



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO MOLECULAR DEL SINDROME DEL
X FRAGIL EN POBLACION MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. ELVIA SELENE PEREZ HERRERA

DIRECTORES DE TESIS: MED. CIR. FABIO SALAMANCA GOMEZ

DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264136
1998

0346 13
24



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.

DEDICATORIA

A mis padres:

Enrique y Elvia

A mis hermanos:

Ma. del Refugio, Rafael, Enrique y Karina

A mi esposo:

Saúl

A todos ustedes por su amor, comprensión y apoyo constante, por estar siempre conmigo compartiendo mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez, por brindarme ésta oportunidad, por su confianza y por su apoyo entusiasta.

Al Dr. Diego Arenas Aranda por su asesoramiento en la realización de este trabajo, por su apoyo y amistad incondicional durante todo este tiempo.

A los sinodales Dr. Ramón Coral V, Dra. Cecilia Montañez O, Dra. Virginia Palma P, Dra. Rosenda Peñaloza E. y Dr. Bulmaro Cisneros V, por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de la Unidad de Genética: a Mary, Rafael, Paul, Carolina, Adán, Rosita, Ana Claudia, Arely, Antonio, Lolita, Juan Carlos, Ana Mary, por los momentos de alegría que compartimos. A Virginia Palma y Roberto Guevara por su apoyo, consejos, entusiasmo y amistad. Gracias.

Al CONACyT por el apoyo económico para la realización de esta tesis a través de la beca 93848.

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

INDICE

| | |
|--|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCION | |
| 2.1 Síndrome del cromosoma X frágil | 2 |
| 2.2 Estudios citogenéticos | 5 |
| 2.3 Genética Molecular | 5 |
| 2.4 Características del gen FMR1 | 5 |
| 2.5 Características del transcrito FMR1 y Proteínas FMRPs | 9 |
| 2.6 Diagnóstico Molecular | 12 |
| III. OBJETIVOS | 13 |
| IV. METODOS | |
| 4.1 Origen de la muestra | 14 |
| 4.2 Aislamiento de DNA genómico | 14 |
| 4.3 Aislamiento de RNA total | 15 |
| 4.4 PCR para determinar polimorfismo del gen FMR1. | |
| a) PCR radioactivo | 16 |
| b) PCR no radioactivo | 17 |
| c) PCR diplex | 17 |
| 4.5 RT-PCR para determinar el transcrito del gen FMR1 | 18 |
| V. RESULTADOS | |
| 5.1 Cuantificación de DNA y RNA..... | 19 |
| 5.2 Polimorfismo del gen FMR1 | 19 |
| 5.3 Diagnóstico molecular | 26 |
| VI. DISCUSION | 35 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 41 |

I. RESUMEN

El síndrome del X frágil es la causa principal de retardo mental hereditario en humanos, se hereda de manera dominante ligada al cromosoma X, con penetrancia incompleta en mujeres. El gen FMR1 responsable de este síndrome se localiza en la banda Xq 27.3, en un sitio frágil sensible a folato llamado FRAXA. En el exon 1 de este gen existe una región polimórfica de trinucleótidos CGG repetidos, este polimorfismo varía de 6 a 50 copias en personas no afectadas. Un aumento o expansión en este número (200 o más) ocasiona la enfermedad, ya que las secuencias CpG del promotor del gen se hipermetilan, lo que probablemente condiciona la inhibición de la transcripción del gen. Hombres transmisores y mujeres portadoras tienen un número de repetidos de 52 a 193 y no manifiestan la enfermedad. El diagnóstico se realiza mediante la detección citogenética del sitio frágil, sin embargo no todos los varones afectados lo presentan y los portadores son citogenéticamente normales.

En este estudio se determinó el polimorfismo de los repetidos CGG del gen FMR1 en individuos no afectados, pertenecientes a la población mexicana y se implementó el diagnóstico molecular en pacientes con historia clínica compatible con el síndrome X frágil.

Utilizando la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa, se determinó el número de repetidos CGG del gen FMR1 en el DNA de 30 mujeres y 25 hombres, analizando un total de 85 cromosomas X. Se encontraron 12 alelos diferentes con un número de repetidos que varía de 16 a 33 copias, en donde los alelos más frecuentes fueron los de 28 repetidos (28.75%) seguido del de 27 repetidos (20%) y 33 repetidos (10%), los demás alelos tuvieron una representación menor del 7%. El polimorfismo encontrado en la población mexicana analizada es similar al encontrado en poblaciones de caucásicos, asiáticos, australianos y japoneses.

Mediante la técnica de RT-PCR se determinó la presencia o ausencia del transcrito del gen FMR1 en el RNA de pacientes con retardo mental para establecer el diagnóstico de X frágil. Se analizaron 18 pacientes que se separaron en 3 grupos, por criterios de inclusión diferentes. Seis presentaron retardo mental variable con un patrón de herencia ligado al X, sin estudio citogenético. Seis con coeficiente intelectual limitrofe y estudio citogenético negativo. Seis con retardo mental variable sin antecedentes familiares. 17 pacientes presentaron el transcrito del gen FMR1, lo cual sugiere que su fenotipo no se debe a alteraciones en el número de repetidos de este gen. El análisis de RT-PCR de un paciente mostró la ausencia del transcrito del gen, lo que sugiere la presencia de una mutación en FMR1. La incidencia de X frágil en la población estudiada fue del 5 % (1/18 pacientes). Estos resultados sugieren que quizá la incidencia de X frágil en nuestra población sea baja o que al igual que en otras poblaciones exista un subdiagnóstico de la enfermedad.

II. INTRODUCCION

Se considera que el DNA es una molécula que transmite la información genética en forma estable debido a la fidelidad de la maquinaria replicativa y a la transmisión predecible de las características hereditarias de acuerdo a los principios mendelianos. El descubrimiento de secuencias altamente polimórficas en diversos genomas, como los minisatélites y microsatélites plantea que el DNA es una molécula dinámica, sin embargo este dinamismo es limitado ya que la transmisión de estas secuencias polimórficas a través de las generaciones es predecible.

Recientemente se ha reportado la existencia de un tipo de secuencias de DNA que inducen mutaciones por la amplificación de trinucleótidos repetidos, éstos son altamente polimórficos y se expanden de una generación a otra por un cambio mutacional, esta expansión continúa a través de las generaciones, como una mutación dinámica, que tiene un patrón de herencia no clásico.

Se han caracterizado 4 grupos de trinucleótidos repetidos relacionados con la expansión del DNA en el genoma humano, secuencias CGG/GCC, CAG/GTC, CTG/GAC y recientemente GAA/CTT. Los repetidos CAG/GTC forman parte de la región codificadora del gen y están relacionados con diversas enfermedades neurodegenerativas. Los repetidos de CTG se encuentran en la región 3' no codificadora del gen relacionado con la distrofia miotónica. Los tripletes GAT/CTT se encuentran en un intron de un gen implicado en una ataxia. Por último las secuencias CGG generalmente se localizan en las regiones no codificadoras de varios genes y están asociadas a sitios frágiles en los cromosomas, cuando se expanden. Estos sitios frágiles son visibles citogenéticamente como un adelgazamiento en regiones específicas de los cromosomas en metafase (1).

2.1 SINDROME DEL CROMOSOMA X FRAGIL

La manifestación clínica principal de este síndrome hereditario consiste en retardo mental en los individuos afectados, con un IQ promedio de 40, aunque este retardo y otras características fenotípicas relacionadas con la enfermedad tienen una expresión variable dependiendo de la edad del individuo afectado.

Dentro de las características clínicas de los individuos prepuberales se encuentra, retardo en el desarrollo psicomotor, alteraciones craneofaciales como macrocefalia, prognatismo, frente amplia y pabellones auriculares prominentes; en algunos casos existen crisis convulsivas, hipotonía, alteraciones conductuales como hiperactividad, autismo y movimientos estereotipados de manos.

En los individuos pospuberales se presenta un retardo mental variable en su severidad, alteraciones craneofaciales y en algunos casos macroorquidia (2,3).

En 1938 Penrose demostró que existía una mayor incidencia de retardo mental en hombres que en mujeres, lo cual junto con otros trabajos sugirió que este tipo de retardo mental en humanos estaba ligado al cromosoma X (4).

En 1969 se reportó en una familia con retardo mental ligado al cromosoma X, un marcador en este cromosoma (una constricción o isobrecha del brazo q), denominado sitio X frágil, que segregaba con los individuos afectados (5). Debido a que este marcador no siempre aparecía en los individuos afectados no se utilizó hasta 1977 cuando se establecieron las condiciones para el uso de este marcador en el diagnóstico citogenético del síndrome X frágil (6).

El patrón de herencia de esta enfermedad ligada al cromosoma X es inusual. Aproximadamente el 80% de los hombres que heredan la mutación relacionada con el síndrome X frágil, tienen retardo mental de moderado a grave y algunos otros rasgos fenotípicos relacionados con la enfermedad. Sin embargo otros hombres que heredan la mutación son clínicamente normales y no manifiestan el sitio frágil cromosómico. A estos se les denomina hombres transmisores, ya que si la mutación se trasmite por sus hijas, sus nietos tendrán un alto riesgo de presentar la enfermedad.

Por otro lado las hijas de los hombres transmisores no están afectadas por la enfermedad, pero son portadoras obligadas de la mutación relacionada con la alteración. Se estima que menos del 30% de las mujeres que heredaron la mutación de parte de su madre portadora presentan características faciales similares a los varones afectados y alteraciones mentales que pueden ir desde fallas en el aprendizaje con IQ normal hasta retraso mental grave (2,7).

Debido al patrón de herencia peculiar de la enfermedad se propuso que esta alteración se heredaba como un rasgo dominante ligado al cromosoma X, con una penetrancia incompleta en las mujeres y el riesgo de manifestar la enfermedad en una familia con antecedentes de esta alteración depende de la posición del individuo en cuestión en el árbol genealógico (2) (Fig. 1)

Se ha estimado que la frecuencia de este síndrome, en las poblaciones humanas estudiadas, es alta, en 1 de cada 1250 hombres y en 1 de cada 2500 mujeres, la frecuencia de portadores en la población general se calcula en 1 de cada 886 individuos (2,8,9). Sin embargo recientemente, Turner y cols. consideran que esta enfermedad ha estado subestimada debido a la dificultad en su diagnóstico, ellos reportan una frecuencia baja, en 1 de cada 4000 hombres (9).

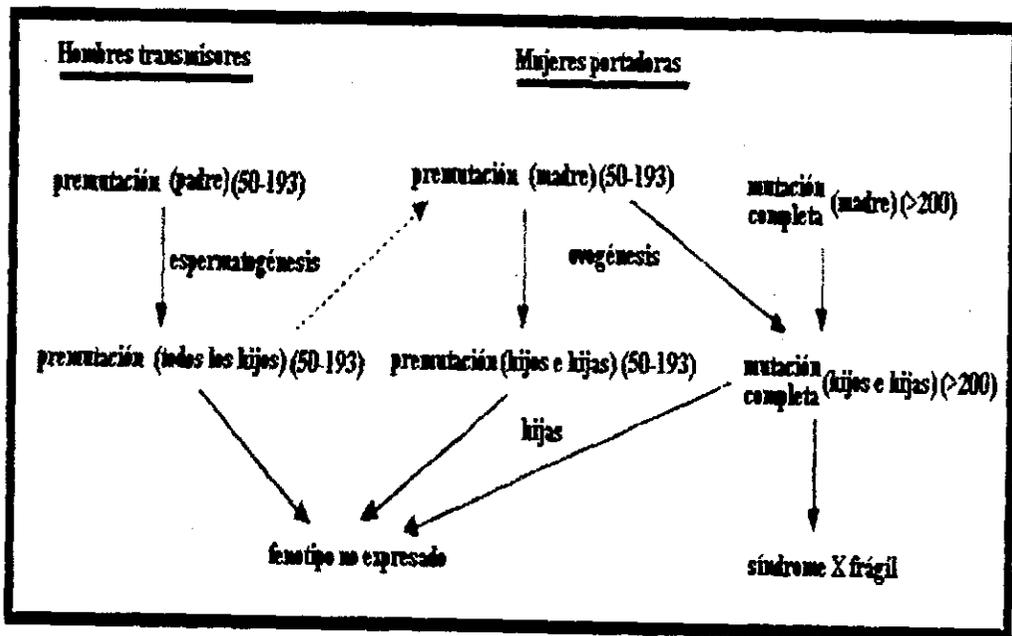


Fig. 1 FORMA DE HERENCIA DE MUTACION COMPLETA EN EL SINDROME X FRAGIL. Se representa el número aproximado de repetidos de trinucleótidos CGG. La flecha punteada indica que las hijas de un hombre transmisor son portadoras de la premutación y éstas pueden tener en la siguiente generación, hijos e hijas con premutación o mutación completa que puede o no expresarse en un fenotipo X frágil. Tomado y modificado de Tarlenton, 1993 (2).

2.2 ESTUDIOS CITOGENETICOS DEL SINDROME X FRAGIL

Los individuos afectados por esta enfermedad presentan un sitio frágil sensible a folato en la banda q27.3 del cromosoma X, denominado FRAXA. El sitio frágil se induce al cultivar células, de los individuos afectados, en un medio deficiente en ácido fólico y timidina o en presencia de antagonistas de folato como metotrexato o de un inhibidor de la timidilato sintetasa como la fluorodesoxiuridina, que ocasione un stress en la replicación del DNA. (10,11).

El diagnóstico del síndrome X frágil se realiza mediante el estudio clínico y la detección del sitio frágil; sin embargo esta prueba no es informativa en un buen número de casos, debido a que no todos los varones afectados lo presentan y los individuos portadores son citogenéticamente normales (2).

2.3 GENETICA MOLECULAR DEL SINDROME DEL X FRAGIL

El desarrollo de la Biología Molecular en los dos últimos decenios facilita aislar genes a partir de secuencias de DNA clonadas, sin necesidad de conocer el producto del gen. Esta técnica conocida como clonaje posicional (12) permitió en 1991 aislar el gen FMRI (por fragile X mental retardation) responsable del síndrome del X frágil (13,14).

2.4 CARACTERISTICAS DEL GEN FMRI

El gen FMRI se localiza en la banda q27.3 del cromosoma X, locus en donde se reconoce citogenéticamente el sitio frágil FRAXA. Este gen tiene una longitud de 38 kb, está formado de 17 exones, se estima que el tamaño promedio de sus intrones es de 2.2 kb. y el de sus exones de 112 pb. En la región no codificadora del extremo 5' del exon 1, se localiza una secuencia polimórfica de trinucleótidos repetidos en tandem CGG, interrumpidos por tripletes AGG principalmente en las posiciones 10 y 20 (15). (fig. 2)

El número de repetidos CGG en individuos normales varía entre 6 y 50 copias, estas diferencias constituyen un polimorfismo genético heredado de manera estable en forma mendeliana (3). Los hombres transmisores y las mujeres portadoras tienen una longitud de repetidos que varía de 52 a 193 copias, a esto se le conoce como premutación.

No existen manifestaciones clínicas relacionadas con el síndrome en estos sujetos pero se les considera portadores ya que tienen una alta probabilidad de tener individuos afectados en la siguiente generación, esto debido a que los alelos con premutación se comportan de manera inestable cuando se transmiten por vía materna. En estos casos ocurre un proceso de expansión del número de repetidos, a más de 200 copias. Esta expansión se conoce como mutación completa y se relaciona con la enfermedad (16,17).

El tamaño de los repetidos en los enfermos depende del número de repetidos que se presentan en el DNA de su madre, ya que en distintos estudios se ha establecido que cuando la premutación tiene menos de 70 copias, el riesgo de amplificación a mutación completa es del 10 %, para premutaciones de 70 a 90 copias, éste se eleva del 50 al 70%, para premutaciones de más de 90 copias, el riesgo es mayor del 90% (18).

Los alelos con mutación completa (más de 200 copias), se comportan de una manera inestable durante la mitosis, por lo que el mosaico somático es común en los individuos con la mutación (19,20).

Aunque los alelos con premutación, aumentan su número de copias de una generación a otra, no se ha descrito un aumento de repetidos desde alelos normales a rangos de premutación o mutación completa. Debido a que no se han descrito mutaciones *de novo* y a que hay marcadores genéticos que presentan desequilibrio de ligamiento con el gen, se ha sugerido que existe un grupo pequeño de cromosomas fundadores, que por causas que se ignoran han favorecido la expansión de repetidos desde valores normales a premutación o mutación completa (21).

Actualmente se sabe que el fenotipo de esta enfermedad es consecuencia de la expansión del número de repetidos CGG del gen FMR1 ya que la presencia de una mutación completa correlaciona con la metilación de la isla CpG que se localiza a 250 pb del extremo 5' de los repetidos CGG. Estas regiones CpG existen en los extremos 5' de los genes humanos y se cree que participan en el control de la transcripción; en los genes inactivos los residuos de citosina están metilados mientras que en los genes con expresión activa no están metilados.

Se ha observado que un número de repetidos mayor de 200 ocasiona que éstos y las secuencias CpG del promotor del gen se hipermetilen, esto probablemente condiciona la inhibición de la transcripción del gen.

Se cree que la ausencia del mRNA y por consiguiente de la proteína codificada por este gen, es lo que ocasiona la enfermedad (22, 23). (Fig. 3)

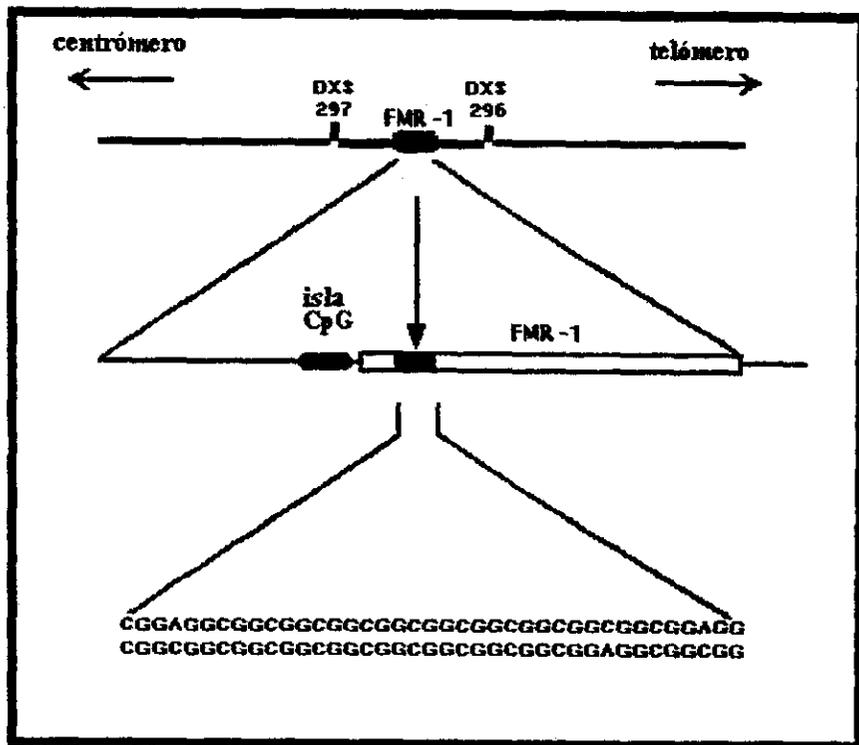


Fig. 2 ESQUEMA DEL GEN FMR1. Los marcadores DXS297 y DXS296 están aproximadamente a 2 o 3 centimorgans de distancia genética del locus X frágil. Los repetidos CGG se localizan en la región no codificadora del extremo 5' del exon 1, estos repetidos están interrumpidos en 1 o 2 ocasiones por tripletes AGG. Tomado y modificado de Tarlenton, 1993 (2).

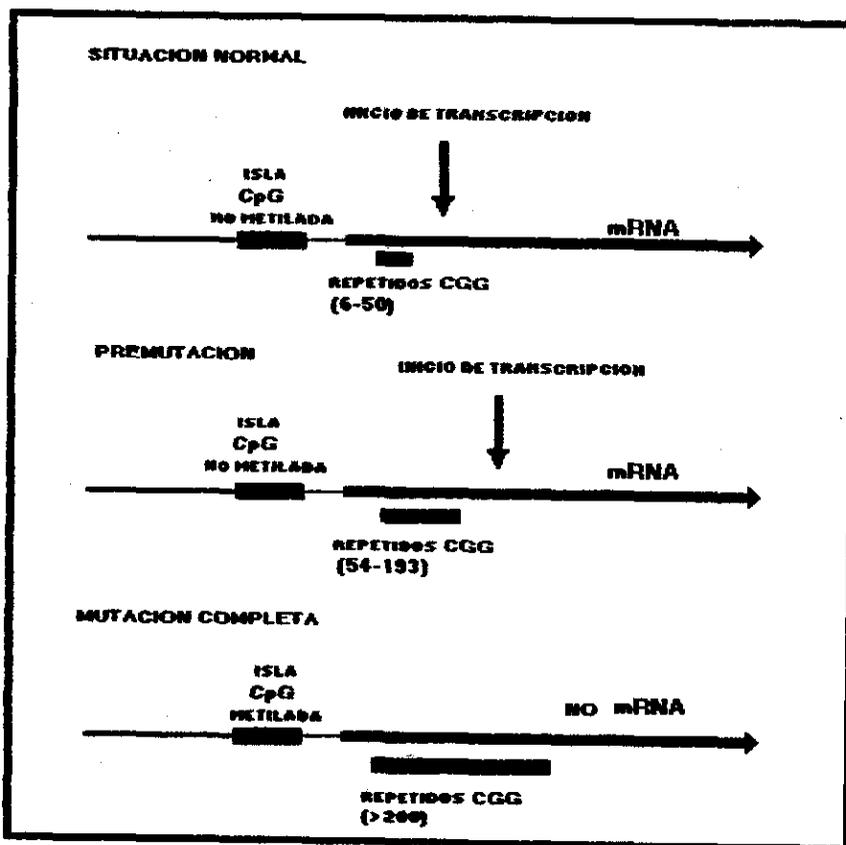


Fig. 3 Normalmente el gen FMR1 presenta la isla CpG no metilada y un número de repetidos CGG de 6 a 50 copias. Un aumento de repetidos CGG (>200) se presenta en el alelo con mutación completa, es posible que la expansión cause la metilación de la isla CpG, provocando la inhibición de la transcripción del gen. La expresión del fenotipo X frágil se debe a la ausencia del mRNA. Tomado y modificado de Tarlenton, 1993 (2).

Se han informado otras dos causas mutacionales diferentes a la expansión de los repetidos, que están asociadas con el síndrome X frágil. En un pequeño número de pacientes que manifiestan la enfermedad, se ha detectado la existencia de deleciones totales o parciales y de mutaciones puntuales en el gen FMR1, que afectan los dominios funcionales de la proteína (3,24,25).

La manifestación de la enfermedad en individuos con deleciones o mutaciones puntuales y que no tienen expansión de los tripletes CGG, confirman que el gen FMR1 es responsable de la enfermedad. Esto también se apoya en el hecho de que ratones transgénicos afectados en el gen FMR1, presentaron características compatibles con el síndrome como el macroorquidismo, alteraciones cognitivas e hiperactividad (18).

Existen al menos otros dos sitios frágiles sensibles a folato en la región Xq28, adyacentes a FRAXA, denominados FRAXE y FRAXF. En ambas regiones también existen repetidos de CGG. Se ha demostrado que la amplificación de los repetidos en la región FRAXE está relacionada con un retraso mental moderado en algunas familias que no presentan alteraciones en el gen FMR1. En el caso de la región FRAXF, las variaciones en el número de repetidos no se han asociado con manifestaciones fenotípicas (3,8).

2.5 CARACTERÍSTICAS DEL TRANSCRITO FMR1 Y PROTEINAS FMRPs.

El tamaño del transcrito producido por este gen es de 4.4 kb (15). Se han encontrado en el ratón, transcritos con una homología del 97% con el humano, (14,26). En la mayoría de los individuos afectados por este síndrome no se han detectado transcritos de este gen (27).

A partir de la secuenciación del cDNA del gen FMR1 humano, se propuso la secuencia de una proteína de 70 Kd, que contiene tres dominios funcionales altamente conservados entre vertebrados, previamente descritos en una variedad de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (RNPhn). Dos de estos dominios son del tipo KH, localizados en la región amino terminal, similar a los encontrados en proteínas hnRNPK, la secuencia motivo es B I G X2 G X2 B, donde B corresponde a uno de los tres aminoácidos hidrofóbicos: isoleucina, valina o leucina y X es cualquier aminoácido. El tercer dominio localizado en el extremo carboxilo terminal es una caja RGG (Arg-Gly-Gly) que es característica de proteínas U de unión a pre-mRNA (22).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que la FMRP tiene la capacidad de unirse a homopolímeros de RNA, a un lugar específico de transcritos de cerebro, incluyendo el mRNA del FMR1. En estos estudios se observó también que las proteínas FMRP obtenidas de un paciente con una mutación puntual en un residuo de isoleucina altamente conservado en el segundo dominio KH (Ile 304 Asn) y de un paciente con una versión truncada de la FMRP que contiene los dos dominios KH pero que carece de la caja RGG, no eran capaces de unirse a homopolímeros de RNA, además estos pacientes presentaban un fenotipo muy grave de X frágil (28,29).

Se ha descrito un empalme alternativo en el extremo 3' del transcrito de este gen, tanto en humanos como en ratones normales. Esto produce al menos 12 transcritos diferentes, que generan un grupo heterogéneo de proteínas FMRPs con pesos comprendidos entre 39 y 90 Kd. Esta familia de proteínas, cuya función se desconoce, se expresa en 27 tejidos diferentes, particularmente, en cerebro y testículos, dos de los órganos más afectados en el síndrome X frágil. (15, 26).

Estas proteínas se localizan principalmente en el citoplasma, aunque también se han detectado en núcleo, recientemente, se demostró que una isoforma de las FMRPs presenta tanto una señal de localización nuclear (NLS) que le permite entrar al núcleo para ensamblarse en una ribonucleoproteína (RNP) como una señal de exportación nuclear (NES) que le permite salir al citoplasma y asociarse con la subunidad ligera del ribosoma de una manera dependiente de RNA, lo que sugiere un posible papel de esta proteína en el inicio de la traducción (30) (Fig. 4).

Se sabe que la FMRP es una proteína de unión a RNA, asociada a ribosomas y se conocen los patrones de expresión e isoformas, pero no se sabe su función y el mecanismo por el cual su ausencia resulta en un retardo mental y características fenotípicas asociadas al X frágil.

En 1995 se aisló un gen autosómico homólogo al gen FMR1, denominado gen FXR1, localizado en la banda 12q13, que produce una proteína con una alta homología estructural y funcional con la FMRP. La existencia de un gen homólogo al FMR1 sugiere que debe existir una familia de genes con un papel biológico similar y posiblemente relacionados con el síndrome del X frágil en la población humana (31)

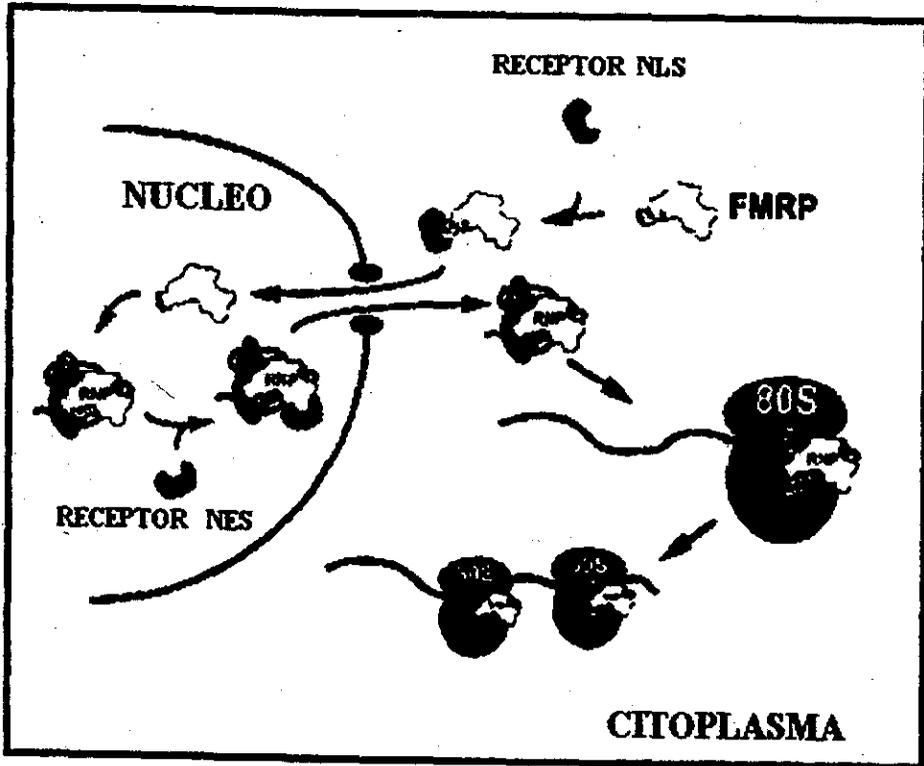


Fig. 4 POSTULACION DE LA FUNCION CELULAR DE LA FMRP. La señal de localización nuclear (NLS) y la señal de exportación nuclear (NES) de la FMRP tienen sus receptores apropiados que median el transporte a través del poro nuclear. La FMRP desnudo entra al núcleo, interactúa con el mRNA y otras proteínas formando una partícula RNP, la cual se exporta hacia el citoplasma donde se asocia con la maquinaria de traducción. Tomado y modificado de Verheij, 1995 (30).

2.6 DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL SINDROME X FRAGIL.

Debido al aislamiento y caracterización del gen FMR1, ahora es posible realizar un diagnóstico molecular del síndrome del X frágil, *trabajando directamente en la zona de repetidos del gen.*

Actualmente se utilizan dos técnicas moleculares diferentes para la caracterización de la expansión de trinucleótidos, la amplificación en cadena de la polimerasa radioactiva (PCR), donde se amplifica el número de repetidos CGG (19) y las hibridaciones tipo Southern blot, en la cual utilizando diversas sondas del gen FMR1 se determina la metilación de la isla CpG, esto permite la identificación de individuos con premutación o mutación completa (19,3,7). Ambos métodos se llevan a cabo utilizando isótopos radioactivos, lo que implica un alto costo para su realización, por lo tanto es necesario implementar estrategias metodológicas que nos permitan reducir costos, disminuir los riesgos a la salud y poder establecer un diagnóstico preciso de la enfermedad.

Debido a que la mayoría de los individuos afectados por el síndrome del X frágil no presentan el transcrito de este gen, una alternativa posible en el diagnóstico de individuos con retraso mental y sin antecedentes de la enfermedad, es determinar la presencia o ausencia del transcrito del gen, mediante RT-PCR. Si no está presente el transcrito tendremos un individuo afectado por el síndrome de X frágil. Si está presente, lo más probable es que el enfermo no presente el síndrome.

Por otro lado la principal causa mutacional relacionada con el síndrome X frágil es la amplificación de los repetidos CGG, aunque los límites entre el número de repetidos en individuos normales y con premutación no están totalmente definidos, es importante determinar en la población mexicana cuales son los rangos de estos repetidos ya que estableciéndolo se puede conocer cual es la posibilidad de que esta enfermedad se manifieste.

La frecuencia a nivel mundial del síndrome X frágil, sugiere frecuencias similares en nuestra población dado el tipo de herencia ligado al cromosoma X. Por lo anterior, el diagnóstico de individuos afectados es una necesidad dentro del campo de la medicina preventiva, ya que permite en muchos casos evitar, a las familias en riesgo, las severas cargas psicosociales y económicas que produce esta enfermedad, disminuyendo también las cargas médico-asistenciales.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar el polimorfismo de repetidos CGG del gen FMR1, en individuos pertenecientes a la población mexicana no afectados por el síndrome X frágil.
2. Establecer el diagnóstico molecular en pacientes con historia clínica compatible con el síndrome X frágil.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención de una colección de DNA genómico de individuos mexicanos, no emparentados *entre si* y *sin antecedentes del síndrome X frágil*.
2. Establecer el número de repetidos CGG del gen FMR1, en 85 cromosomas X de individuos no afectados, mediante PCR no radioactivo.
3. Determinar la presencia o ausencia del transcrito del gen FMR1, en individuos con historia clínica compatible con X frágil.

IV. METODOS

4.1 ORIGEN DE LA MUESTRA.

Las muestras sanguíneas de los individuos pertenecientes a la población mexicana se obtuvieron del banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Estas muestras corresponden a individuos sanos no emparentados entre sí, con padres y abuelos nacidos en México y sin antecedentes para el síndrome X frágil.

Las 18 muestras sanguíneas de los individuos posiblemente afectados por el síndrome X frágil se obtuvieron de 12 pacientes que asistieron a la consulta externa de Genética del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS y seis pacientes del Instituto Nacional de la Comunicación Humana. SSA, con previa autorización de los familiares de los pacientes para realizar este estudio.

La identificación de los individuos posiblemente afectados por esta enfermedad se realizó por un criterio clínico, en donde se determinó la existencia de retardo mental, alteraciones de conducta como hiperactividad o autismo y otros rasgos asociados con la enfermedad como anomalías craneofaciales o macroorquidismo.

4.2 AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO HUMANO

El DNA de los individuos analizados se obtuvo a partir de sangre periférica, siguiendo el método descrito por Kempster, 1992 (32). A 15 ml de sangre, se le agregaron 2.5 ml de anticoagulante (EDTA al 0.5% a pH 7.6) y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Se separaron los leucocitos de la interfase con una pipeta Pasteur y se resuspendieron en 15 ml de amortiguador RCLB (Tris-HCl 10mM pH 7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10 mM), posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior de 2 a 3 veces, hasta que la pastilla estaba blanca. La pastilla se resuspendió en 886 µl de NaCl 5 mM agitando fuertemente, se agregaron 46 µl de SDS al 10% y 308 µl de NaCl saturado, agitando nuevamente durante 5 min. con el fin de lisar las células. Posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min. con la finalidad de remover las proteínas precipitadas en la solución. Se decantó el sobrenadante en tubos Eppendorff y se sometió a extracciones fenólicas (25:24:1 fenol: cloroformo:isoamílico). El DNA presente en la fase acuosa se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto helado, se separó de esta solución por centrifugación, se lavó la pastilla 2 veces con etanol al

70%, se secó y se resuspendió en 500 μ l de agua desionizada esterilizada, almacenándose a -20°C , hasta su uso.

Posteriormente se determinó la concentración y grado de pureza del DNA por espectrofotometría. En una celdilla de cuarzo con 400 μ l de agua destilada se resuspendieron 4 μ l de la solución de DNA problema y se determinó la densidad óptica a 260 y 280 nanómetros en un espectrofotómetro de UV. Considerando que una densidad óptica de DNA bicatenario es igual a 50 $\mu\text{g/ml}$ se calculó la concentración del DNA problema. Para establecer el grado de pureza de la solución de DNA se determinó el cociente 260/280.

También se estimó la integridad del DNA, en geles horizontales de agarosa al 0.8 % en TBE IX (Tris-base 89 mM, Acido bórico 89 mM y EDTA 2 mM), con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Para la muestra se mezcló 1 μ l de colorante de corrida (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de cianol xileno y 30% de glicerol) y 1 μ l de DNA, se depositó en el pozo del gel y se sometió a una corriente eléctrica de 125 volts durante 30 min. Una vez terminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de UV de onda corta y se obtuvo una fotografía, con el sistema de computo IS-1000 Digital Imaging System.

4.3 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

El RNA total de los individuos analizados se obtuvo a partir de sangre periférica, siguiendo el método descrito por Chomczynski, 1992 (33). Cinco ml de sangre periférica se sometieron a centrifugación diferencial en un gradiente de ficoll hypaque 2:1, durante 30 min. Los linfocitos se separaron de la interfase con una pipeta Pasteur y fueron lisados inmediatamente con 150 μ l de isotiocianato de guanidina. Se agregaron 33 μ l de cloroformo agitando fuertemente y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C . El RNA presente en la fase acuosa se precipitó con 83 μ l de isopropanol helado, se separó de esta solución por centrifugación, se lavó la pastilla con Etanol al 75%, se secó y se resuspendió en 20 μ l de agua tratada con dietilpircarbono (DEPC) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Posteriormente se determinó la concentración y grado de pureza del RNA por espectrofotometría. En una celdilla de cuarzo con 400 μ l de agua destilada se resuspendieron 4 μ l de la solución de RNA problema y se determinó la densidad óptica a 260 y 280 nanómetros en un espectrofotómetro Beckman. Considerando que una densidad óptica de RNA unicatenario es igual a 40 $\mu\text{g/ml}$ se calculó la concentración del RNA problema. Para establecer el grado de pureza de la solución de RNA se determinó el cociente 260/280.

La integridad del RNA se determinó en geles horizontales de agarosa al 2% a 50 volts durante 2 horas, para la electroforesis del RNA se lavó previamente la cámara electroforética con NaOH al 10 M.

4.4 PCR PARA DETERMINAR EL NUMERO DE REPETIDOS CGG EN EL GEN FMRI.

El número de repetidos se determinó mediante una PCR radioactiva, de acuerdo al método descrito por Fu, 1991 (19) y mediante una PCR no radioactiva utilizando la polimerasa hipertermoestable PFU, de acuerdo al método descrito por Chong, 1994 (38).

A) PCR RADIOACTIVA

Cien nanogramos de DNA genómico fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos FMRX1 (5'-GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACCTCCGGT-3') y FMRX2 (5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAACTCCTCCA-3'). El tamaño esperado que contiene los repetidos CGG es de 221 pb (sumatoria de 30 pb del oligonucleótido FMRX1, 30 pb del oligonucleótido FMRX2, 91 pb distancia entre FMRX1 y el primer repetido, 70 pb distancia entre el último repetido y FMRX2) mas el número de pb de los repetidos CGG, por ejemplo un fragmento de 308 pb corresponde a 29 repetidos (221 pb más 87 pb de 29 repetidos).

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando solución amortiguadora de PCR IX (Tris-HCl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM), 3 pmoles de cada oligonucleótido, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP, dCTP, dTTP y 50 µM de dGTP, 150 µM de 7-deaza-dGTP, 10% de DMSO, 2 µci de α³²P-dCTP, 1 ud de Taq DNA polimerasa (Gibco-BRL), en un volumen final de 15 µl. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador RoboCycler Gradient 40 (Stratagene), bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 25 ciclos de 95 °C durante 2 min, 65 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 min y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Una vez terminada la amplificación, distintas alicuotas fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%. Los geles se prepararon con 7.5 ml de una solución stock de poliacrilamida al 40 % (acrilamida/ bisacrilamida 30:1), 5 ml de TBE 10X, 21 g de urea, 25 ml de agua desionizada, 0.4 ml de persulfato de amonio al 10% y 30µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilileno diamida). Se tomó una alicuota de 5 µl del DNA amplificado y 2 µl de colorante de corrida (98% de formamida, 10 mM de EDTA, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1 % de xileno cianol) y se llevó a una temperatura de 95 °C durante 1 min, posteriormente se colocó en el pozo del gel. El gel se sometió a una corriente eléctrica de 1600 volts durante 1.30 hrs.

Los geles se secaron de 20 a 30 min y se expusieron a una placa autoradiográfica de 24 a 48 hrs a -70°C . Posteriormente se revelaron y analizaron las placas de acuerdo al patrón de bandeó.

Como control de peso molecular se utilizó la secuencia del gen Taq del bacteriófago M13, clonado en el plásmido pBSMB para poder definir el número de repetidos.

B) PCR NO RADIOACTIVA

Cien nanogramos de DNA genómico fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos FMRX1 y FMRX2 descritos anteriormente.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando solución amortiguadora PFU IX, 0.2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada oligonucleótido, 5% de DMSO, 1 ud de PFU DNA polimerasa (Stratagene), en un volumen final de 10 μl . La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Robocycler Stratagene bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 98°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 98°C durante 1 min, 65°C durante 1 min, 72°C durante 2 min y una extensión final a 72°C durante 20 min.

Una vez terminada la amplificación, una alícuota se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4% a 150 volts durante 2 horas. Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 100 pb, para definir el número de repetidos.

C) PCR DIPLEX NO RADIOACTIVA

Cien nanogramos de DNA genómico fueron amplificados utilizando el par de oligonucleótidos FMRX1, FMRX2 descritos anteriormente y un par de oligonucleótidos RAC1, RAC2 que franquean una región polimórfica de repetidos AC del gen β -Globina de aproximadamente 200 pb.

La reacción de PCR diplex se llevó a cabo utilizando solución amortiguadora PFU IX, 0.2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada par de oligonucleótidos, 5% de DMSO, 1 ud de PFU DNA polimerasa (Stratagene), en un volumen final de 10 μl . La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Robocycler Stratagene bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 98°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de 98°C durante 1 min, 68°C durante 1 min, 72°C durante 2 min y una extensión final a 72°C durante 20 min.

Una vez terminada la coamplificación, una alícuota se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4% a 150 volts durante 2 horas. Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 50 pb.

4.5 RT-PCR PARA DETERMINAR EL TRANSCRITO DEL GEN FMRI

El RT-PCR se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Pieretti, 1991 (27), utilizando el Kit de RT-PCR AMV Boheringer. Cien nanogramos de RNA total fueron utilizados para sintetizar la primera cadena de cDNA. La reacción se llevó a cabo con solución amortiguadora 1X (Tris-HCl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM) 1 mM de cada dNTP, 5 mM de MgCl₂, 3 mM de Oligo dT, 25 uds de inhibidor de RNAsas, 10 uds de transcriptasa reversa en un volumen final de 15 µl.

Las condiciones de la síntesis fueron 25 °C durante 10 min, 42 °C durante 60 min y 99 °C durante 5 min.

El producto de la síntesis de la primera cadena de cDNA se usó para producir la segunda cadena, mediante PCR. Se utilizaron 2 pares de oligonucleótidos en la misma reacción, uno para amplificar una región del RNAm del gen FMRI, produciendo un fragmento de 146 pb: FMRX3 (5' TAGCTAACCACCACCAGCAAGGC 3') y FMRX4 (5' AACTGGCAGCCTGATAGGCAGATT 3')

Y otro para amplificar una región del RNAm del gen hipoxantin fosforibosiltransferasa (HPRT), utilizado como control positivo, produciendo un fragmento de 387 pb: FMRX5 (5' CGTGGGGTCCTTTTCACCAGCAAG 3') y FMRX6 (5' AATTATGGACAGGACTGAACGTC 3').

La reacción de PCR se llevó a cabo con buffer 1X (Tris-HCl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM), 1.5 mM de MgCl₂, 100 moles de cada oligonucleótido, 15 µl de cDNA, 2.5 uds de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 100 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Robocycler STRATAGENE bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 64 °C durante 2 min y una extensión final de 64 °C durante 5 min.

Una vez terminada la amplificación, una alícuota se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2 % a 125 volts durante 30 min, para determinar la presencia o ausencia del transcrito del gen FMRI (banda de 146 pb). Como control de peso molecular se utilizó una escalera de 50 pb y el plásmido pUC18/HaeIII.

V. RESULTADOS

5.1 CUANTIFICACION DE DNA Y RNA

Se obtuvo el DNA de 30 mujeres y 25 hombres, pertenecientes a la población mexicana, no emparentados y sin antecedentes de X frágil. En todos los casos la concentración e integridad del DNA aislado fueron óptimas, en promedio 300 a 500 ng/μl, con un índice de pureza de 1.8 a 2 (260/280) (Fig. 5).

El RNA se obtuvo de 18 pacientes con características clínicas compatibles con X frágil y de 5 individuos controles. En todos los casos la concentración e integridad del RNA total fueron óptimas, en promedio 250 a 300 ng/μl, con un índice de pureza entre 1.7 y 1.9 (260/280) (Fig. 6).

5.2 POLIMORFISMO DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMR1 EN INDIVIDUOS NO AFECTADOS

Utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa radioactiva y no radioactiva (PCR), se determinó el número de repetidos CGG del gen FMR1 en 30 mujeres y 25 hombres. La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos FMRX1 y FMRX2 que permitieron flanquear la región del gen FMR1 que contiene los repetidos CGG, observándose un amplificado de 308 pb cuando el número de copias del trinucleótido se encontró dentro de los límites normales (29 repetidos).

En la autoradiografía de la figura 7 se observan los productos de la amplificación radioactiva de repetidos CGG del gen FMR1 en distintos individuos no afectados. Se ilustra en el extremo izquierdo la secuencia del gen Taq del bacteriófago M13 utilizado como marcador de peso molecular. En el carril 1M se observa el amplificado de un individuo masculino que corresponde a 30 repetidos CGG, en el carril 2F se observa el amplificado de una mujer heterocigota para el alelo de 30 y 28 repetidos, 3F y 4F corresponden a mujeres homocigotas para el alelo de 30 repetidos, 5M y 6M corresponden a individuos masculinos con 31 repetidos.

En la figura 8 se muestra una fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en donde se observan los productos de la amplificación no radioactiva de repetidos CGG mediante la enzima PFU DNA polimerasa, en individuos no afectados. Se utilizó una escalera de 100 pb como marcador de peso molecular. La determinación del número de repetidos se realizó como se describe previamente en métodos. En el carril 26M se observa el amplificado de 293 pb que corresponde a un individuo masculino con 27 repetidos, en el carril 27F se observa el amplificado de 297 pb que corresponde a una mujer homocigota para el alelo de 28 repetidos, 29F y 32F corresponden a mujeres homocigotas para el alelo de 29 repetidos y en 33M se observa el amplificado de un individuo masculino con 33 repetidos.

De estas 2 formas se analizaron un total de 85 cromosomas X. La distribución y la frecuencia del número de repetidos CGG se muestra en la gráfica 1, en el eje de las Y el número de cromosomas y en el eje de la X el número de repetidos por alelo. El alelo más frecuente encontrado en los individuos analizados fue el de 28 repetidos.

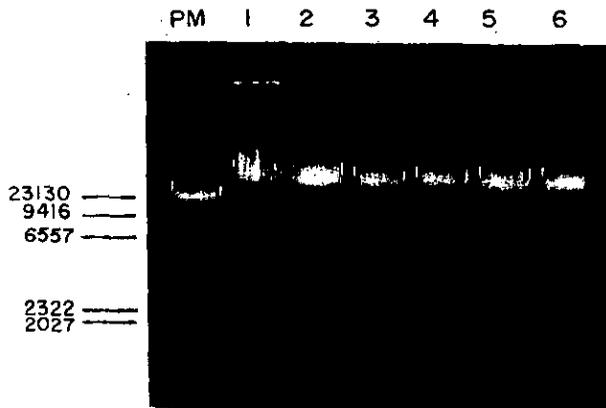


Fig. 5 DNA GENOMICO AISLADO DE INDIVIDUOS NO AFECTADOS POR EL SINDROME DEL X FRAGIL. El DNA se aisló a partir de 15 ml de sangre periférica como se indica en métodos y se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TBE 1X. Se observa la integridad del DNA genómico. PM: marcador de peso molecular λ HindIII.

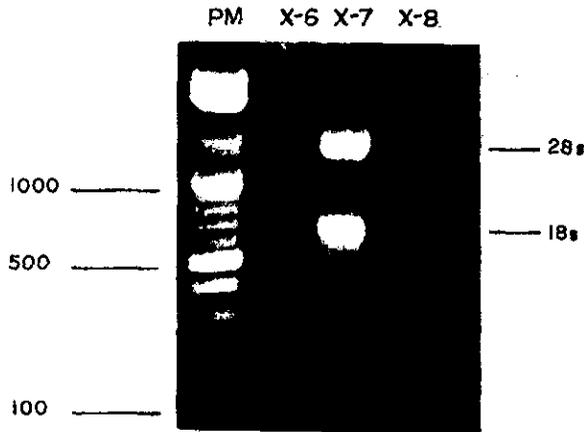


Fig. 6 RNA TOTAL AISLADO DE INDIVIDUOS CON RETARDO MENTAL. El RNA total se aisló a partir de linfocitos como se indica en métodos y se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 1X a 50 volts. PM: marcador de peso molecular escalera de 100 pb, se observa la integridad del mRNA, rRNA 28s y 18s.



Fig. 7 AMPLIFICACION RADIOACTIVA DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMR1 EN INDIVIDUOS NO AFECTADOS. El PCR radioactivo se realizó como se indica en métodos, el producto de la amplificación se sometió a electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida al 6 %. En esta autoradiografía se observa en el extremo izquierdo la secuencia del gen Taq del bacteriófago M13 utilizado como marcador de peso molecular. 1M corresponde a la amplificación de 30 repetidos CGG de un individuo masculino. 2F mujer heterocigota para los alelos de 30 y 28 repetidos. 3F y 4F: mujeres homocigotas para el alelo de 30 repetidos. 5M y 6M individuos masculinos de 31 repetidos.

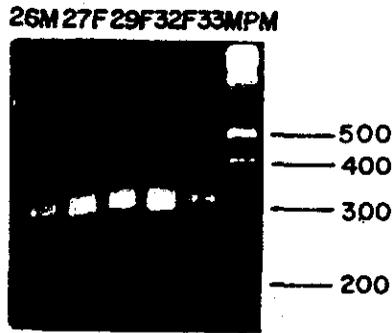
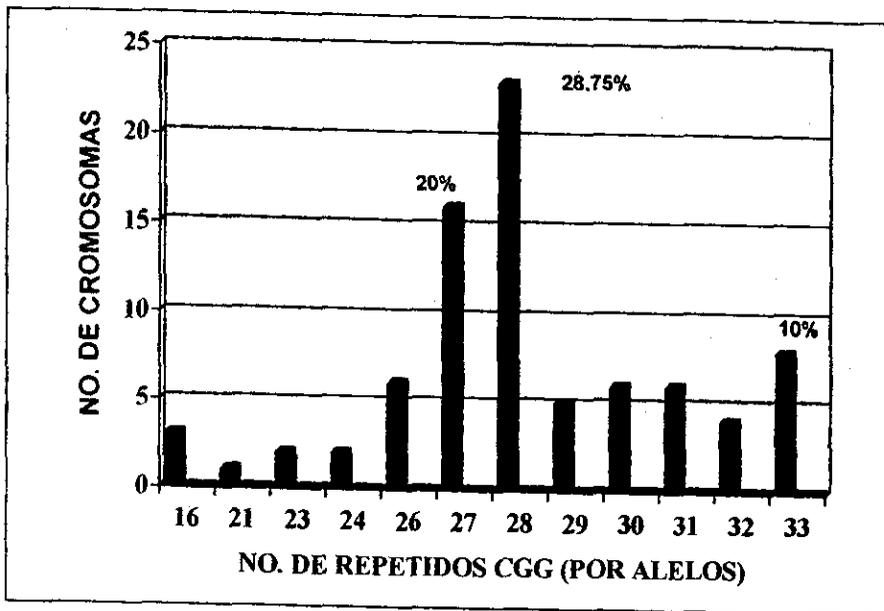


Fig. 8 AMPLIFICACION DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMR1 POR PCR NO RADIOACTIVA. La amplificación se llevo a cabo con la enzima PFU DNA polimerasa, como se indica en métodos, el producto de la amplificación se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4% en TBE 1X a 150 volts. PM: marcador de peso molecular escalera de 100 pb. 26M: amplificación de 293 pb que corresponden a 27 repetidos en un individuo masculino. 27F: corresponde al amplificado de una mujer homocigota para el alelo de 28 repetidos. 29F y 32 F mujeres homocigotas con 29 repetidos. 33M: 333 pb que corresponden a 32 repetidos de un individuo masculino.



Gráfica 1. DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE LOS REPETIDOS CGG. En Y se observa el número de cromosomas para cada alelo y en X el número de repetidos CGG por alelo.

5.3 ESTUDIO MOLECULAR DE PACIENTES CON HISTORIA CLINICA COMPATIBLE CON EL SINDROME X FRAGIL.

A) ESTUDIO CLINICO DE LOS PACIENTES.

Se analizaron 18 pacientes del sexo masculino, que se clasificaron en 3 grupos de acuerdo a los antecedentes clínicos.

El grupo 1 está constituido por 3 pares de hermanos con retardo mental ligado al X y algunas características fenotípicas asociadas al síndrome (Tabla 1).

En el grupo 2 se incluyeron 6 pacientes con coeficiente intelectual limitrofe, sin antecedentes familiares de retardo mental, con estudio citogenético de sitio frágil FRAXA negativo (Tabla 2).

El grupo 3 corresponde a 6 pacientes con retardo mental variable, sin un patrón de herencia definido y con características clínicas compatibles con X frágil (Tabla 3).

B) DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LOS PACIENTES.

Mediante la técnica de Reverso Transcriptasa-PCR (RT-PCR) se determinó la presencia o ausencia del transcrito del gen FMR1 en el RNA total de los 18 pacientes en estudio. Como control interno se amplificó una región del transcrito del gen HPRT, como control positivo se utilizó el RNA total de individuos no afectados por el síndrome X frágil. Los productos esperados fueron de 387 pb para el HPRT y 146 pb para el FMR1.

En la figura 10 se muestra la fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en donde se observan los productos del RT-PCR. En el carril 1 se observa el producto

de amplificación de un individuo no afectado, utilizado como control positivo, el cual presenta los amplificadores de 146 pb (FMR1) y 387 pb (HPRT). En el carril 2 se observa el resultado del paciente X2, que presenta el transcrito del gen FMR1 de 146 pb. Como control de peso molecular se utilizó el plásmido pCU18 cortado con HaeIII.

Todos los pacientes del grupo 1 y 2 presentaron el transcrito del gen FMR1, así como también los del grupo 3 a excepción del paciente X16 que no presentó el transcrito del gen FMR1 (Fig. 11). Este resultado nos sugería la presencia de una mutación en el gen.

Para determinar si se trataba de una premutación o una mutación completa se amplificó el número de repetidos del gen FMR1 del paciente X16, utilizando la enzima PFU DNA polimerasa ya que ésta permite obtener un amplificado de hasta 150 repetidos aproximadamente. El resultado se observa en la figura 12, el carril 1F corresponde al amplificado de una mujer heterocigota para los alelos de 33 y 28 repetidos, que se utilizó como control positivo; en el carril 2M se observa el amplificado del paciente X15 que mostró un amplificado dentro de los límites normales, aproximadamente 27 repetidos, en el carril 4 se observa que el paciente X16 no mostró amplificación, lo que sugería la presencia de una mutación completa (aumento > 150 copias CGG) en el gen FMR1, el carril 5 corresponde a un control positivo de 27 repetidos de un individuo masculino.

Para descartar que la ausencia de amplificación se debiera a daño o degradación en el DNA de este paciente, se realizó una coamplificación con una región polimórfica de repetidos AC (RAC) del gen β - Globina humano (aproximadamente de 200 pb) y el gen FMR1. En la figura 13 se observa en el carril 1 el amplificado de una mujer heterocigota para el alelo de 33 y 28 repetidos, utilizado como control positivo, en el carril 2 el resultado del amplificado del paciente X16 en donde se observa únicamente la banda que corresponde a RAC, lo cual nos confirma que el DNA no está dañado. En el carril 3 se observa el PCR de repetidos CGG por separado, para confirmar la no amplificación en el paciente X16.

**TABLA 1. CARACTERISTICAS CLINICAS DE PACIENTES CON
RETARDO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA X.**

| CARACTERISTICAS | HERMANOS | | HERMANOS | | HERMANOS | |
|--|----------|----|----------|----|----------|----|
| | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 | X6 |
| EDAD EN AÑOS | 28 | 27 | 14 | 15 | 17 | 19 |
| CARA ALARGADA | + | + | - | - | + | + |
| PROGNATISMO | - | - | - | - | - | - |
| FRENTE PROMINENTE | + | + | + | + | - | - |
| PABELLOS AURICULARES PROMINENTES | - | - | - | - | - | - |
| CRISIS CONVULSIVAS | - | - | - | - | - | - |
| MACROORQUIDISMO | - | - | - | - | - | - |
| ESTUDIO CITOGENETICO | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

+ PRESENTE
 - AUSENTE
 ND NO DETERMINADO

TABLA 2. CARACTERISTICAS CLINICAS DE PACIENTES LIMITROFES NO EMPARENTADOS

| CARACTERISTICAS | X 7 | X 8 | X 9 | X 10 | X 11 | X 12 |
|----------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|
| EDAD EN AÑOS | 6 | 4 | 4 | 13 | 6 | 5 |
| I. Q | 70 | 75 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| PROGNATISMO | - | - | - | + | + | - |
| PROBLEMAS DE LENGUAJE | + | + | + | + | + | + |
| PABELLOS AURICULARES PROMINENTES | + | + | - | + | + | + |
| HIPERACTIVIDAD | - | + | + | - | + | - |
| AGRESIVIDAD | - | + | - | - | - | + |
| AUTISMO | - | + | + | - | - | + |
| MACROORQUIDISMO | - | - | - | - | - | - |
| ESTUDIO CITOGENETICO | N | N | N | N | N | N |

+ PRESENTE
 - AUSENTE
 N NEGATIVO

TABLA 3. CARACTERISTICAS DE PACIENTES CON RETARDO MENTAL SIN ANTECEDENTES FAMILIARES.

| CARACTERISTICAS | X 13 | X 14 | X15 | X 16 | X 17 | X 18 |
|----------------------------------|------|------|-----|------|------|------|
| EDAD EN AÑOS | 8 | 11 | 17 | | 12 | 6 |
| CARA ALARGADA | + | - | + | | - | + |
| PROGNATISMO | - | - | + | | - | - |
| FRENTE PROMINENTE | - | + | - | | - | + |
| PABELLOS AURICULARES PROMINENTES | - | - | + | | + | + |
| CRISIS CONVULSIVAS | + | - | - | | + | + |
| MACROORQUIDISMO | - | + | + | | - | - |
| ESTUDIO CITOGENETICO | ND | ND | N | | N | N |

+ PRESENTE
 - AUSENTE
 ND NO DETERMINADO
 N NEGATIVO

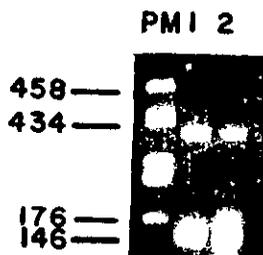


Fig.9 AMPLIFICACION DEL TRANSCRITO DEL GEN FMR1 EN INDIVIDUOS CON HISTORIA CLINICA DE X FRAGIL. El RT-PCR se realizó como se indica en métodos, se utilizó el transcrito del gen HPRT como control interno. El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2%. PM: marcador de peso molecular plásmido pUC18/HaeIII. Carril 1: control positivo, fragmento de 146 pb (FMR1) y 387pb (HPRT) de un individuo no afectado. Carril 2: paciente X2, se indica la banda de 146 pb.

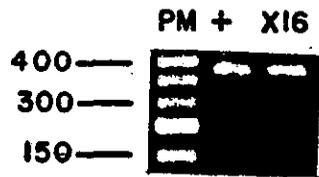


Fig. 10 AMPLIFICACION DEL TRANSCRITO DEL GEN FMRI EN INDIVIDUOS CON HISTORIA CLINICA DE X FRAGIL. El RT-PCR se realizó como se indica en métodos, se utilizó el transcrito del gen HPRT como control interno. El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2%. PM: marcador de peso molecular escalera de 50 pb. +: control positivo de un individuo no afectado. Carril 2: paciente X16 el cual presentó el fragmento de 387 pb (HPRT) pero no el de 146 pb correspondiente al transcrito del gen FMRI.

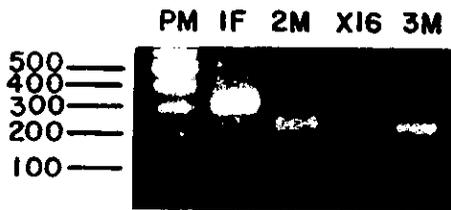


Fig. 11 AMPLIFICACIÓN DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMR1 POR PCR NO RADIOACTIVA. La amplificación se llevo a cabo con la enzima PFU DNA polimerasa, como se indica en métodos, el producto de la amplificación se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4% en TBE 1X a 150 volts. PM: marcador de peso molecular escalera de 100 pb. Carril 1F: mujer heterocigota para el alelo de 33 y 28 repetidos utilizado como control positivo. Carril 2M paciente X15 que corresponde a 27 repetidos. Carril 4: paciente X16, no presenta amplificación de repetidos. Carril 3M: control positivo de un individuo masculino con 27 repetidos.

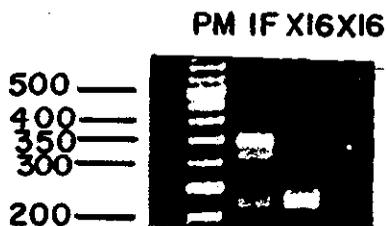


Fig. 12 COAMPLIFICACION DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMRI Y REPETIDOS AC (RAC) DEL GEN β -GLOBINA. El PCR se realizó como se indica en métodos, el producto de la coamplificación se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4% en TBE 1X. PM: marcador de peso molecular escalera de 50 pb. Carril 1F: mujer heterocigota para los alelos de 33 y 28 repetidos utilizado como control positivo, el fragmento de aproximadamente 200 pb corresponde a RAC. Carril 2: paciente X16 se observa únicamente el fragmento que corresponde a RAC. Carril 3: PCR de repetidos CGG confirmando la no amplificación en el DNA del paciente X16.

VI. DISCUSION

El síndrome del cromosoma X frágil es la causa más frecuente de retardo mental hereditario en humanos. En la mayoría de los casos la mutación responsable de la manifestación de este síndrome, es una expansión del número de trinucleótidos CGG (más de 200 copias) presentes en la región 5' del exon 1 del gen FMR1, seguida de una hipermetilación de los repetidos y de la región promotora del gen. El resultado de esta situación es la ausencia de la proteína FMRP codificada por este gen, lo que ocasiona el fenotipo X frágil.

Normalmente la secuencia de repetidos CGG varía de 6 a 50 copias en individuos no afectados y es altamente polimórfica en la población en general, existe un grupo de individuos con un número de repetidos de 52 a 193 copias (estado de premutación), éstos son portadores de la enfermedad, con un alto riesgo de tener descendientes afectados.

La correlación entre la longitud del número de repetidos y el fenotipo X frágil ha permitido el diagnóstico de individuos afectados y portadores de la enfermedad. Sin embargo las fronteras del número de repetidos entre individuos no afectados y con premutación no están definidos con precisión en las diversas poblaciones analizadas, siendo de gran importancia conocerlas ya que el riesgo de conversión al estado de mutación completa está relacionado directamente con el número de repetidos de la premutación.

En este estudio se determinó el polimorfismo de los repetidos CGG del gen FMR1 en 30 mujeres y 25 hombres sin antecedentes de X frágil, pertenecientes a la población mexicana. Esto se llevó acabo inicialmente con la técnica de PCR radioactiva, empleando un análogo de GTP (7-deaza-2'GTP) que impide la formación de estructuras secundarias ocasionadas por la expansión de los repetidos CGG, sin embargo se requiere la utilización de radioisótopos para la detección del amplificado, ya que el análogo de GTP no permite la tinción de la molécula de DNA con bromuro de etidio (19), además el número de amplificados está limitado al rango de alelo normal.

Posteriormente se utilizó la técnica de PCR no radioactiva, utilizando la enzima hipertermostable PFU DNA polimerasa, que permite utilizar temperaturas de desnaturalización mucho más altas, las cuales impiden la formación de estructuras secundarias, sin necesidad de utilizar el análogo de GTP y por consiguiente de radioisótopos. Además esta enzima permite obtener amplificadas de hasta 150 repetidos aproximadamente, es decir, valores en el límite de premutación, debido a que es una enzima hipertermostable y su velocidad de polimerización es mayor. Esta técnica permitió obtener el número preciso de repetidos CGG del gen FMRI en la población analizada, además de reducir costos y disminuir riesgos a la salud por la manipulación de radioisótopos.

Se analizaron un total de 85 cromosomas X, en donde se encontraron 12 alelos diferentes, con un rango de repetidos que varía de 16 a 33 copias, en donde los alelos más frecuentes fueron los de 28 repetidos (28.75%), 27 repetidos (20%) y 33 repetidos (10%), los demás alelos tuvieron una representación menor del 7% (Gráfica 1).

Aunque existe un consenso general sobre el número de repetidos en población normal (6-50 copias), hay algunas variaciones en los límites y en la media aritmética en diferentes poblaciones, sin que esto represente diferencias significativas en el polimorfismo de repetidos. La comparación de nuestros resultados con los datos reportados en otras poblaciones, permite observar que el número de repetidos y la frecuencia de los mismos es similar, ya que como se observa en la tabla 4, el número de repetidos en las poblaciones de caucásicos, asiáticos, australianos y japoneses varía de 6 a 54 copias, por lo tanto el polimorfismo encontrado en la población mexicana analizada (16 a 33 repetidos) está dentro de estos rangos, cabe mencionar que el alelo más frecuente en nuestra población fue el de 28 repetidos similar al encontrado en la población japonesa.

Se ha sugerido que en esta enfermedad no existen mutaciones *de novo* y que existe un grupo de cromosomas fundadores, que por causas que se ignoran, han favorecido la expansión de repetidos desde valores normales a premutación o mutación completa (21).

TABLA 4. POLIMORFISMO DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMR1 EN DIFERENTES POBLACIONES.

| POBLACION | ESTUDIO | REPETIDOS | ALELO FRECUENTE |
|--|--------------------------------------|------------------|---|
| CAUCASICOS, ASIATICOS. n= 292 | FU, et al. 1991 (19) | 6-54 | 29 |
| AUSTRALIANA n= 254 | JACOBS, et al. 1993 (39) | 5-49 | 29 |
| JAPONESA n= 849 | ARINAMI, et al. 1993 (37) | 15-46 | 28 (40.5%) 29 (30.8%) 35 (7.8%) |
| MEXICANA n=85 | ESTE ESTUDIO | 16-33 | 28 (28.7%) 27 (20 %) 33 (10 %) |

Con el análisis de las secuencias de los repetidos del gen FMR1, en diferentes poblaciones humanas, se ha sugerido que la secuencia ancestral relacionada con el síndrome fue una secuencia pura de CGG, carente de las interrupciones AGG. Esto plantea una posible explicación para la expansión de los repetidos, quizá la DNA polimerasa copia equivocadamente varias veces la misma secuencia de repetidos durante la replicación discontinua del DNA cuando no están presentes las interrupciones AGG. Recientemente se han descrito dos marcadores polimórficos de repeticiones AC, FRAXAC1 y FRAXAC2 que flanquean el gen FMR1, se ha sugerido que algunos haplotipos de FRAXAC1 y FRAXAC2 pueden estar asociados a regiones grandes de repetidos CGG y que estos haplotipos podrían conferir mayor inestabilidad al fragmento de repetidos, incrementándose la probabilidad de expansión. Por lo tanto la pérdida de un triplete AGG dentro de la secuencia de repetidos CGG puede ser un evento mutacional importante en la generación de predisposición a alelos inestables en el síndrome X frágil (34).

Actualmente se sabe que tanto un número grande de repetidos CGG como la ausencia de interrupciones AGG son los factores que provocan la inestabilidad y favorecen la expansión de los repetidos CGG. Los alelos con un número pequeño de repetidos y con una o dos interrupciones AGG se heredan de manera estable. De acuerdo con estos datos, en nuestros resultados se encontraron alelos con un número pequeño de hasta 33 repetidos, lo cual no representaría un riesgo de presentar inestabilidad en la descendencia inmediata, aún cuando faltaría por determinar las interrupciones AGG para poder sugerir la predisposición al X frágil en la población mexicana.

Estudios recientes en donde se analizó el tamaño de repetidos y la presencia o ausencia de interrupciones AGG en distintas poblaciones, sugieren que en las poblaciones americanas estudiadas, no existen los alelos que predisponen a la expansión de los repetidos CGG (35). La ausencia de estos mismos alelos en las poblaciones indígenas mexicanas (Zapotecos y Mixtecos), analizados también en estos estudios, sugiere que quizá el síndrome X frágil no existe en nuestras poblaciones indígenas y probablemente la

frecuencia de esta alteración hereditaria en la población mestiza mexicana sea más baja que la observada en otras poblaciones.

En México se desconoce la frecuencia de X frágil, pero se ha sugerido una frecuencia similar a la reportada en poblaciones europeas y anglosajonas dado el tipo de herencia ligado al cromosoma X, sin embargo, en informes recientes se ha considerado que esta enfermedad ha estado subdiagnosticada ya que se manifiesta con una expresión variable, principalmente en mujeres y la detección del sitio FRAXA por métodos citogenéticos conduce a errores diagnósticos, lo cual hace difícil la detección precisa de pacientes con este síndrome.

Debido a las dificultades en el diagnóstico de esta enfermedad, la implementación de las técnicas de Biología Molecular, nos han permitido establecer estrategias de diagnóstico para la identificación de los individuos afectados y de los portadores de la enfermedad.

En este trabajo se analizó una población de 18 pacientes con características clínicas compatibles con X frágil, mediante la técnica de RT-PCR, determinando la presencia o ausencia del transcrito del gen FMR1 para poder establecer el diagnóstico molecular de X frágil.

De los 18 pacientes, 6 (grupo 1, Tabla 1) tenían el diagnóstico de probable X frágil basados en su historia clínica, los antecedentes de retardo mental sugerían un patrón de herencia ligado al cromosoma X. A ninguno de los pacientes se les realizó estudio citogenético y mediante el análisis de RT-PCR se demostró la presencia del transcrito del gen FMR1, esto sugiere que su fenotipo no se debe a alteraciones en este gen.

Los pacientes del grupo 2 (Tabla 2) presentaban características fenotípicas compatibles con X frágil, aunque no presentaban retardo mental. Estos pacientes se analizaron debido a que se ha asociado la presencia de X frágil en poblaciones de pacientes limítrofes y autistas. Todos los pacientes presentaron estudio citogenético negativo para el sitio FRAXA y mediante el análisis de RT-PCR se demostró la presencia del transcrito del gen FMR1, por lo que se descartó el diagnóstico de X frágil.

En el grupo 3 (Tabla 3) se integraron pacientes con historia clínica de X frágil, sin antecedentes familiares de retardo mental. En ninguno de los 6 pacientes se documentó la presencia del sitio frágil por estudio citogenético, en 5 de ellos (X13, 14,15,17 y 18) se determinó la presencia del transcrito del gen FMR1, sin embargo el análisis de RT-PCR del paciente X16 mostró la ausencia del transcrito del gen (fig. 10), lo que sugiere la presencia de una mutación en FMR1.

En el análisis de PCR no radioactivo de este paciente, no se observó el amplificado de los repetidos CGG (fig. 11) lo que nos sugería un aumento en el número de repetidos mayor de 150 copias, probablemente en rangos de mutación completa, lo cual ocasiona la enfermedad en este paciente. Se corroboró mediante la amplificación de una región RAC del gen B-globina humano que el DNA de este paciente no estaba dañado.

Cabe mencionar que los 17 pacientes que presentaron el transcrito del gen FMR1, tenían características clínicas que sugerían X frágil y algunos presentaban antecedentes familiares de retardo mental, por lo tanto se debe considerar la posibilidad de que presenten X frágil por otro tipo de mutaciones que se han descrito en el gen FMR1, como son, mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o bien, que la causa de su fenotipo se deba a mutaciones en otros genes que también se manifiesten con retardo mental, probablemente en el sitio frágil FRAXE, el cual se ha asociado con alteraciones fenotípicas y coeficiente intelectual subnormal similar a X frágil.

Aunque la muestra poblacional es baja (n =18) la incidencia de X frágil en la población estudiada fue del 5% (1/18 pacientes), una incidencia similar se encontró en un estudio realizado en 386 individuos españoles con retardo mental, en donde 14 de ellos (3%) fueron X frágil positivo (36). Estos resultados nos sugieren que quizá la incidencia de X frágil en nuestra población sea baja o que al igual que en otras poblaciones exista un subdiagnóstico de la enfermedad.

Debido a que el X frágil es la causa principal de retardo mental hereditario, es conveniente ampliar el número de pacientes, para poder determinar la frecuencia de esta enfermedad en la población mexicana.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Arenas D, Peñalosa R, Salamanca F. (1998). Patología médica ocasionada por repetidos de trinucleótidos. *Gaceta Médica de México*. **134** (4). En prensa
2. Tarlenton, J. C. and R. A. Saul. (1993). Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J. Pediatrics*. **122** (2):169-185.
3. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld s, Kretz C, et al. (1991). Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N. Engl. J. Med*. **325**: 1673-1681.
4. Penrose, L. S. (1938). A clinical and genetics study of 1280 cases of mental defect. *Medical Research Council Special Reports Series*. **229**: 1373-1381.
5. Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet*. **21**:231-244.
6. Sutherland, G. R. (1977). Fragile sites on human chromosome: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*. **197**:265-266.
7. Oostra B, Jacky P, Brown W, Rousseau F. (1993). Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. *J. Med. Genet*. **30**:410-413.
8. Flynn, G. (1993). Identificación of the FRAXE fragile site in two families scertained for X linked mental retardation. *J. Med Genet*. **30**: 97-100.
9. Turner, G. (1997). The prevalence of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. **53**:23-27.
10. Sutherland, G. R. (1979). Heritable fragile sites on human chromosomes. III Detection of fra (x) (q27) in males with X-linked mental retardation and in their females relatives. *Am J Hum. Genet*. **53**:23-27.
11. Sutherland G, Baker E, Fratini A. (1985). Excess thymidine induces folate-sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet*. **22**:433-443.
12. Monaco. A. P. (1994). Isolation of genes from cloned DNA. *Curr. Op. Genet. Develop*. **4**:360-365.
13. Arveiler B, Oberle I, Vincent A, Hofker M, Pearson P. et al. (1988). Genetic mapping of the Xq27-28 region: new RFLP markers useful for diagnostic applications in fragile X and hemophilia B families. *Am. J. Hum. Genet*. **42**:380-389.
14. Verkerk, A. et al. (1991). Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. **65**:905-914.

15. Eichler E, Richards S, Gibbs R, Nelson D. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 2 (8):1147-1153.
16. Reyniers E, Vits K, De Boule K, Van Roy V, Van Velzen D. et al. (1993). The full mutation in the FMR1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nature Genet.* 4:143-146.
17. Wohrle, D. (1993). Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nature Genet.* 4:1-3.
18. Meijer H, de Graaff E, Mercky D, Jongbloed R, de Die-Smulders C. et al. (1994). A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3: 615-620.
19. Fu Y, Kuhi D, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe J. et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 67:1047-1058.
20. Snow K, Tester D, Krucberg D, Schuid D, Thibodeau S. (1994). Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum. Mol. Genet* 3: 1543-1551.
21. Smits A, Dreesen J, Post J, Smeets D, de Die-Smulders D. et al. (1993). The fragile X syndrome. *J. Med. Genet.* 30: 94-96.
22. Ashley C, Wilkinson D, Reines D, Warren S. (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262: 563-566.
23. Siomi H, Siomi M, Nussbaum R, Dreyfuss G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74: 291-298.
24. Wohrle D, Kotzot D, Hirst M. (1992). A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR1 gene and the fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 51:299-306.
25. Gedeon A, Vaker E, Robinson H, Partington M, Gross B. (1992). Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genet.* 1:341-344.
26. Hinds H, Ashley C, Sutdiff J, Nelson D, Warron S (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genetics.* 3:36-43.
27. Pieretti M, Zhang F, Fu Y, Warren S, Oostra B. et al. (1991). Absence of expression of the FMR1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 66:817-822.
28. Siomi H, Choi M, Siomi M, Nussbaum R, Dreyfuss G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: Impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell.* 77:33-39.

29. De Boulle K, Verkerd A, Reyniers E, Vits K, Hendricky J. et al. (1993). A point mutation in the FMR1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* 3: 31-35.
30. Verheij C, de Graaff E, Bakker C, Willemsen R, Willems J. et al. (1995). Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Human Molecular Genetics*, 4 (5): 895-901.
31. Siomi M, Siomi H, Suer W, Srnivasan S, Nussbaum R. et al. (1995). FXR1, an autosomal homology of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J.* 14:2401-2408.
32. Kempter, B. (1992). Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG.* 8:7-8.
33. Chomczynski, P. (1992). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
34. Avendano J, Aspillaga M, Blanco R. (1996). Molecular and genetic features of fragile X syndrome. *Rev Med Chil.* 124(7): 865-872.
35. Kunst C, Zerylnick C, Karckhoff L, Eichler E, Bullard J. (1996). FMR1 in Global populations. *Am. J. Hum. Genet* 58:13-22.
36. Pascual P, García M, Lucas M. (1995). A study of the fragile X syndrome among the employees of the Spanish National Telephone Company. *Rev Neurol.* 23 (121): 644-647.
37. Arinami T, Asan M, Kobayashi K. (1993). Data on the CGG repeat at the fragile X site in the nonretarded Japanese population and family suggest the presence of a subgroup of normal alleles predisposing to mutate. *Hum. Genet.* 92:431-436.
38. Chong, S. et al. (1994). *Am. J. Med. Genet.* 51: 522-526.
39. Jacobs, P. et al. (1993). Population studies of the fragile X: a molecular approach. *J. Med Genet.* 30:454-460.