplifica [85].

Región de Amplicon: FMR1 5' UTR

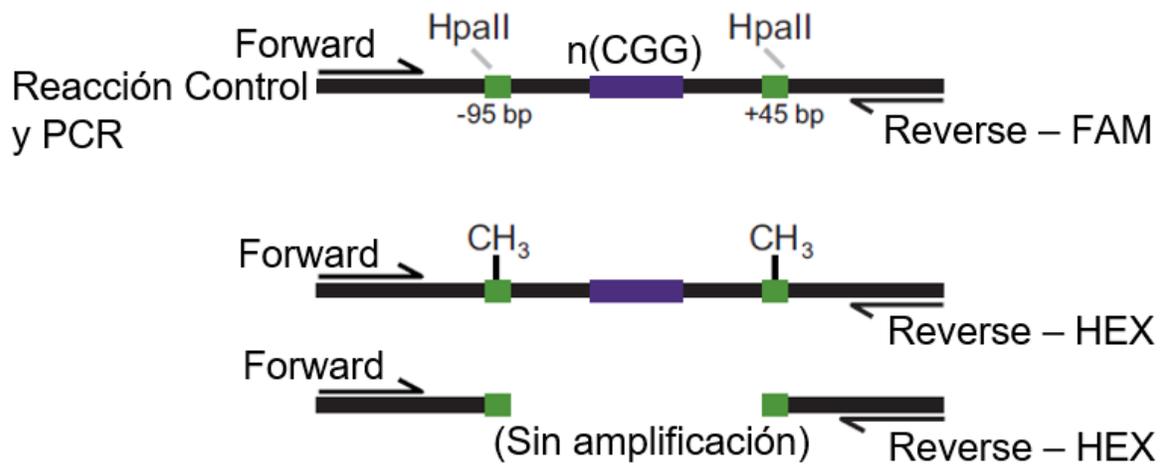


Figura 12. Representación de la región del amplicón y resultados de digestión Modificado de Grasso, et al, (2014) [85].

Solo los alelos completamente metilados son amplificados usando el fluoroforo HEX, y como se ha mencionado, la falta de metilación en cualquier sitio no origina un corte y por lo tanto da lugar a amplificación marcada con FAM [85].

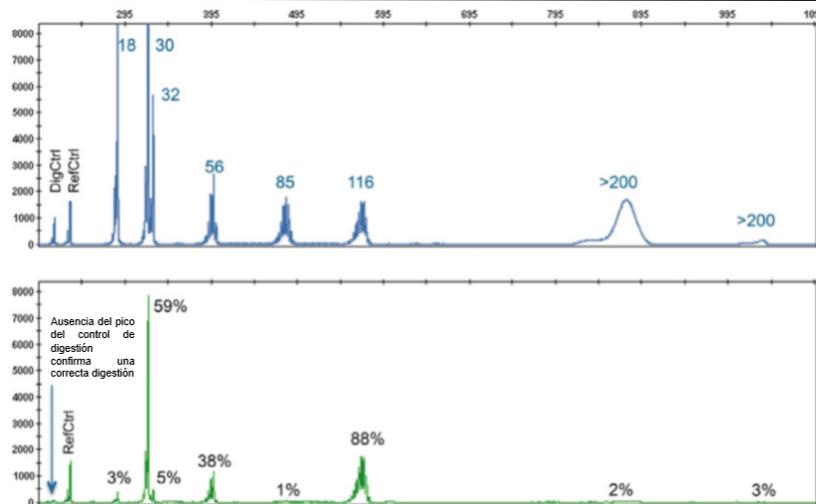


Figura 13. Ejemplo de los dos colores para un control de múltiples alelos. El electroferograma en el canal FAM (azul) muestra la determinación del repetido CGG presente. La intensidad de señal en el canal HEX (verde) corresponde a la presencia de metilación del alelo para *FMR1*. Modificado de Grasso, et al, (2014) [85].

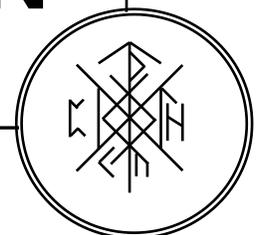
El porcentaje de metilación (%Met) para cada pico generado, es calculado como la proporción normalizada de la altura del pico en el canal HEX contra el canal FAM para cada amplicón del alelo, según la ecuación [85]:

$$\%Me_{i,height} = 100 \times \frac{\left[\frac{Peak_i}{RefCtrl} \right]_{HEX}}{\left[\frac{Peak_i}{RefCtrl} \right]_{FAM}}$$

Figura 14. Ecuación para el cálculo del porcentaje de metilación. Obtenido de Grasso, et al, (2014) [85].

Donde el Pico_{*i*}(Peak_{*i*}) corresponde a la altura de cada amplicón del alelo y RefCtrl corresponde a la altura del pico del control de referencia de cada color [85].

4. JUSTIFICACIÓN



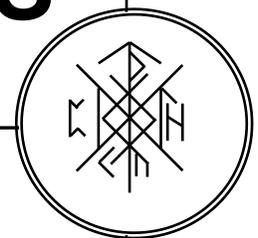
JUSTIFICACIÓN

4. JUSTIFICACIÓN

En México, el alelo normal de *FMR1* más frecuente es de 32 repetidos CGG (entre 16 y 40 repetidos), sin embargo no se han realizado estudios para la búsqueda sistemática de alelos en rangos de premutación y zona gris en pacientes adultos mexicanos con enfermedades neurodegenerativas posiblemente asociadas al gen *FMR1*.

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNN), en el departamento de Genética y Biología Molecular, se ha trabajado en los aspectos moleculares de las ataxias hereditarias desde 1994, realizándose únicamente el diagnóstico molecular en genes de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, 3, 7 y Ataxia de Friedreich, y en el 40% de los casos (que representa cerca de 560 pacientes en las últimas dos décadas) no se ha logrado establecer un diagnóstico específico por lo que se considera importante caracterizar molecularmente a la población con sospecha de FXTAS y con base a la ya mencionada problemática se aborda este tema en la presente investigación. [9]

5. HIPÓTESIS

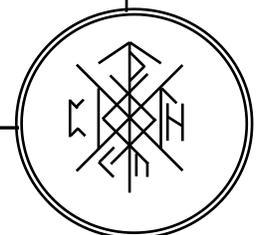


HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

Sí se determina la frecuencia de FXTAS, en pacientes sin un diagnóstico específico, se podrá encontrar que al menos en un 5% de la totalidad de las muestras puedan presentar un estado de premutación y/o zona gris.

6. OBJETIVOS



OBJETIVOS

6. OBJETIVO

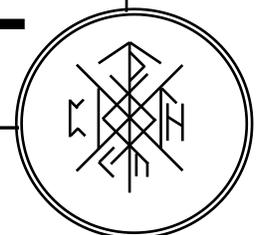
6.1. Objetivo General:

Determinar el número de repetidos del trinucleótido expandido CGG del gen *FMR1* en pacientes mexicanos con temblor/ataxia de etiología no determinada mediante un análisis de fragmentos empleando la técnica de TP-PCR y de mPCR para conocer la frecuencia de alelos en Zona Gris y Premutación así como el porcentaje de metilación y poder otorgar un diagnóstico certero ante dicho padecimiento.

6.2. Objetivos Particulares:

- Genotipificar la longitud del expandido CGG de *FMR1* en una población de pacientes mexicanos con temblor/ataxia en quienes previamente se haya descartado las mutaciones en genes de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, 3, 7 y Ataxia de Friedreich.
- Determinar el estado de metilación del expandido CGG únicamente en aquellas muestras que se encuentren en estado de zona gris y premutación de *FMR1* en una población de pacientes mexicanos con temblor/ataxia en quienes previamente se haya descartado las mutaciones en genes de tipo 2, 3, 7 y Ataxia de Friedreich.
- Implementar el uso de las técnicas de TP-PCR y de mPCR para el análisis de fragmentos de esta patología dentro departamento de Genética y Biología Molecular del INNN.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El total procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Genética, perteneciente a Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velazco Suárez”, todas las muestras de los pacientes son de nacionalidad mexicana y fueron atendidos en la Clínica de Movimientos Anormales y Clínica de Neurogenética pertenecientes al mismo instituto.

A continuación se muestra un diagrama general del trabajo.

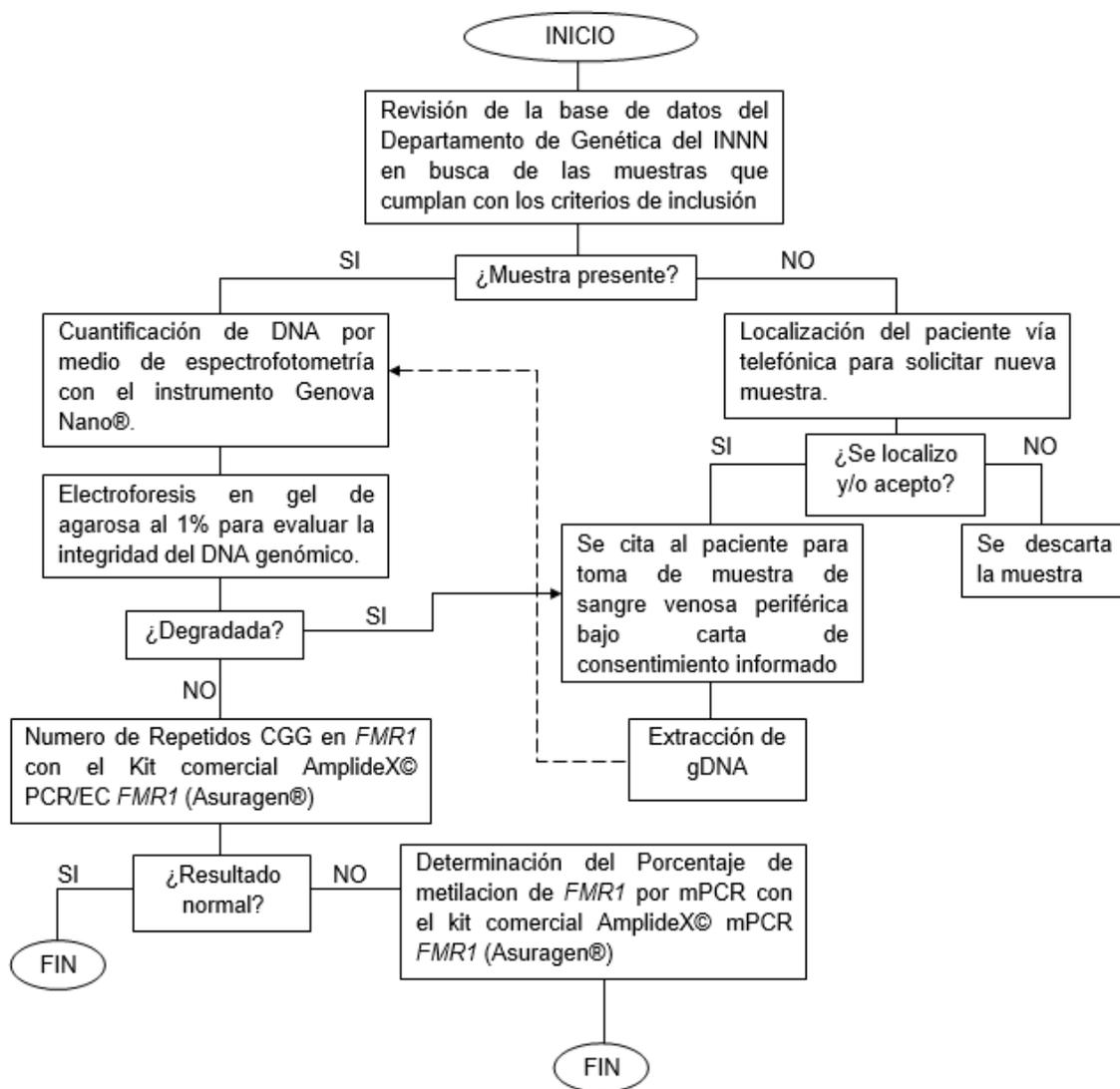


Figura 15. Diagrama general del trabajo.

7.1. Criterios de inclusion

Se llevó a cabo una búsqueda de las muestras de sujetos conocidos por temblor/ataxia con diagnóstico molecular negativo para la enfermedad de Ataxia Espinocerebelosa (SCA) tipo 2, 3, 7 y Ataxia de Friedreich, mismas que son diagnosticadas en el laboratorio. Durante la elaboración del presente trabajo fueron incluidos nuevas muestras a las que de la misma manera el diagnóstico molecular fue negativo para SCA; otras muestras se les envió por parte de la clínica de Genética directamente al protocolo con base en la historia clínica, Imagenología y antecedentes.

7.2. Muestras de DNA

Se tuvieron un total de 110 muestras, de las cuales 100 ya se encuentran en el banco de DNA del mismo laboratorio y las 10 restatantes fueron extraidas a partir de sangre periferica empleando la siguiente metodologia.

1. Extracción de DNA a partir de muestras sanguíneas con *DNeasy Blood & Tissue* de Quiagen ®:
 - 1.1. Añadir a cada columna 200 µl sangre periférica, obtenida por punción venosa, y agregar 200 µl de buffer PBS más 20 µl de Proteinasa K, agitar por inversión.
 - 1.2. Añadir 200 µl de buffer AL, agitar con ayuda de vortex e incubar a 56°C por 10 minutos.
 - 1.3. Colocar 200 µl de etanol absoluto, agitar con ayuda de vortex y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Desechar el filtrado.
 - 1.4. Adicionar 500 µl de buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Desechar el filtrado.
 - 1.5. Añadir 500 µl de buffer AW2 y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Desechar el filtrado.
 - 1.6. Adicionar 200 µl de buffer AE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, para obtener el DNA.

Todas las muestras fueron cuantificadas por medio de espectrofotometría con el instrumento Genova Nano®, se les realizó una dilución para obtener muestras de 50 ng/μL de concentración y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del DNA genómico.

7.3. Numero de Repetidos CGG en FMR1

Se utilizó el Kit comercial AmplideX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®) para la determinación del número de repetidos CGG. La TP-PCR (por sus siglas en ingles *Triplet-Repeat Primer*) y Electroforesis Capilar (EC) se realizaron de acuerdo a los protocolos del fabricante [82]. Añadiendo las siguientes cantidades por muestra:

Tabla 2. Volúmenes específicos para cada reacción

PCR Master Mix	Vol / Rxn (μL)
GC-Rich AMP Buffer	11.45
<i>FMR1</i> F,R FAM-Primers	0.50
<i>FMR1</i> CGG Primer	0.50
Diluyente	0.50
GC-Rich Polymerase Mix	0.05
DNAg [20-80 ng/ μL]	2.0
Volumen Total (μL)	15.00

Después de añadir dicho contenido a cada muestras, la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador marca MultiGene™ OptimaxThermalCycle (LabNet®,USA) con las siguientes condiciones:

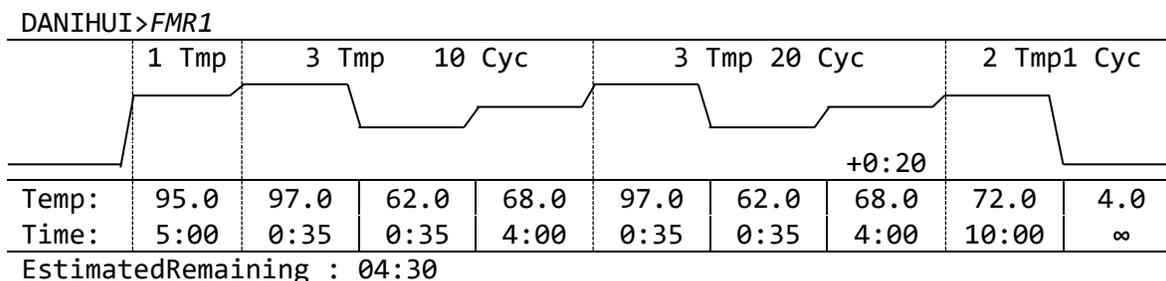


Figura 16. Ciclos para la TP-PCR.

Transcurridas las 4:30 horas de la reacción de PCR se comienza la EC, añadiendo a cada muestra el siguiente Master Mix:

Tabla 3. Volúmenes específicos para realizar la EC

Electroforesis Master Mix	Vol / Rxn (µL)
Hi-Di Formamide	11.0
ROX Ladder	2.0
Producto de PCR	2.0
Volumen Total (µL)	15.00

Se prosiguió a montar una placa de 96 pozos para secuenciación, un pozo por cada muestra, se centrifugo y desnaturalizo a 95°C por 2 minutos y se llevó al secuenciador AppliedBiosystems 3130 Genetic Analyzer (capilar de 36 cm). Los electroferogramas generados fueron interpretados con ayuda del programa GeneMapper® Version 4.0 (previamente ajustado para un tamaño de alelo Normal, GZ, PM y FM), dando una señal de color azul para FAM.

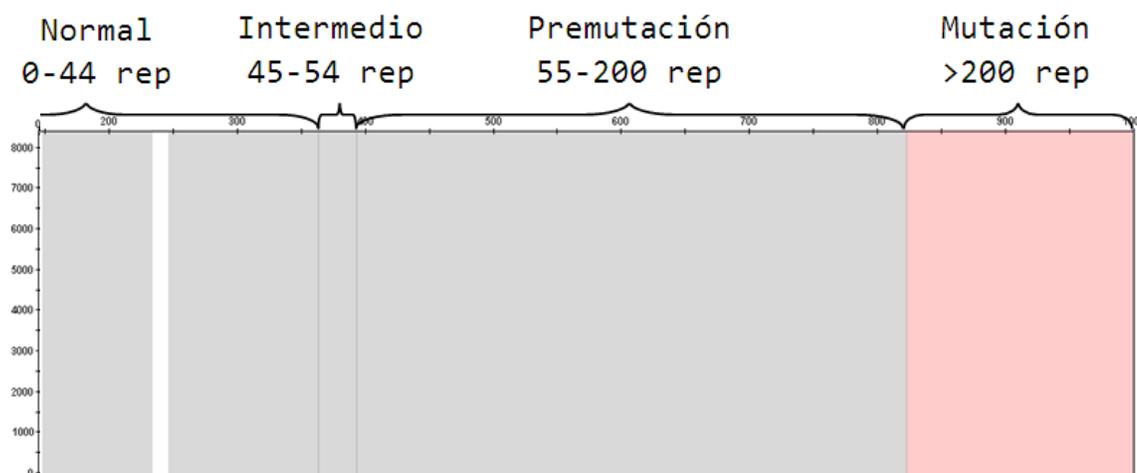


Figura 17. Asignación de valores y zonas para los electroferogramas.

Los propios electroferogramas fueron exportados a un Macro análisis en Excel®, proporcionado por Asuragen®, el cual determinó el número de repetidos CGG en *FMR1* presentes en cada muestra.

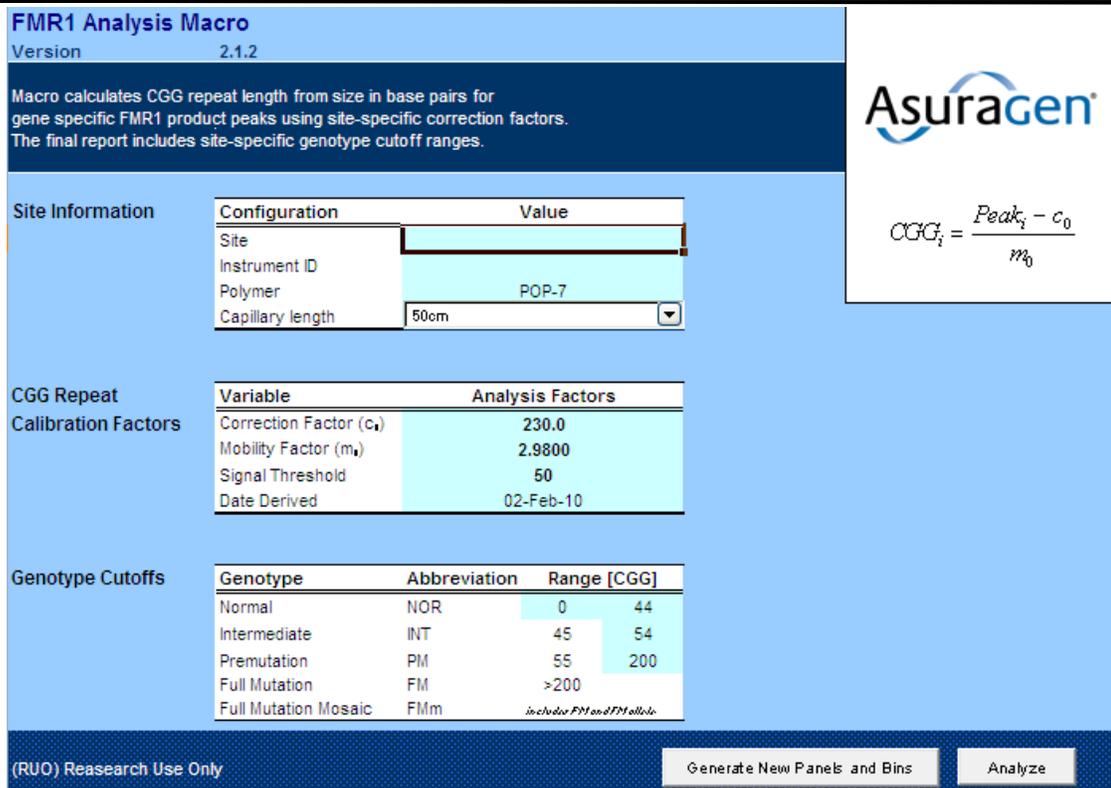


Figura 18. Obtención de numero de repetidos a través del Macro de Excel,

7.4. Determinación del Porcentaje de metilación de FMR1 por mPCR.

Se analizó el estado de metilación de aquellas muestras que obtuvieron un resultado positivo para alelos en GZ o PM de *FMR1*, el cual fue mediante el kit comercial AmpliDeX mPCR *FMR1*, las reacciones se realizaron con base en los protocolos del fabricante.

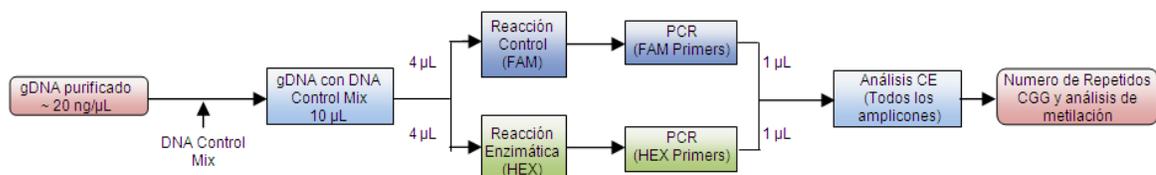


Figura 19. Diagrama general para la mPCR. Modificado de Chen, et al, (2010) [82].

Como se indica en la figura previa, se necesitan dos tratamientos simultáneos para cada muestra, para ello se requiere preparar un control de DNA (DNA Control Mix) al cual se le añadió las siguientes cantidades por muestra:

Tabla 4. Volúmenes específicos para el DNA Control Mix

DNA Control Mix	Vol / Rxn (µL)
DNAg	8.0
DNA Control Mix	2.0
Volumen Total (µL)	10.00

Después de preparar el DNA Control Mix, se prosigue a preparar el buffer de Digestión Enzimática Master Mix, este mismo se preparó con los siguientes volúmenes:

Tabla 5. Volúmenes específicos para el Control FAM y Digestión HEX

Componente	Control (FAM)	Digestión (HEX)
Buffer de Digestión	3.7	3.7
Control Enzimático (FAM)	0.3	-----
Digestión Enzimática (HEX)	-----	0.3
Volumen Total (µL)	4.0	4.0

Cada buffer preparado es colocado a cada DNA Control Mix por separado, es decir, 4.0µL de Control (FAM) al tubo que ya contiene DNA Control Mix de alguna muestra y 4.0µL de Digestión (HEX) al tubo que ya contiene DNA Control Mix de la misma muestra, la digestión enzimática se llevó a cabo en un termociclador marca MultiGene™ OptimaxThermalCycle (LabNet®-USA) con las siguientes condiciones:

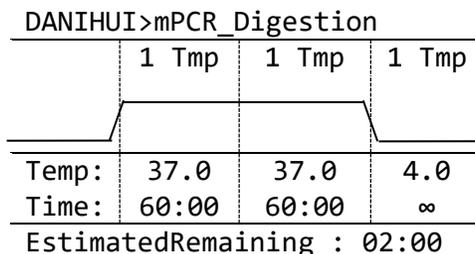


Figura 20. Ciclos para la digestión enzimática en mPCR.

Finalizando la digestión enzimática se debe llevar a cabo la reacción de mPCR, la cual se realizó añadiendo las siguientes cantidades por muestra:

Tabla 6. Volúmenes específicos para la mPCR

mPCR Master Mix	FAM-PCR Master Mix	HEX-PCR Master Mix
mPCRGC-Rich AMP Buffer	20	20
GC-Rich Polymerase Mix	0.1	0.1
mPCR FAM-Primers	1.9	-----
mPCR HEX-Primers	-----	1.9
Volumen Total (µL)	22	22

Después de añadir dichos contenidos a cada muestra recién salida de la digestión por separado, se prosigue con la reacción de PCR, la cual se llevo a cabo en un termociclador marca MultiGene™ OptimaxThermalCycle (LabNet®-USA) con las siguientes condiciones:

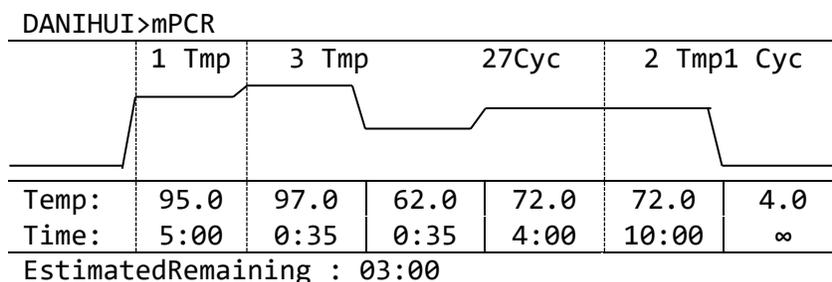


Figura 21. Ciclos para mPCR.

Transcurridas las 3:00 horas de la reacción de PCR se comienza la EC, añadiendo a cada muestra el siguiente Master Mix:

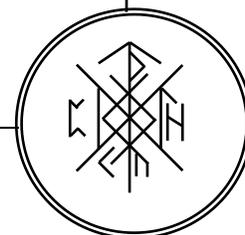
Tabla 7. Volúmenes específicos para la EC

Electroforesis Master Mix	Vol / Rxn (µL)
Hi-Di Formamide	11.0
ROX Ladder	2.0
Producto de FAM-PCR	1.0
Producto de HEX-PCR	1.0
Volumen Total (µL)	15.00

Se prosiguió a montar una placa de 96 pozos para secuenciación, un pozo por cada muestra, solo en este paso es donde las reacciones separadas se juntan para la EC, se centrifugo y desnaturalizo a 95°C por 2 minutos y se llevó al secuenciador AppliedBiosystems 3130 Genetic Analyzer (capilar de 36 cm). Los electroferogramas generados fueron interpretados con ayuda del programa GeneMapper® Version 4.0 (previamente ajustado para un tamaño de alelo Normal, GZ, PM y FM) Figura 17, dando dos señales, una azul para FAM y una verde para HEX.

Los propios electroferogramas fueron exportados a un Macro análisis en Excel®, proporcionado por Asuragen®, el cual determinó el porcentaje de metilación en *FMR1* presentes en cada muestra.

8. RECOPILOCIÓN DE RESULTADOS



RECOPIACIÓN DE RESULTADOS

De un total de 110 muestras, todas se cuantificaron, se obtuvo pureza y se llevó a verificar la integridad de las muestras.

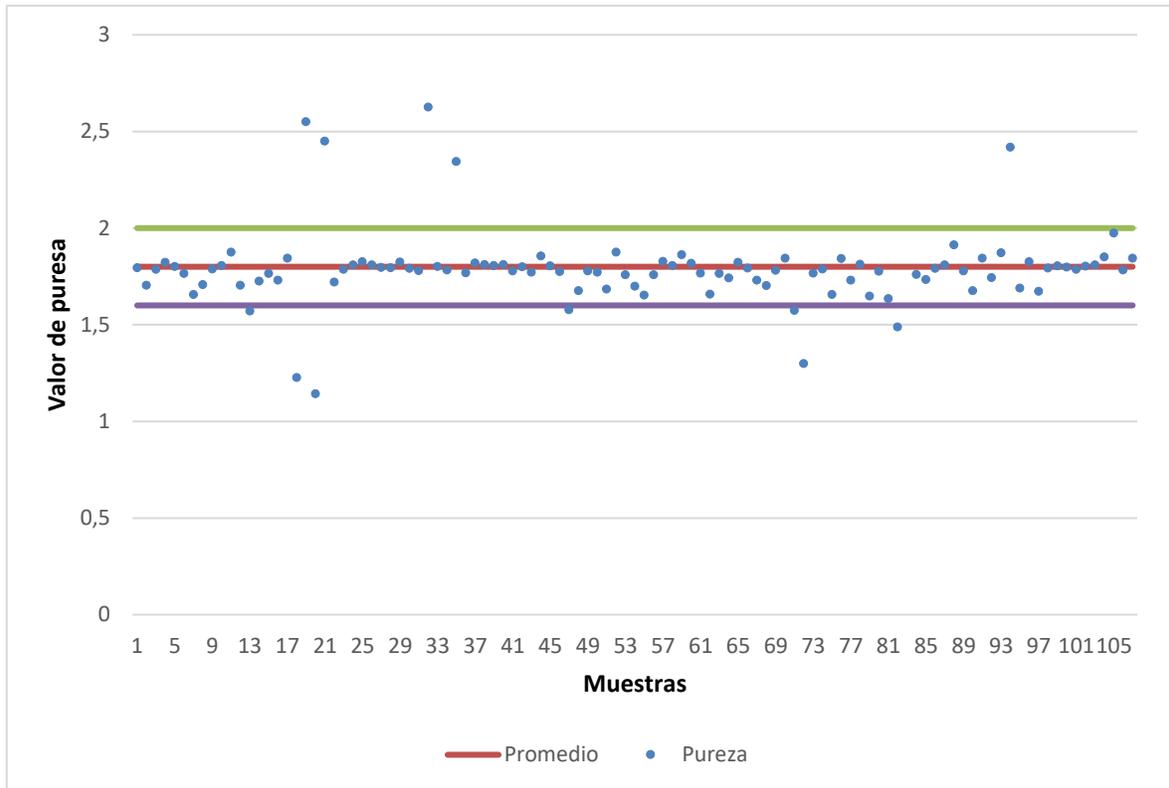


Figura 22. Pureza de cada muestra, con base en la relación 260/280.

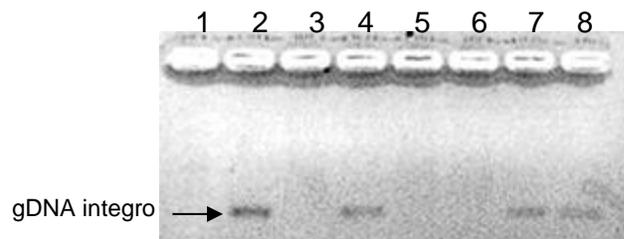


Figura 23. Integridad de gDNA por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 2, 4, 7 y 8 muestran una óptima integridad, mientras que los carriles 1, 3, 5 y 6 revelan la degradación del DNA.

RECOPIACIÓN DE RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 119 electroferogramas, 110 de los cuales fueron para detectar el número de repetidos CGG en *FMR1* con el uso el Kit comercial AmplideX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®), de los 110 electroferogramas, únicamente fueron 9 muestras positivas para alelos en GZ o en PM de *FMR1*, a estos últimos 9 se determinó el porcentaje de metilación del mismo gen mediante el kit comercial AmplideX® mPCR *FMR1* (Asuragen®). Los resultados se pueden resumir en la siguiente tabla:

Tabla 8. Hallazgos moleculares en *FMR1* del número repetidos CGG en el total de las muestras.

Estados	Muestras
Normal	101
Intermedio	3
Premutación (PM)	6
Total de Muestras	110

8.1 Numero de Repetidos CGG en *FMR1*

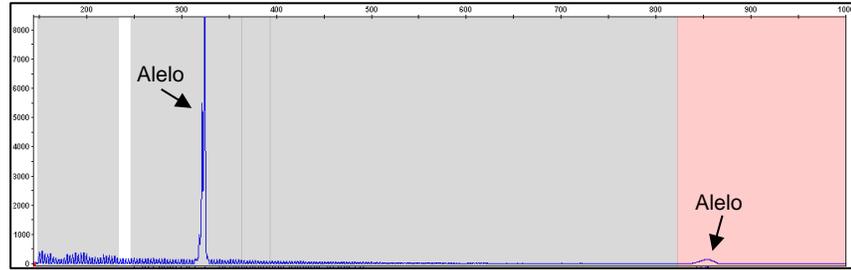
A continuación se muestran algunos electroferogramas generados, incluyendo las diversas variantes que se lograron encontrar, las cuales pueden presentar alelos Normales, GZ, PM y FM, así como sí son individuos de sexo masculino o femenino, en este último se puede apreciar si son homocigotos o heterocigotos.

Tabla 9. Hallazgos moleculares de *FMR1*, vista en alelos presentes.

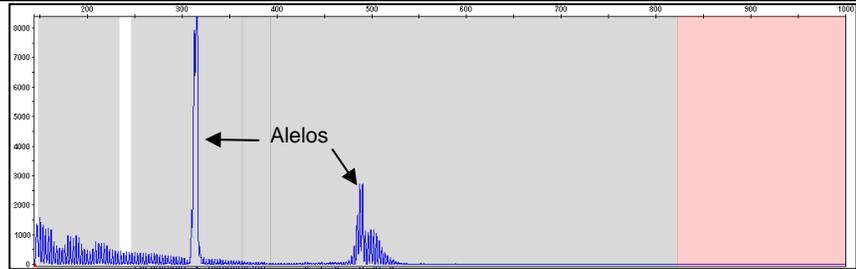
Descripción	Electroferograma
<p>Muestra V140 perteneciente a un individuo de sexo masculino que presenta un estado de FM.</p>	

RECOPIACIÓN DE RESULTADOS

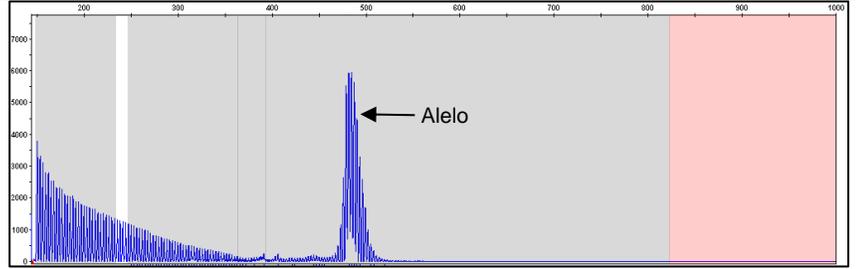
Muestra V141
pertenece a un individuo de sexo femenino heterocigoto que presenta un alelo Normal y otro alelo en estado de FM.



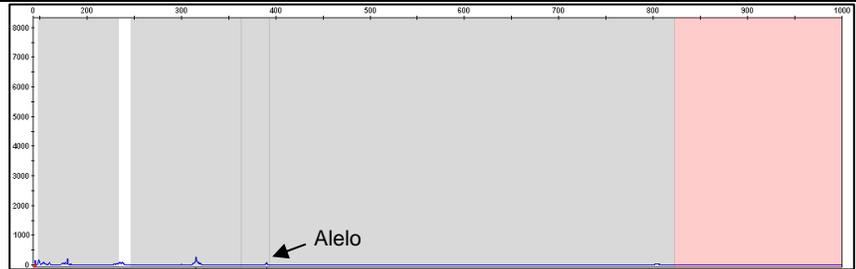
Muestra V142
pertenece a un individuo de sexo femenino heterocigoto que presenta un alelo Normal y otro alelo en estado de PM.



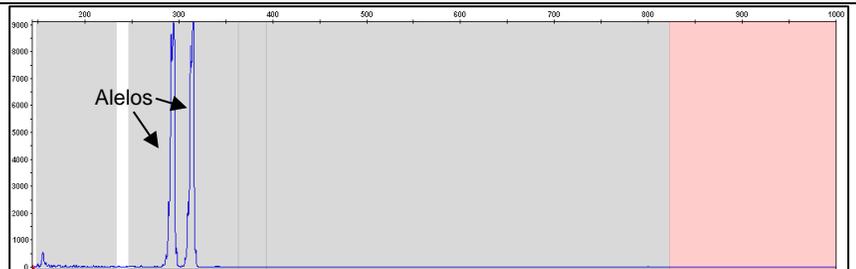
Muestra SCA 1468
pertenece a un individuo de sexo masculino que presenta un alelo en estado de PM.



Muestra SCA 107
pertenece a un individuo de sexo masculino que presenta un alelo en estado de GZ.



Muestra SCA 1160
pertenece a un individuo de sexo femenino heterocigoto que presenta ambos alelos en estado de Normal.



RECOPIACIÓN DE RESULTADOS

<p>Muestra SCA 1377 pertenece a un individuo de sexo femenino homocigoto que presenta ambos alelos en estado de Normal.</p>	
<p>Muestra SCA 1179 pertenece a un individuo de sexo masculino que presenta un alelo en estado Normal.</p>	

8.2 Determinación del Porcentaje de Metilación de FMR1 por mPCR.

A continuación se muestran los electroferogramas generados por algunas muestras que fueron positivas para alelos GZ, en PM y FM. Los resultados se pueden resumir en la siguiente tabla:

Tabla 10. Hallazgos moleculares para el porcentaje de metilación en *FMR1*

Estados	Muestras
Intermedio	3
Premutación (PM)	6
Total de Muestras	9

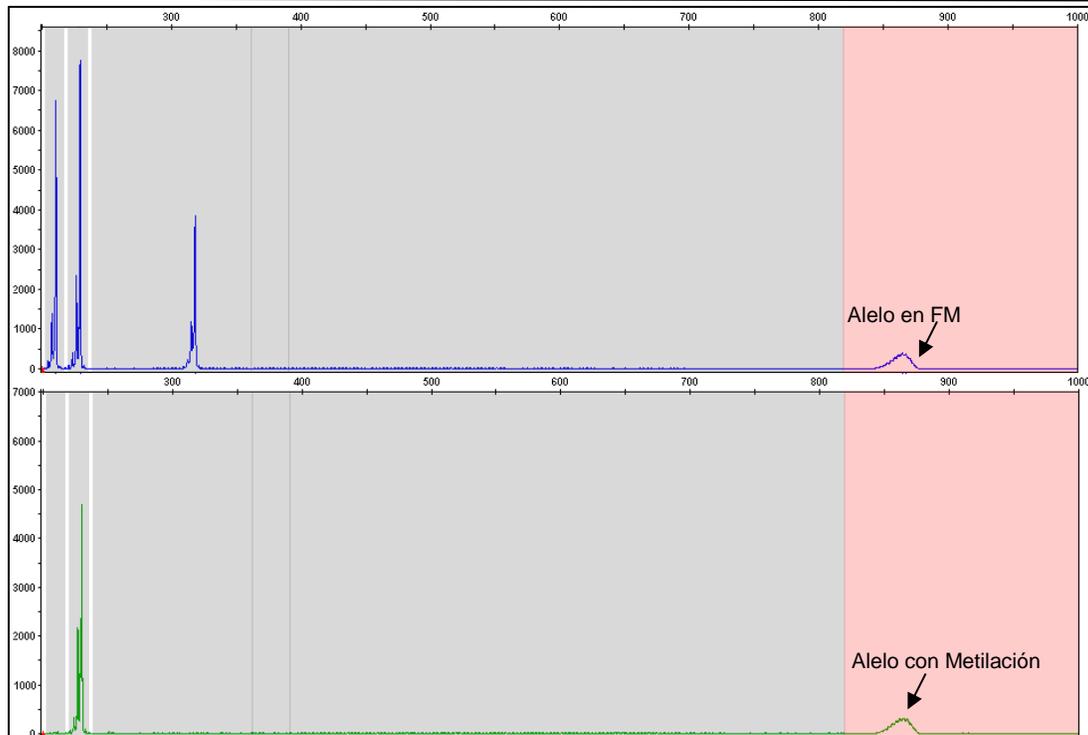


Figura 24. Electroferogramas generados en mPCR por la muestra *V140* perteneciente a un individuo de sexo masculino que presenta un estado de FM.

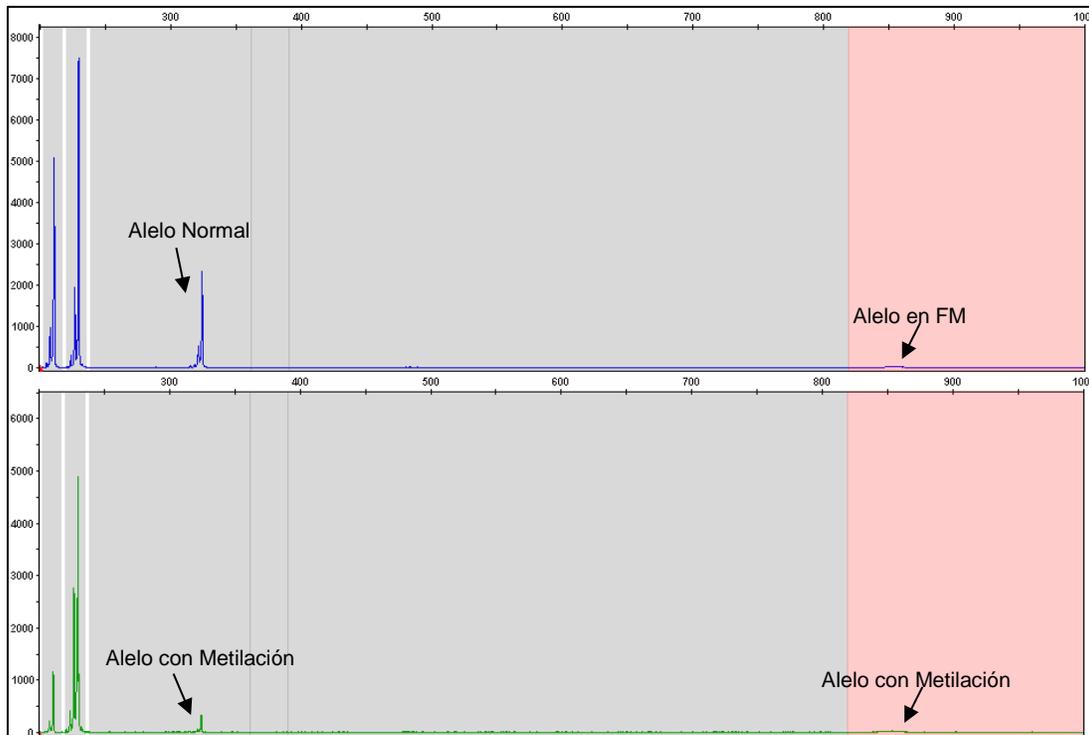


Figura 25. Electroferogramas generados en mPCR por la muestra *V141* perteneciente a un individuo de sexo femenino.

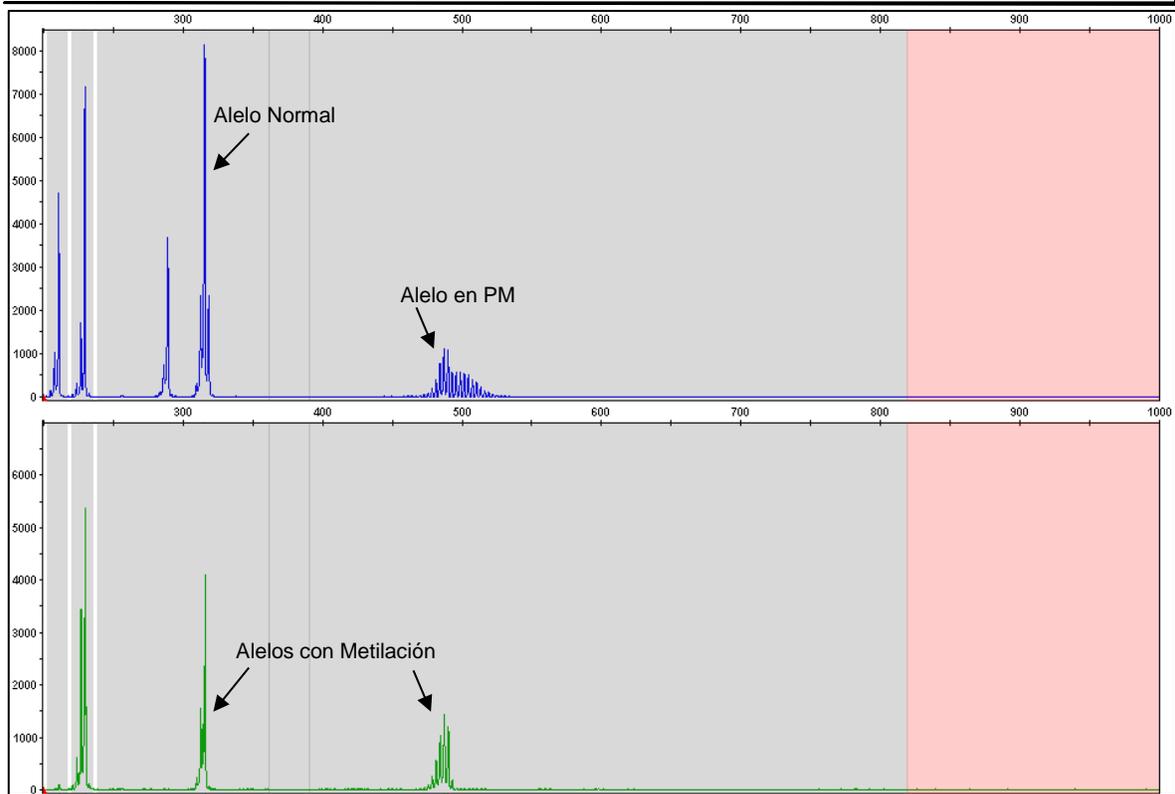
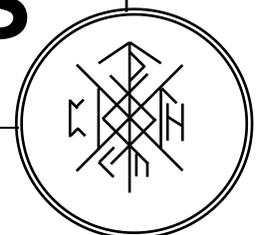


Figura 26. Electroferogramas generados en mPCR por la muestra *V142* perteneciente a un individuo de sexo femenino heterocigoto que presenta un alelo Normal y otro alelo en estado de PM.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS



9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dentro de las causas genéticas de esta patología, el gen *FMR1*, responsable de SXF, ha sido uno de los genes más importantes asociados a FXTAS. El SXF está causado principalmente por la expansión del trinucleótido CGG en la región 5'UTR de *FMR1*. Sin embargo, El Temblor/Ataxia Ligado al Cromosoma X (FXTAS) no se asocia a los alelos en FM (> 200 repeticiones CGG) causantes del SXF, sino a los alelos PM (56-200 CGGs) y GZ (44-55 CGGs) del gen.

La longitud de la repetición CGG de *FMR1* es un importante indicativo de la probabilidad de expandirse que muestra un alelo. Desde el descubrimiento de *FMR1* en 1991 ha quedado claro que el riesgo de expansión de un alelo aumenta según aumenta el número de repeticiones CGG. Por ejemplo, si una mujer es portadora de un alelo con aproximadamente 100 repeticiones CGG, habrá una posibilidad cercana al 100 % de que el alelo se expanda y su(s) hijo(s) tenga(n) una mutación completa [46].

De acuerdo con lo señalado, en este trabajo se ha incluido un grupo de pacientes con movimientos anormales de etiología desconocida, reclutados a través del departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNN), en las que se ha determinado las repeticiones CGG y el porcentaje de metilación de *FMR1*. Dados los resultados obtenidos se analizarán los siguientes aspectos:

- Edad de Inicio.
- Determinación de Repetidos CGG.
- Frecuencias Alélicas.
- Frecuencias Genotípicas.
- Interrupciones AGG.
- Porcentaje de Metilación en *FMR1*.
- Análisis de caso de una Familia.

9.1 EDAD DE INICIO

Previamente se sabía que la afluencia de FXTAS es mayor en hombres que poseen una PM comparado con las mujeres, también se sabe que la edad de inicio de esta patología es alrededor de la quinta década de vida, sin embargo se pudo apreciar por parte de los datos de clínica que está ligeramente por debajo de esta (8.38%).

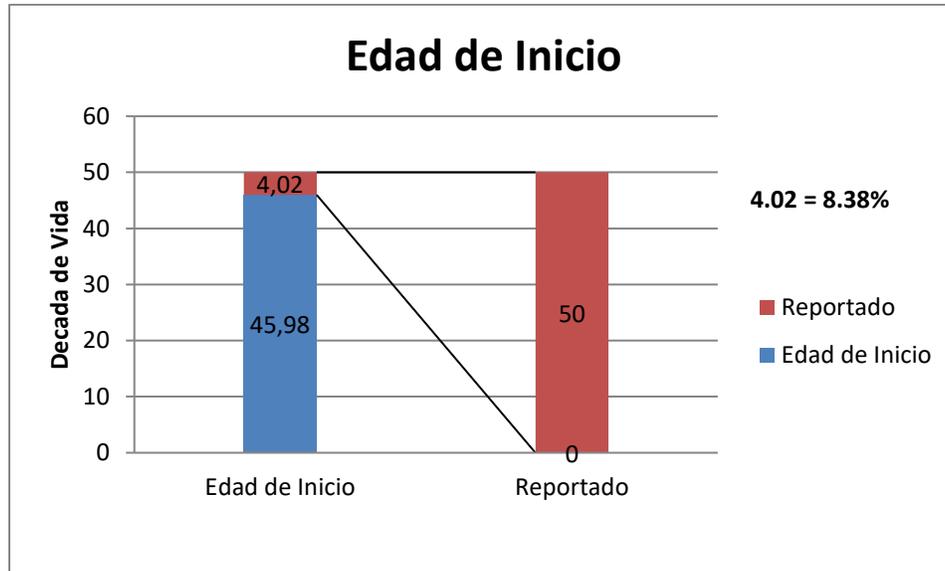


Figura 27. Edad de inicio de los pacientes contra la edad de inicio reportada de FXTAS.

Con el uso de la EC, se pudo realizar un escaneo génico (GS), el cual nos permitió conocer el número de repetidos CGG. La aplicación del GS no solo ayudo a designar en qué estado se encontraban las muestras (Normales, GZ, PM o FM) sino que también detectar aquellas muestras con alelos en GZ, PM o FM para someterlas a la detección del porcentaje de metilación, así como, por parte de la clínica, proveer un diagnóstico certero ante el temblor/ataxia que presentan los pacientes.

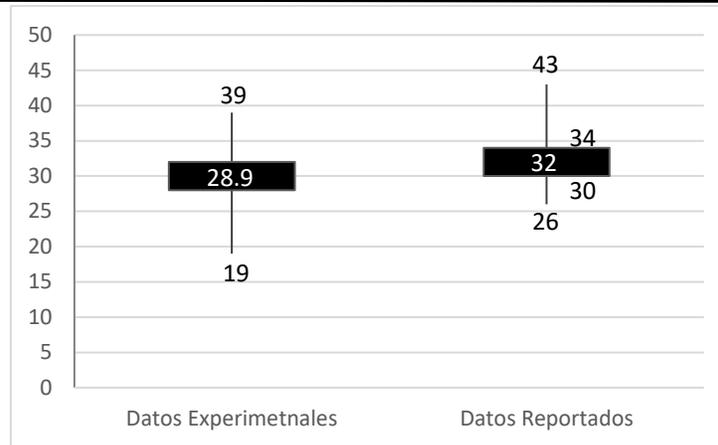


Figura 28. Edad de inicio de los pacientes contra la edad de inicio reportada de FXTAS.

Esto nos indica que el población de estudio se encontró alrededor de 3 repeticiones CGG menos, lo que equivale porcentualmente a un 9.68% menos que el previamente reportado de 32 repetidos CGG.

9.2 ANÁLISIS DE LA DETERMINACIÓN DE REPETIDOS CGG

La repetición CGG pertenece a una clase de secuencias repetitivas conocidas como microsatélites. Las mutaciones en microsatélite tienen una naturaleza dinámica donde la expansión depende de la longitud de las repeticiones y de su estructura interna. Por tanto, además de la longitud de la repetición, la longitud de repeticiones CGG puras sin interrupciones parece estar correlacionado con el riesgo de expansión.

El análisis de la repetición CGG se realizó para conocer su influencia en la etiología de la FXTAS y para profundizar en las causas de su inestabilidad.

Fueron analizados un total de 110 muestras (57 individuos masculinos, 53 individuos femeninos), considerando este número de muestras como una única población por lo que se han analizado 163 cromosomas X entre los que se han encontrado 26 alelos de diferente longitud con un rango de repeticiones de 19 a 124 CGGs, para confirmar o excluir, por parte de la clínica, la patología FXTAS como la causa de los movimientos anormales y/o problemas en el neurodesarrollo.

Para determinar el número de repeticiones CGG de *FMR1* se utilizó el Kit comercial AmplideX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®), el cual es una técnica que se basa en una PCR-gen específica y en una TP-PCR, seguida de una electroforesis capilar. Esta técnica tiene dos ventajas principales: amplifica la longitud completa acorde al número de repetidos, y además identifica las interrupciones AGG, como una señal específica previa a la detección del alelo. Que en comparación a lo que reporta Chen, et al, (2010) [82], todas las muestras se amplifican y detectan con éxito en la primera prueba con la TP-PCR el cual genera una tasa de aprobación del 100%, que comparado con la técnica estándar de oro para *FRM1* la cual es por Southern Blot, genera una exactitud del 98.6%. Lo mencionado previamente refleja la sensibilidad presente de los reactivos de la TP-PCR para los alelos que presentan tanto baja abundancia como impureza de las muestras, así como una inversión menor de tiempo y de recursos económicos, que en comparación con la técnica de Southern Blot produce un gasto de Anticuerpos radiactivos, exponiendo al desarrollador de la técnica y una mayor inversión de tiempo [82].

9.3 DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de la distribución de las frecuencias alélicas se ha llevado a cabo en:

- Las muestras totales con el conjunto total de alelos.
- Los alelos agrupados en función de su longitud:
 - Alelo normal: 19-43 repeticiones CGG
 - Alelo GZ: 44-55 repeticiones CGG
 - Alelo PM: 56-199 repeticiones CGG

9.3.1 Totalidad de las muestras y conjunto de alelos.

En la totalidad de las muestras el análisis de las frecuencias alélicas se ha llevado a cabo en 163 cromosomas X, correspondientes a un total de 110 muestras (57 individuos masculinos, 53 individuos femeninos). La distribución de los alelos y

de las frecuencias alélicas absolutas y relativas de la repetición trinucleotídica CGG se encuentra representada en la Tabla 11. Entre los 163 cromosomas X analizados se han encontrado 26 alelos de diferente longitud, que oscilan entre 19 y 124 repeticiones CGG.

Tabla 11. Frecuencias alélicas de la repetición CGG

No. de Repeticiones CGG	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa	No. de Repeticiones CGG	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
19	2	0,01227	36	1	0,00613
20	4	0,02454	38	1	0,00613
21	1	0,00613	39	1	0,00613
22	5	0,03067	42	1	0,00613
23	2	0,01227	44	1	0,00613
25	1	0,00613	48	1	0,00613
27	1	0,00613	52	1	0,00613
28	11	0,06748	56	2	0,01227
29	59	0,36196	84	1	0,00613
30	52	0,31902	87	1	0,00613
31	4	0,02454	92	1	0,00613
32	6	0,03681	93	1	0,00613
33	1	0,00613	124	1	0,00613
Total	Frecuencia Absoluta	163	Frecuencia Absoluta	1.0000	

Los alelos más frecuentes son los que tienen 28, 29 y 30 repeticiones CGG. Estos 3 alelos engloban casi el 75% de los individuos analizados. El alelo de 29 repeticiones es el más frecuente (59 alelos) y engloba aproximadamente el 36.2% de los alelos. El alelo de 30 CGGs es el segundo en frecuencia (52 alelos) y señala aproximadamente el 31.9 % de los alelos. El alelo de 28 CGGs (11 alelos) tiene una frecuencia de 6.7%. La figura 28 muestra los diferentes alelos y su frecuencia porcentual.

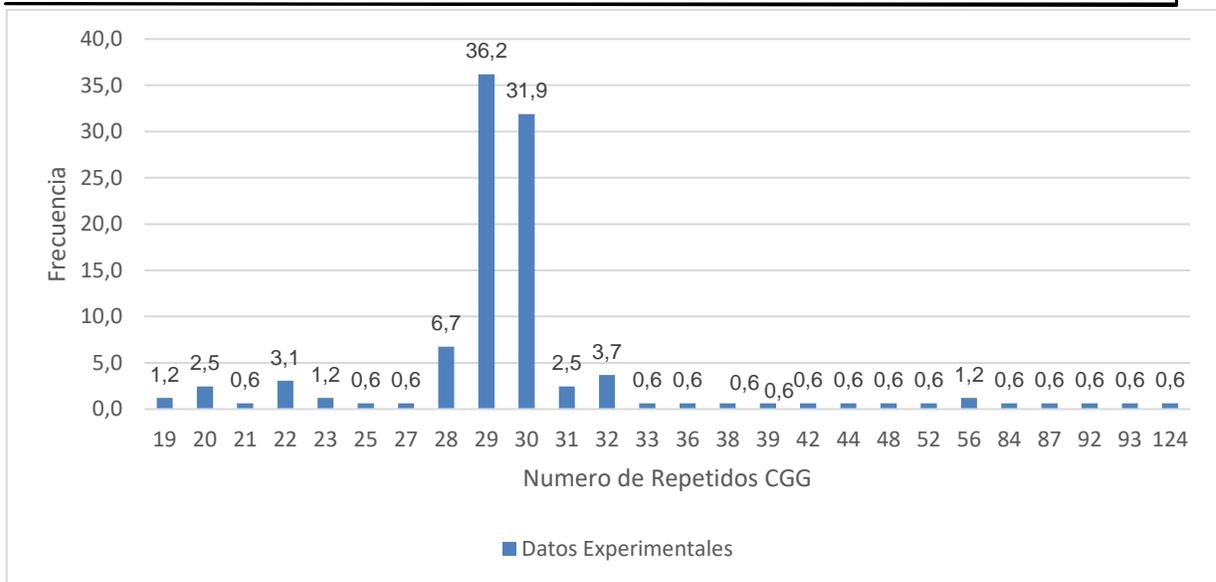


Figura 29. Frecuencias alélicas de la repetición CGG porcentual.

La figura 29 muestra la distribución de las frecuencias de los tres tipos de alelos en función del número de repeticiones CGG (Normal, GZ y PM) encontradas.

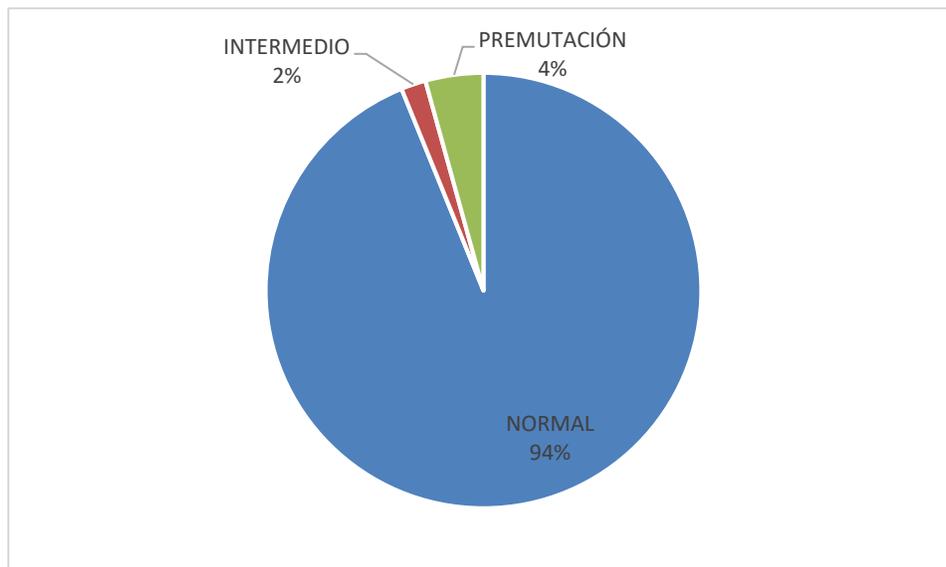


Figura 30. Distribución de las frecuencias de las tres clases alélicas.

La figura anterior, que es el que agrupa las muestras en función de la longitud de los alelos la cual muestra que, los alelos normales representan el 93.84 %, que en contraste con el 1.84 % que presenta un número de repeticiones pertenecientes a un estado GZ (44-55 CGG). Por parte de los alelos que presentan un estado de PM, se han detectado seis alelos (4.29%), con 56, 84, 87, 92, 93 y 124 repeticiones

CGG, siendo las diferencias con el grupo de pacientes estadísticamente significativas ($t=2.90$, $p<0.01$).

9.3.2 Alelos en función de su longitud

Los resultados obtenidos se han dividido en tres subgrupos, Normales, GZ y PM, para realizar un análisis más detallado y conocer la prevalencia del estado de *FMR1*.

Los datos de las frecuencias alélicas de alelos normales, GZ y PM se encuentran resumidos en la Tabla 11.

Tabla 12. Prevalencia de alelos normales, GZ y PM de *FMR1*

	Estado	N (%)
Alelos 19-43	Normal	17 (93.87 %)
Alelos 44-55	GZ	3 (1.84 %)
Alelos 55-199	PM	3 (4.29 %)
Total		100

Al analizar los tres subgrupos por separado, se observa que:

9.3.2.1 Normales

En este grupo que corresponde un 93.87% de la totalidad de las muestras, si se considera como un 100% entonces se puede generar la siguiente figura.

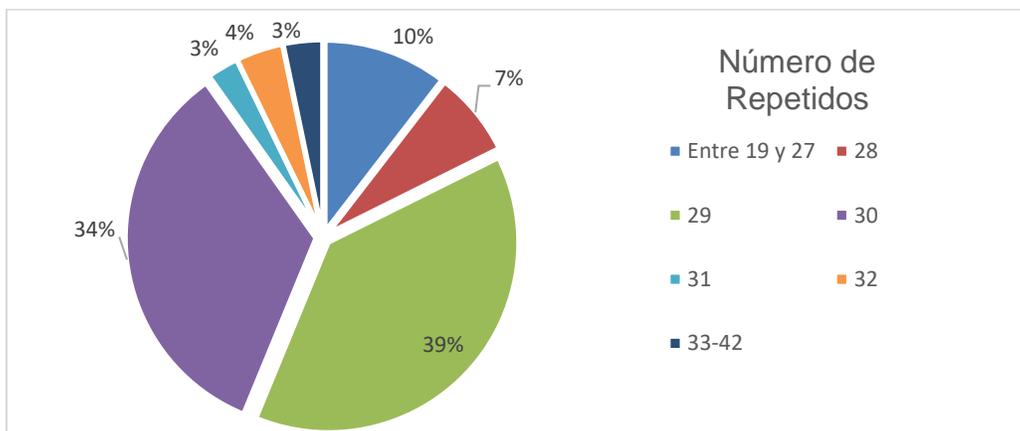


Figura 31. Distribución de las frecuencias alélicas normales.

Donde se puede apreciar que el alelo con mayor frecuencia es el de 29 repeticiones CGG, el cual corresponde a un 38.56%, seguido de los alelos de 30 y 28 repeticiones, estos últimos dos poseen un 33.98 % y 7.18 % respectivamente.

9.3.2.2 Zona Gris o Intermedios

Este grupo que corresponde a un 1.84 % de la totalidad de las muestras, si se considera como un 100% entonces se puede generar la siguiente figura.

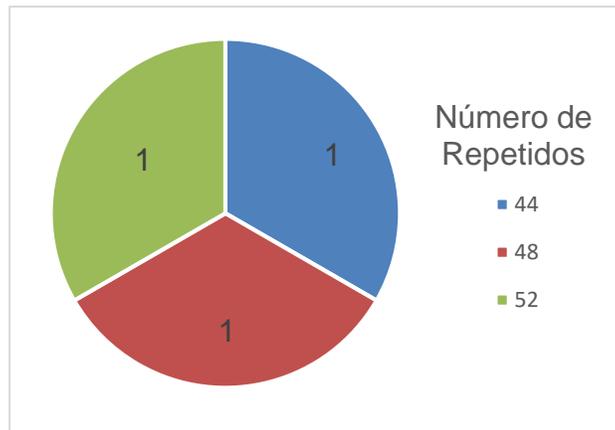


Figura 32. Distribución de las frecuencias alélicas GZ.

La figura previa no ofrece mucha información, debido a que solo se encontró 1 muestra obtenida dentro de este rango, que por ende le corresponde un 33.33 % de frecuencia.

9.3.2.3 Premutación

Este grupo que corresponde a un 4.29% de la totalidad de las muestras, si se considera como un 100% entonces se puede generar la siguiente figura.

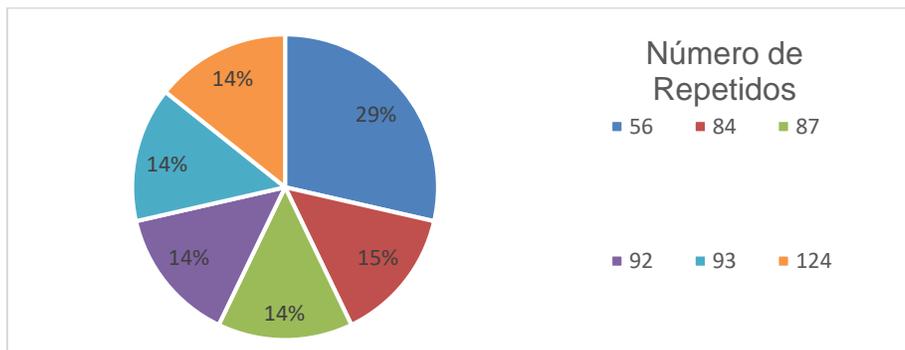


Figura 33. Distribución de las frecuencias alélicas PM.

Donde se puede apreciar que el alelo con mayor frecuencia es el de 56 repeticiones CGG, el cual corresponde a un 28.57%, seguido de los alelos de 56, 84, 87, 92, 93 y 124 repeticiones, estos últimos resultaron tener el mismo valor porcentual de 14.28 % debido a que únicamente fue hallado un único alelo con estas dimensiones.

9.4 DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

El análisis de la distribución de las frecuencias genotípicas se ha llevado a cabo en la totalidad de las muestras, agrupadas dependiendo del sexo, la distribución de frecuencias genotípicas observadas para el *locus* CGG se encuentra representada en la Tabla 13.

El número de genotipos detectados posibles, fueron 17 para los varones y 22 para las mujeres, que sumado da un total 39 genotipos identificados. Por parte de las muestras pertenecientes al sexo masculino, se han detectado que los genotipos más frecuentes son el 30, 29 y 28 con 22, 10 y 9 individuos respectivamente. Que en contraste con las muestras pertenecientes al sexo femenino, se observó mayor frecuencia en los genotipos 29-29, 29-30 y 30-30 con 14, 10, 7 individuos respectivamente. Siendo notorio que los genotipos principales oscilan entre 28 y 30.

Tabla 13. Distribución de frecuencias genotípicas de la repetición CGG

Masculinos			Femeninos		
Genotipo	N	Frecuencia	Genotipo	N	Frecuencia
19	1	0,0175	19-29	1	0,0189
20	2	0,0351	20-29	1	0,0189
22	2	0,0351	20-30	1	0,0189
27	1	0,0175	21-30	1	0,0189
28	9	0,1579	22-22	1	0,0189
29	10	0,1754	22-23	1	0,0189
30	22	0,3860	23-30	1	0,0189
31	1	0,0175	25-30	1	0,0189
32	1	0,0175	28-28	1	0,0189
36	1	0,0175	28-29	1	0,0189
38	1	0,0175	29-29	14	0,2642
48	1	0,0175	29-30	10	0,1887
52	1	0,0175	29-31	1	0,0189
56	1	0,0175	29-32	3	0,0566
84	1	0,0175	29-33	1	0,0189
92	1	0,0175	29-44	1	0,0189
124	1	0,0175	30-30	7	0,1321
Total	57	1	30-32	2	0,0377
			31-31	1	0,0189
			29-87	1	0,0189
			39-93	1	0,0189
			42-56	1	0,0189
			Total	53	1

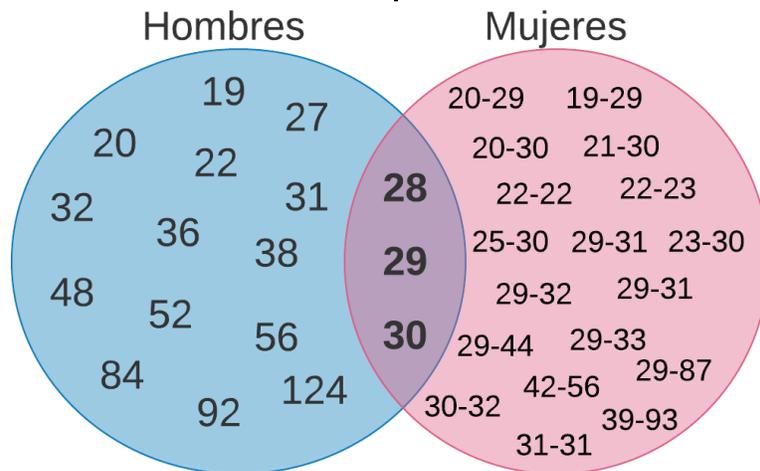


Figura 34. Diagrama de Venn donde la intersección corresponde a los genotipos principales.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al contrario de lo que ocurría en la distribución de frecuencias alélicas, no existe un genotipo claramente destacado, sino que los valores se encuentran homogéneamente distribuidos entre los genotipos formados por los alelos principales. De este modo, para las mujeres, el más frecuente es el 29-29, compuesto por dos alelos de 29 repeticiones CGG (26.42 %), seguido de los genotipos 29-30 y 30-30 que corresponden al 18.87 % y 13.21 % respectivamente. Por parte de las muestras pertenecientes al sexo masculino, el más frecuente fue el 30, compuesto por 30 repeticiones CGG (38.6 %), seguido de los genotipos 29 y 28 que corresponden al 17.54 % y 15.79 % respectivamente.

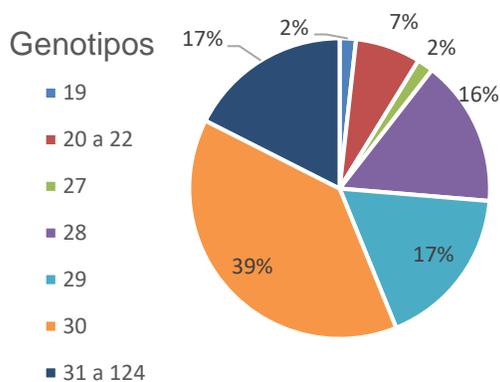


Figura 35. Genotipos masculinos expresando en porcentaje.

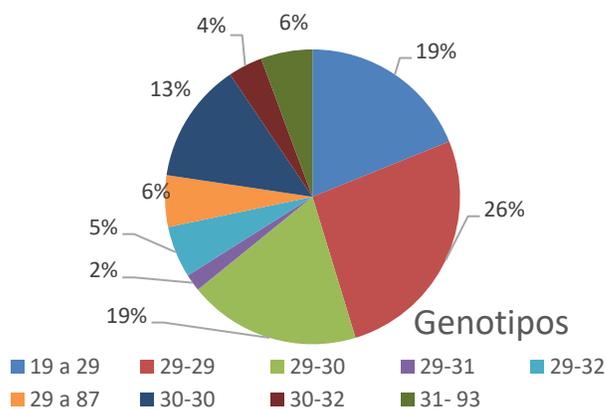


Figura 36. Genotipos femeninos expresando en porcentaje.

El análisis para el equilibrio de Hardy-Weinberg mostro un resultado no significativo, es decir, que no existiendo diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas por parte de ambos sexos, siendo en hombres $p=0.89$, $q=0.11$ y por parte de las mujeres $p=0.7$, $q=0.3$, por lo que se puede asumir que el *locus* CGG se encuentra en equilibrio.

9.5 INTERRUPCIONES AGG

La principal ventaja de la TP-PCR es la capacidad de determinar el número exacto de repeticiones de CGG hasta 200. Además, este método permite estimar el número de interrupciones AGG.

Entre las 6 muestras con presencia confirmada del alelo de PM, el análisis mostró un alto variabilidad en el número de repeticiones CGG (rango: 56-124, mediana: 89). En este grupo, 5 muestras (83.3%) de los portadores no tienen secuencia AGG, y 1 (16.7%) tiene una interrupción AGG. En pacientes con la mutación completa, no hubo interrupción de AGG. Por el contrario, en presencia del alelo en rango normal, solamente se obtuvieron 2 muestras con 3 interrupciones AGG en *FMR1*, ya que como se mencionó previamente, las presencia de estas interrupciones brindan estabilidad al gen y disminuyen el riesgo de pasar a un estado GZ, PM o FM.

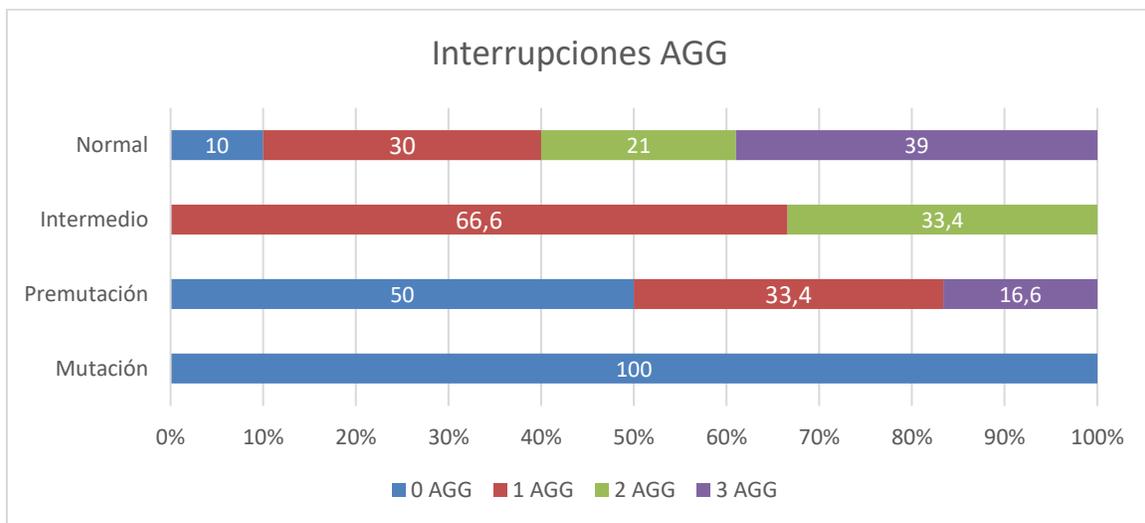


Figura 37. Porcentaje de interrupciones AGG presentes en todas las muestras.

Estos datos son consistentes con la literatura y demuestran que las interrupciones AGG ocurren menos frecuentemente en alelos expandidos de *FMR1* [43]. El conocimiento del número de repetidos CGG, así como de la presencia y el número de interrupciones de AGG en portadores es muy útil en el asesoramiento genético en familias con FXTAS.

Sin embargo, el Kit comercial AmpliDeX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®), tiene algunas limitaciones, por ejemplo, no permite la evaluación del estado de metilación de *FMR1*, por lo tanto, se requiere del uso de kits adicionales para definir el estado de metilación.

No obstante, la presente investigación conto con los recursos para poder realizar el estado de metilación de *FMR1* con el uso del kit comercial AmpliDeX® mPCR *FMR1* (Asuragen®).

9.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN DEL GEN *FMR1*

Para la determinación del porcentaje de metilación de *FMR1* por mPCR se analizaron las mismas 11 muestras previamente mencionadas (Tabla 9), donde se obtuvieron los siguientes resultados.

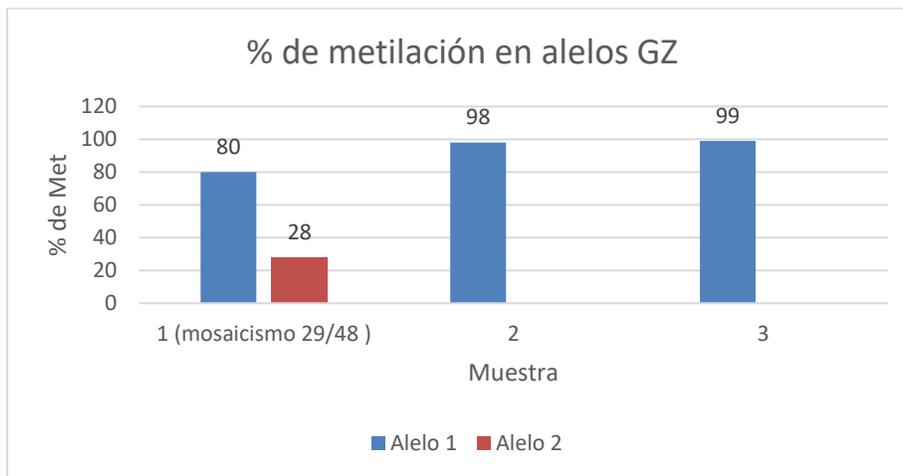


Figura 38. Porcentaje de metilación en alelos GZ.

Para aquellas muestras que se encontraron con alelos GZ, se encontro que presentaban un elevado porcentaje de metilación, que si bien puede justificar algunos rasgos autistas o de deficit cognitivo pero no justifica los movimientos anormales pero existe la posibilidad de expandirse.

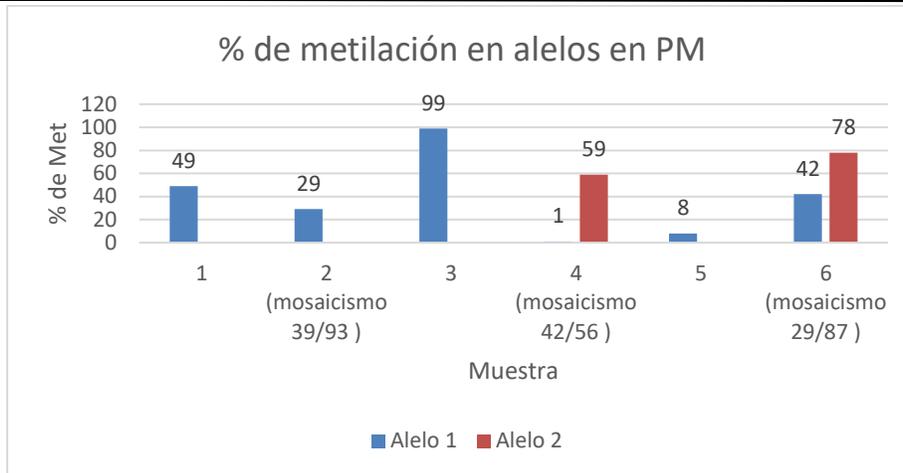


Figura 39. Porcentaje de metilación en alelos en PM.

En contraste con las muestras que se encontraron con alelos en PM, donde se pueden apreciar variables porcentajes de metilación, que por ende proporciona el cuadro de un FXTAS.

Tabla 14. Porcentaje de metilación en alelos contra el porcentaje no metilado

Muestra	% de Met Alelo 1	% de Met Alelo 2	% No Metilado	
1	49		51	
2 mosaicismos 39/93	29		71	
3	99		1	
4 mosaicismos 42/56	1	59	99	41
5	8		92	
6 mosaicismos 29/87	42	78	58	22

Dada la información proporcionada en la tabla anterior, se puede obtener la siguiente figura, la cual representa el intervalo del porcentaje de metilación así como de la media obtenida en esta población.

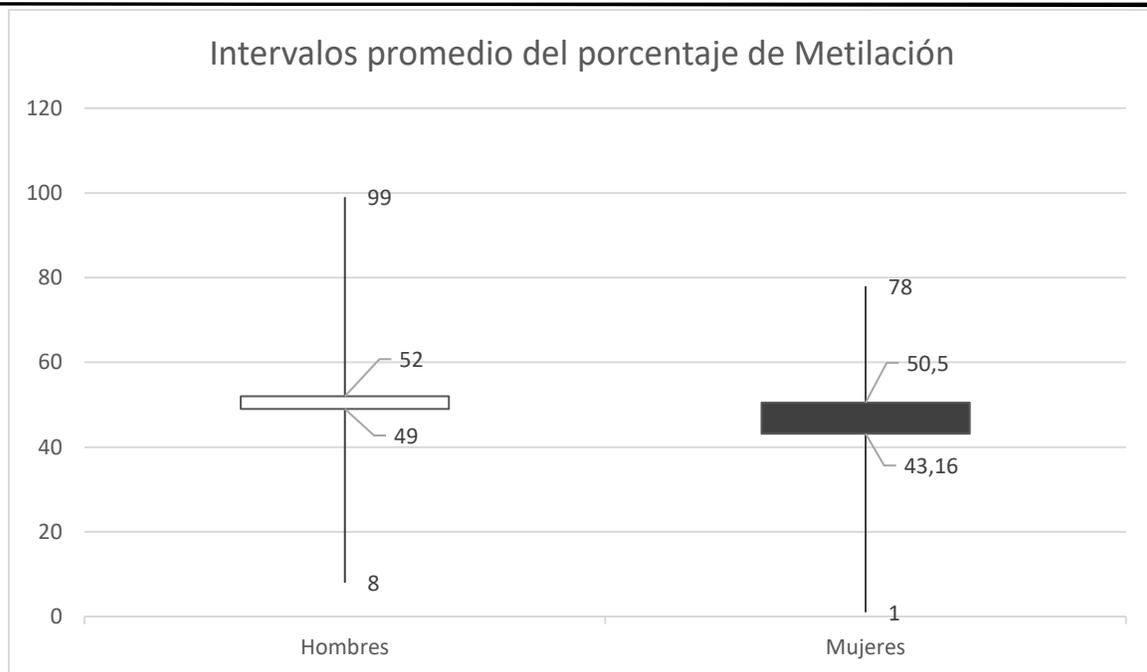


Figura 40. Intervalo promedio del porcentaje de metilación con base en el sexo.

La figura previa revela que, en el caso de los hombres, existe un intervalo entre el 8% y el 99% de metilación, el cual se puede reducir a una diferencia de 3% siendo la media de 52% de metilación que resulta contrastante con el caso de las mujeres y que de igual manera se presenta un gran intervalo, que va desde el 1% al 78% de metilación y que se reduce a una diferencia de 7.34% siendo la media de 50.5% de metilación. Ambos porcentajes obtenidos, es decir, 52% para los varones y 50.5% para las mujeres, resulta ser concordante con lo descrito en la literatura, ya que generalmente FXTAS tiene mayor incidencia en individuos del sexo masculino que del sexo femenino al igual que, en el caso de un FM, con un SXF.

El porcentaje de metilación en cada muestra promueve niveles elevados de mRNA y por ende que haya cierta deficiencia de FMRP, así como citotoxicidad sobre las neuronas que presenten vulnerabilidad a la muerte celular temprana. Si bien fuese el caso de poseer un 100% de metilación, pero el porcentaje complementario favorece que el fenotipo y la sintomatología de los pacientes se vea disminuida y no como un clasico FXTAS, dado el hallazgo de estos resultados, sí se puede justificar los rasgos autistas y de deficit cognitivo asi como la presencia de los movimientos anormales otorgado un diagnóstico certero a este grupo de

pacientes pero, como previamente se ha mencionado, el conocimiento del número de repetidos CGG, así como de la presencia y el número de interrupciones de AGG, aunado al conocimiento del porcentaje de metilación en este grupo hallado es muy útil en el asesoramiento genético en familias con FXTAS ya que los alelos en PM, por su parte, son muy inestables y pueden expandirse a mutación completa en una sola generación. La expansión de un alelo PM al estado de mutación completa ocurre casi exclusivamente cuando es transmitido de madre a hijo y no cuando se transmite de padre a hija.

9.7 CASO DE UNA FAMILIA 1.

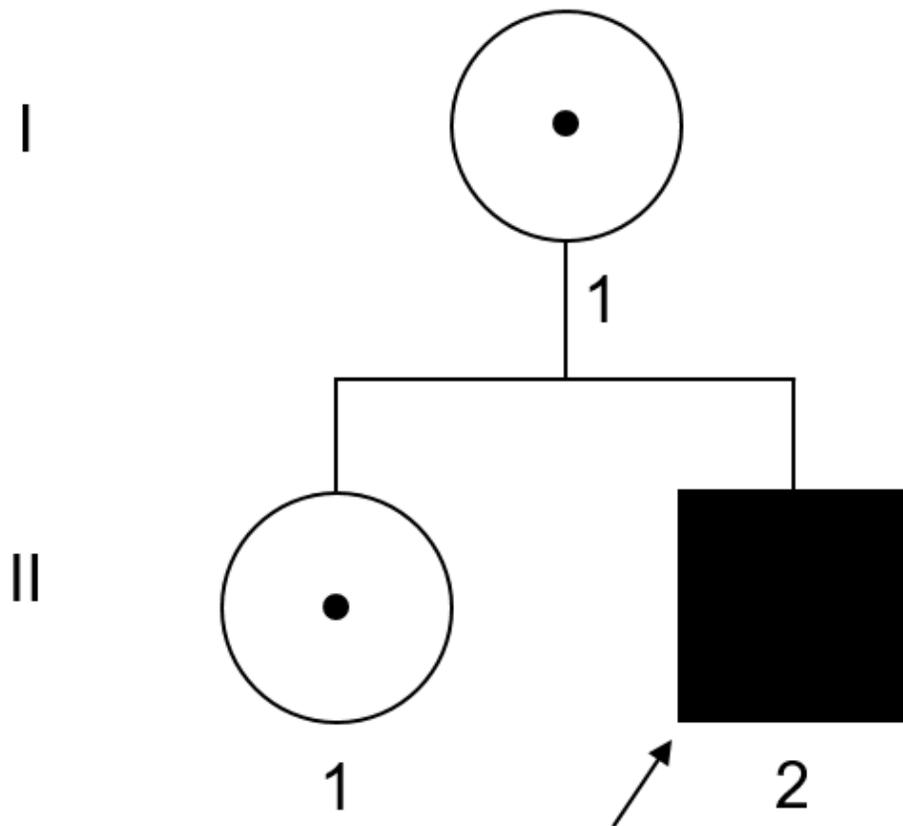


Figura 41. Árbol genealógico de la familia 1.

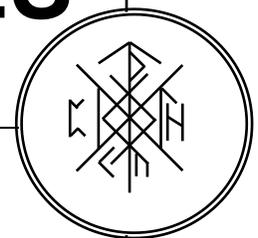
A continuación se muestran los electroferogramas de cada individuo.

INDIVIDUO	ELECTROFROGRAMA
<p>I, 1</p> <p>Figura 42. Electroferogramas generado por I.1, a. Alelos de 29-87 obtenidos por TP-PCR. b. grado de metilación presente por los alelos, 42-78% respectivamente para cada alelo.</p>	<p>a.</p> <p>b.</p>
<p>II, 1</p> <p>Figura 43. Electroferogramas generado por II.1, a. Alelos de 32-200 obtenidos por TP-PCR. b. grado de metilación presente por los alelos, 12-48% respectivamente para cada alelo.</p>	<p>a.</p> <p>b.</p>
<p>II, 2</p> <p>Figura 44. Electroferogramas generado por II.2, a. Alelo de más de 200 repetidos obtenidos por TP-PCR. b. grado de metilación presente por el alelo, 100% respectivamente para cada alelo.</p>	

En esta familia se puede observar el modo de herencia ligado al cromosoma X, así como la inestabilidad por parte de *FMR1*, lo que propició que durante la recombinación de gametos, el alelo que portaba I, 1 se expandiera a una mutación completa en una sola generación, transmitiendo a II, 2 el alelo con mutación completa, en el caso de II, 1 se puede observar que es portadora de la mutación completa por las mismas razones previamente descritas.

Finalmente se han identificado otros factores genéticos y ambientales que pueden modular el riesgo a desarrollar FXTAS [7]. Los resultados presentados en este trabajo mostraron que de las 110 muestras analizadas, 57 individuos masculinos y 53 individuos femeninos, en este último sexo, la inactivación del cromosoma X contribuye significativamente en el riesgo a desarrollar FXTAS, ya que el patrón de la inactivación del cromosoma X es preferencial entre portadoras de la PM con y sin FXTAS. De manera que todas las mujeres con FXTAS y con la inactivación del cromosoma X, favorecen la severa inactivación del alelo normal mientras que las asintomáticas inactivaban preferencialmente el alelo expandido. Por último, existen polimorfismos que podrán contribuir a la penetrancia de FXTAS [7]. Donde se ha identificado un notorio incremento en la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *ApoE*, gen que se ha reportado para la predisposición del parkinsonismo y por ende de la enfermedad de Parkinson, en los pacientes con FXTAS respecto los portadores de la PM sin FXTAS. Esta proteína es crucial en el metabolismo del colesterol y el alelo $\epsilon 4$ se considera un factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer, estos resultados sugieren que la presencia del alelo *ApoE* $\epsilon 4$ podría incrementar el riesgo a desarrollar FXTAS entre los individuos portadores de la PM.

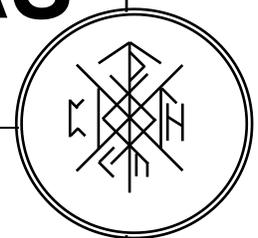
10. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Se logró determinar el número de repetidos del trinucleótido expandido CGG del gen *FMR1* en pacientes mexicanos con temblor/ataxia de etiología no determinada.
2. Los alelos más frecuentes en las muestras analizadas corresponden a un total de 29 repetidos, lo que equivale a un 9.68% menos que lo reportado previamente en población mexicana (32 repetidos).
3. La prevalencia de alelos potencialmente inestables en el grupo de zona gris y premutación (44-124) es superior a la estimada, la cual era de un 5 % como máximo, obteniéndose un 6.13 %.
4. El porcentaje de metilación hallado en las muestras revela que tiene mayor incidencia la metilación en varones que en mujeres y que es un factor importante para conocer la razón de la patología presente en los pacientes.
5. Se pudo estandarizar e incorporar las técnicas empleadas en este trabajo (TP-PCR y mPCR) para la investigación y el diagnóstico certero de FXTAS en el departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velazco Suárez".
6. Abaratar costos, tanto económicos como en horas de trabajo, ya que la prueba de oro para esta determinación es por Southern Blot, que resulta ser de un mayor costo por el uso de anticuerpos y de mayor riesgo toxico por el uso de radioactividad, así como de horas ya que se estima que un análisis de este tipo tarda entre 5 a 10 días.

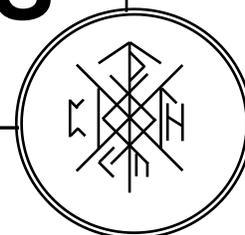
11. PERSPECTIVAS



Perspectivas

- El diagnóstico de FXTAS y fenotipos asociados debe considerarse en los casos de temblor/ataxia que no corresponden a las causas más frecuentes (SCA 2, 3, 7, FRDA y Enfermedad de Parkinson).
- Con base en los resultados obtenidos, el médico genetista puede brindar un asesoramiento genético, al tener conocimiento del número de repetidos CGG, número de interrupciones AGG y el porcentaje de metilación de *FMR1*.
- Expandir el estudio a las características clínicas, evaluar otros genes modificadores, realizar estudios funcionales y de expresión para conocer mejor la fisiopatología, etc.

12. REFERENCIAS



REFERENCIAS

1. Ashizawa T, Xia G. Ataxia. Continuum. 2016 Aug;22(4 Movement Disorders):1208-26. PubMed PMID: 27495205.
2. Louis ED. Diagnosis and Management of Tremor. Continuum. 2016 Aug;22(4 Movement Disorders):1143-58. PubMed PMID: 27495202.
3. Ure RJ, Dhanju S, Lang AE, Fasano A. Unusual tremor syndromes: know in order to recognise. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 2016 Nov;87(11):1191-203. PubMed PMID: 26985048
4. Gironell A, Marin-Lahoz J. [The essence of essential tremor: neurochemical bases]. Revista de neurologia. 2016 Jun 1;62(11):507-15. PubMed PMID: 27222085. La esencia del temblor esencial: bases neuroquímicas.
5. Seixas AI, Maurer MH, Lin M, Callahan C, Ahuja A, Matsuura T, et al. FXTAS, SCA10, and SCA17 in American patients with movement disorders. American journal of medical genetics Part A. 2005 Jul 1;136(1):87-9. PubMed PMID: 15889413.
6. Hall DA, Berry-Kravis E, Jacquemont S, Rice CD, Cogswell J, Zhang L, et al. Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). Neurology. 2005 Jul 26;65(2):299-301. PubMed PMID: 16043804.
7. Hagerman R, Hagerman P. Advances in clinical and molecular understanding of the *FMR1* premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. The Lancet Neurology. 2013 Aug;12(8):786-98. PubMed PMID: 23867198. Pubmed Central PMCID: 3922535
8. Gonzalez-del Angel A, Vidal S, Saldana Y, del Castillo V, AngelAlcantara M, Macias M, et al. Molecular diagnosis of the fragile X and FRAXE syndromes in patients with mental retardation of unknown cause in Mexico. Annales de genetique. 2000 Jan-Mar;43(1):29-34. PubMed PMID: 10818218.
9. Rasmussen A, Matsuura T, Ruano L, Yescas P, Ochoa A, Ashizawa T, et al. Clinical and genetic analysis of four Mexican families with spinocerebellar ataxia type 10. Annals of neurology. 2001 Aug;50(2):234-9. PubMed PMID: 11506407.

10. Harding AE. The hereditary ataxias and related disorders. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and New York 1984.
11. Tallaksen CM. Hereditary ataxias. TidsskrNorLaegeforen. 2008; 128(17): 1977-1980.
12. Camacho, A. (2008). "Ataxia Aguda". Asociación Española de Pediatría. Sección de Neurología Infantil. Madrid, España.
13. Schmitz-Hubsch. Spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6, Disease severity and nonataxia symptoms. Neurology 2008; 23(71):982
14. Alonso, E., et al., Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. MovDisord, 2007. 22(7): p. 1050-3.
15. Klockgether T. Sporadic ataxia with adult onset: classification and diagnostic criteria. Lancet Neurol. 2010;9:94-104.
16. Mila M, et al, (2009). Fragile X tremor ataxia syndrome (FXTAS): a new kind of spinocerebellar ataxia associated to fragile X syndrome premutation carriers. CIBERER. Barcelona, España.
17. Jacquemont S, et-al. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: Molecular, clinical, and neuroimaging correlates Am J Hum Genet, 72 (2003), pp. 869-878
18. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman P.J. Elevated levels of *FMR1* mRNA in carrier males: A new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome Am J Hum Genet, 66 (2000), pp. 6-15
19. Capelli, L.P., et al., The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). ArqNeuropsiquiatr, 2010. 68(5): p. 791-8.
20. Rosales-Reynoso, M.A., et al., Genetic diversity at the *FMR1* locus in Mexican population. Arch Med Res, 2005. 36(4): p. 412-7.
21. Hall, D.A. and A. O'Keefe J, Fragile x-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. Tremor Other HyperkinetMov (N Y), 2012. 2: p. <http://tremorjournal.org/article/view/56>.
22. Hagerman, R., Advances in molecular of the *FMR1*. Lancet Neurol, 2013. 12(8): p. 786-98.

23. Capelli, L.P., et al., The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). *ArqNeuropsiquiatr*, 2010. 68(5): p. 791-8.
24. Arriada N, Otero E. Corona T. Conceptos actuales sobre cerebelo y cognición. *Rev Neurol*. 1999; 29(11): 1075-1082
25. Delgado-García JM . Estructura y función del cerebelo. *Rev Neurol* 2001;33 (07):635-642
26. Fine EJ, Ionita CC, Lohr L (2002). «The history of the development of the cerebellar examination». *Semin Neurol* 22 (4): 375-84. PMID 12539058
27. Fox, S. I. (2014). *Fisiología humana* (13a. ed.), McGraw Hill Mexico. Pp 391
28. Pozo, F. J. F. (2009). *Anatomofisiología y Patología Basicas*, Arán Ediciones, S.L., 94
29. Ojeda, J.L & Icardo, J.M. *Neuroanatomía humana* Masson. 1ª Ed. Barcelona, 2005,33-35
30. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Gerard J. Tortora y Bryan H. Derrickson. Ed. Panamericana. 11ª edición, 2009. ISBN: 978-968-7988-77-1., 560-561
31. Polussa, J.; Schneider, A.; Hagerman, R. Molecular advances leading to treatment implications for Fragile X premutation carriers. *Brain Disord. Ther.* 2014.
32. Hagerman, R.J.; Hagerman, P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome—features, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* 2016, 12, 403–412.
33. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP & et al. 1991 Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65 905-914.
34. O'Donnell WT & Warren ST 2002 A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 25 315-338.
35. Zalfa F & Bagni C 2004 Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein? *Curr Issues Mol Biol* 6 73-88.

36. Fernandez E, Rajan N & Bagni C 2013 The FMRP regulon: from targets to disease convergence. *Front Neurosci* 7 191.
37. Willemsen R, Levenga J & Oostra BA 2011 CGG repeat in the *FMR1* gene: size matters. *Clin Genet* 80 214-225.
38. Bagni C, Tassone F, Neri G & Hagerman R 2012 Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest* 122 4314-4322.
39. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA & Nelson DL 1993 Fine structure of the human *FMR1* gene. *Hum Mol Genet* 2 1147-1153.
40. Dolzhanskaya N, Merz G & Denman RB 2006b Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* 45 10385-10393.
41. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U, Kerr B, Turner G, Lindenbaum RH, Winter R, Prembrey M, Thibodeau S & Davies KE 1991 Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 64 861-866.
42. Jin P & Warren ST 2000 Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 9 901-908.
43. Lokanga RA, Entezam A, Kumari D, Yudkin D, Qin M, Smith CB & Usdin K 2013 Somatic expansion in mouse and human carriers of fragile X premutation alleles. *Hum Mutat* 34 157-166.
44. Terracciano A, Pomponi MG, Marino GM, Chiurazzi P, Rinaldi MM, Dobosz M & Neri G 2004 Expansion to full mutation of a *FMR1* intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet* 12 333-336.
45. Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B & et al. 1993 The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* 4 143-146.
46. Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, Tassone F, Yrigollen C, Cronister A, Jodah M, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Shroff R, Latham GJ & Hadd AG 2013 Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet A* 161 771-778.

47. Tassone F, Hagerman RJ, Garcia-Arocena D, Khandjian EW, Greco CM & Hagerman PJ 2004a Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *J Med Genet* 41 e43.
48. Pretto DI, Hunsaker MR, Cunningham CL, Greco CM, Hagerman RJ, Noctor SC, Hall DA, Hagerman PJ & Tassone F 2013 Intranuclear inclusions in a fragile X mosaic male. *Transl Neurodegener* 2 10.
49. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 2001; 278: 25-31
50. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
51. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999; 23: 58-61.
52. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
53. International Human Genome Sequencing Consortium. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
54. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 93-124.
55. Mermoud JE, Popova B, Peters AH, Jenuwein T, Brockdorff N. Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* 2002; 12: 247-51.
56. Schwemmle S, de Graaff E, Deissler H, Glaser D, Wohrle D, Kennerknecht I, et al. Characterization of *FMR1* promoter elements by in vivo footprinting analysis. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1354-62
57. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.

58. Deys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The *FMR1* protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* 1993; 4: 33540
59. Smith SS, Laayoun A, Lingeman RG, Baker DJ, Riley J. Hypermethylation of telomere-like foldbacks at codon 12 of the human cHa rat gene and the trinucleotide repeat of the *FMR1* gene of fragile X. *J Mol Biol* 1994; 243: 14351.
60. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev* 2000; 1: 119.
61. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Eur J Physiol* 2001; 442: 47986.
62. Bowater RP and Wells RD. 2000. "The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders". *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 66:159-202.
63. Mulvihill DJ, Nichol Edamura K, Hagerman KA, Pearson CE, Wang YH. 2005. "Effect of CAT or AGG interruptions and CpG methylation on nucleosome assembly upon trinucleotide repeats on spinocerebellar ataxia, type 1 and fragile X syndrome". *J Biol Chem.* 280 (6):4498-503.
64. Lenzmeier BA y Freudenreich CH. 2003. "Trinucleotide repeat instability: a hairpin curve at the crossroads of replication, recombination and repair". *Cytogenet. Genome. Res.* 100:7-24.
65. Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eischler EE, Nelson DL, Warren ST. 1993. "Human and murine *FMR1* alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat" *Nature Genet.* 4:244-251.
66. Bardoni B, Mandel JL. 2002. "Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes". *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:284-293
67. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Hagerman PJ. 2001. "A majority of fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of *FMR1* messenger RNA". *J. Med. Genet.* 38: 453-456.
68. de Graaff E, Willemsen R, Zhong N, de Die-Smulders CEM, Brown WT, Freling G, Oostra BA. 1995. "Instability of the CGG repeat and expression of the *FMR1*

- protein in a male fragile X patient with a lung tumor". Am.J. Hum. Genet. 57: 609-618.
69. Kumari D and Usdin K. 2001. "Interactions of the transcription factors USF1, USF2 and alpha-Pa1/Nrf-1 at the *FMR1* promoter: Implications for the Fragile X mental retardation syndrome" J. Biol. Chem. 276: 4357-4364.
70. Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD, Hagerman PJ. 2000b "Transcription of the *FMR1* gene in individuals with fragile X syndrome". Ann. J. Med. Genet. 97: 195-203.
71. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. 2000a. "Elevated levels of *FMR1* mRNA in carrier males: A new mechanism of involvement in the Fragile X Syndrome". Am J Hum Genet; 66: 6-15.
72. Allen EC, He W, Yadav-Shah M, Sherman SL. 2004 "A study of the distributional characteristics of *FMR1* transcript levels in 238 individuals". Hum. Genet. 114: 439-447.
73. Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST. 2001 "Reduced FMRP and increased *FMR1* transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers". Hum. Mol. Genet. 10: 1449-1454.
74. Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakkis L, Eberhart D, Warren ST. 1995. "Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at *FMR1*". Science. 268:731-734
75. Beilina A, Tassone, F, Schwartz PH, Sahota, P, Hagerman, PJ. 2004. "Redistribution of transcription start sites within the *FMR1* promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element". Hum. Mol. Genet. 13: 543-549.
76. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. 1993. "The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation". Nat. Genet. 4:335-340.
77. Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfus G. 1995 "FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene". EMBO J. 4: 2401-2408.

78. Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1995. "The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2". *EMBO J.* 14(21):5358-66.
79. Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST. 1996. "The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals". *Hum Mol Genet.* 5(8):1083-91.
80. Hubber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. 2002. "Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation". *Proc Natl Acad Sci USA* 99(11):7746-50.
81. Jin P, Alisch RS, Warren ST. 2004. "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation". *Nat Cell Biol.* 6(11):1048-53.
82. Chen L, Hadd A, Sah S, Filipovic-Sadic S, Krosting J, Sekinger E, Pan R, Hagerman PJ, Stenzel TT, Tassone F, Latham GJ: An informationrich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for Southern blot analysis. *J Mol Diagn* 2010, 12:589–600
83. Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, Hagerman PJ, Stenzel TT, Hadd AG, Latham GJ, Tassone F: A novel *FMR1* PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem* 2010, 56:400–409
84. KEGG. (2.1.1.37)
85. Grasso M, Boon EM, Filipovic-Sadic S, van Bunderen PA, Gennaro E, Cao R, Latham GJ, Hadd AG, Coviello DA. A novel methylation PCR that offers standardized determination of *FMR1* methylation and CGG repeat length without southern blot analysis. *J Mol Diagn.* 2014;16(1):23–31. doi: 10.1016/j.jmoldx.2013.09.004.
86. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*606829}: {2016}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
87. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*601556}: {2016}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>

88. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*601517}: {2017}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
89. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*607047}: {2013}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
90. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*607640}: {2016}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
91. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*600075}: {2012}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
92. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {*309550}: {2017}. World Wide Web URL: <https://omim.org/>
93. PROSITE, 2016."FMRP Domain", Documentation PDOC51641, Disponible en: <https://prosite.expasy.org/PDOC51641>
94. Dyce Gordon, Elisa. (1999). Impronta genómica. Revista Archivo Médico de Camagüey, 3(4)
95. Sergio Ferrer. "El verdadero sentido de la vida." Journal of Feelsynapsis (JoF). ISSN 2254-3651. 2011 (1): 119-127.
96. Seneca, Sara et al. 2012. Reliable and Sensitive Detection of Fragile X (Expanded) Alleles in Clinical Prenatal DNA. Samples with a Fast Turnaround Time. The Journal of Molecular Diagnostics, Volume 14 , Issue 6 , 560 – 568
97. Ciotti, P., Di Maria, E., Bellone, E., Ajmar, F., & Mandich, P. (2004). Triplet Repeat Primed PCR (TP PCR) in Molecular Diagnostic Testing for Friedreich Ataxia. The Journal of Molecular Diagnostics : JMD, 6(4), 285–289.
98. Ku JL., Jeon YK., Park JG. (2011) Methylation-Specific PCR. In: Tollefsbol T. (eds) Epigenetics Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 791. Humana Press.