



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**ESTUDIO DE REPETIDOS CGG DEL GEN FMR1  
EN POBLACIÓN MEXICANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

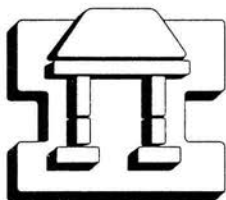
**B I O L O G O**

P R E S E N T A:

**OCAMPO SÁNCHEZ JULIO CÉSAR**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**



**IZTACALA LOS REYES IZTACALA, EDO DE MÉXICO**

**2002**



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.

*La grandeza del hombre  
consiste en que carga  
con su destino como Atlas  
cargaba con la esfera celeste  
a sus espaldas.*

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Diego Julio Arenas Aranda** y al **Dr. Fabio Salamanca Gómez**, por permitirme integrarme a su grupo de investigación, además de su paciencia y confianza.

A mis sinodales, **Dr. Sergio Vaca Pacheco**, **Dr. Jorge Campos Contreras**, **Dr. Erasmo Negrete Abascal**, **Dr. Martha Martínez García** y **Dr. Diego Julio Arenas Aranda** por sus observaciones y sugerencias constructivas para la realización de este trabajo.

A mi familia que me apoya constantemente en especial a mi mamá **Susana Sánchez**, **mi abuelita Lupita** y a mis hermanos **Mariela** y **Eduardo**, ya que sin ellos hubiera sido imposible realizar mi carrera.

A mis compañeros del laboratorio ya que gracias a sus consejos y orientaciones logre terminar esta tesis en especial a la **Dr. Xochilt Félix**, **Dr. Rafael Martínez**, **Dr. Carmen Mora** y al **M. en C. Normand García**.

Y a todos mis amigos y compañeros tanto de la UNAM como del IPN que han estado conmigo en las distintas facetas de mi vida ayudándome y aconsejándome en especial a **Almendra**, **Ericka**, **Elizabeth**, **Mirna**, **América**, **Gisela**, **Juanita**, **Lupita**, **Marcos**, **Mariano**, **Rafael** y **Normand**.

# INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
2.1 Síndrome X frágil.....	2
2.2 Antecedentes.....	4
2.3 Manifestaciones Clínicas.....	5
2.4 Frecuencia.....	7
2.5 Gen FMR1.....	7
2.6 Proteína del gen FMR1.....	8
2.7 Herencia.....	9
OBJETIVOS.....	12
METODOLOGÍA	
4.1 Origen de la muestra.....	13
4.2 Obtención del DNA.....	13
4.3 Determinación de los repetidos de CGG.....	14
RESULTADOS	
5.1 Cuantificación y Recolección del DNA.....	15
5.2 Amplificación de los repetidos de CGG.....	15
DISCUSIÓN.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	24

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Cromosomas sexuales de una mujer y un hombre con sitio frágil en Xq 27.7.....	4
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del gen FMR1 localizado en el cromosoma X.....	7
<b>Figura 3.</b> Modelo de la localización de la proteína del gen FMR1.....	8
<b>Figura 4.</b> Árbol genealógico del síndrome de X frágil.....	9
<b>Figura 5.</b> Expansión de tripletes de CGG en el exón 1.....	10
<b>Figura 6.</b> Amplificación de repetidos de CGG del gen FMR1 en geles de agarosa al 4%.....	16
<b>Figura 7.</b> Amplificación de repetidos de CGG del gen FMR1 en geles de agarosa al 4%.....	16
<b>Figura 8.</b> Amplificación de repetidos de CGG en geles de poliacrilamida al 6 %.....	17
<b>Figura 9.</b> Amplificación de repetidos de CGG en geles de poliacrilamida al 6 %.....	18
<b>Figura 10.</b> Frecuencias alelicas de repetidos de CGG en la población mundial y mexicana.....	21

# Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Rasgos clínicos en varones con síndrome de X frágil.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Frecuencia de repetidos de CGG encontrados en una muestra de la población mexicana sin síndrome de X frágil.....	19
<b>Cuadro 3.</b> Frecuencias alélicas de distintas poblaciones a nivel mundial.....	20

# RESUMEN

Un síndrome, es un conjunto de signos y síntomas que existen al mismo tiempo y que definen clínicamente un estado de enfermedad. En la gran mayoría de los casos las alteraciones son a causa de fallas en algún grupo de genes, que por expresarse demasiado ó simplemente no expresarse produce un daño.

El síndrome de X frágil es una de las enfermedades genéticas hereditarias más frecuente en el ser humano. Esta es resultado de una expansión en el número de repetidos de CGG en la región 5' en el exón 1 del gen FMR1. Esta región de repetidos de CGG en individuos no afectados por el síndrome es altamente polimórfica y presenta valores que van desde los 6 hasta los 54 repetidos, pero cuando es superado este número de repetidos se crea un problema ya que se favorece la inestabilidad de la región de CGG, la cual provoca que en la siguiente generación se presente una premutación o mutación completa, la cual está asociada a la enfermedad.

En la actualidad los límites del número repetidos de CGG en los individuos sin X frágil no se encuentran totalmente definidos, lo cual acarrea un problema si se quiere saber el riesgo de una persona a transmitir a sus descendientes la premutación o incluso la enfermedad. Por lo anterior en este estudio se determinó el polimorfismo de los repetidos de CGG, en individuos no afectados pertenecientes a una muestra de la población mexicana, mediante la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).

De 130 cromosomas analizados se obtuvieron un total de 28 alelos diferentes y que abarcan desde 6 hasta 54 repetidos de CGG. Los alelos más frecuentes fueron los de 29, 30 y 35 repetidos. La muestra de la población analizada tuvo una mayor similitud con las poblaciones Asiáticas.



# INTRODUCCION

## EL SINDROME X FRAGIL.

El genoma humano está constituido por unos 3000 millones de nucleótidos que conforman al DNA. Se estima que solamente un 3 al 5% de éstos forman parte de los genes, los planos maestros que la célula utiliza para construir sus proteínas. A las secuencias restantes de pares de bases les competen en el hombre y en otros muchos organismos funciones muy importantes como el promover la activación o inactivación de los genes. Aun así queda una buena parte de DNA en la cual no se conoce su función y por lo tanto algunos le llaman DNA inservible ( Moxon y Willis., 1999).

En este DNA que aparentemente no tiene función alguna existen secuencias repetidas de nucleótidos, siendo los segmentos más cortos de estas repeticiones, llamados microsátélites, los que encierran un interés muy superior al que cabría deducir de su tamaño ( Moxon y Willis., 1999).

Se ha observado que algunos de los microsátélites pueden aumentar o disminuir en longitud y que estos cambios pueden acarrear alteraciones para los organismos portadores. Por ejemplo, en el hombre la expansión de estos microsátélites esta asociada a diversas enfermedades neurológicas como es el caso del síndrome del X frágil, la segunda causa genética de retraso mental solamente superado por el Síndrome de Down. Las mutaciones inestables o amplificación de tripletes constituyen un nuevo tipo de alteración genética descubiertas durante la última década (Christopher y Huda., 2000).

En condiciones normales, regiones específicas de algunos genes están constituidas por repeticiones de tripletes de nucleótidos, que no alteran su función, pero cuando la cantidad de estas repeticiones aumenta, se modifica la expresión de estos genes, ocasionando la inactivación de genes, alteraciones del transporte de los RNAm ó la síntesis de un nuevo producto con funciones diferentes a la proteína original. Estas secuencias son inestables porque aumentan su número durante la meiosis o mitosis (Yu *et al.*, 1991).

Las enfermedades asociadas a la expansión de tripletes de repetidos afectan al sistema nervioso, son degenerativas y se caracterizan por manifestar el fenómeno de anticipación, el cual consiste en una manifestación clínica más severa a edades más tempranas. La severidad de los síntomas correlaciona en la mayoría de los casos con la cantidad de repeticiones de tripletes (Christopher y Huda., 2000).

En los seres humanos se han caracterizado hasta el momento catorce padecimientos agrupados en cuatro tipos diferentes de expansiones de tripletes:

1. Tripletes CAG localizados en el extremo 5' de la región codificadora de diversos genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas (Corea de Huntington y Ataxias espinocerebelares).
2. Los repetidos de CTG se encuentran en la región 3' que no se traduce (UTR 3') del gen relacionado a la distrofia miotónica.
3. Los tripletes GAA localizados en el intrón 1 del gen X25 implicado en la ataxia de Friedreich.
4. Las secuencias CGG se encuentran en las regiones no codificadoras de los extremos 5' (UTR 5') de varios genes y cuando se expanden están asociadas a sitios frágiles en diversos cromosomas. Uno de estos genes el FMR1 está asociado al Síndrome del cromosoma X frágil, el retraso mental hereditario más frecuente en los humanos (Arenas *et al.*, 1998).

# ANTECEDENTES

Penrose en 1938 encontró en un estudio de deficientes mentales un exceso de pacientes de sexo masculino lo cual lo correlacionó con una herencia ligada al cromosoma X. Por otra parte Martín y Bell, publicaron en 1943 la asociación entre retraso mental y algunas características fenotípicas como son orejas largas, macroorquidismo y cara alargada, en varones de familias afectadas, en donde las mujeres no estaban excluidas del retraso, aunque eran menos las afectadas y con un retraso menos severo. Por esta razón histórica, durante un tiempo se le denominó al síndrome de X frágil como Síndrome de Martín y Bell (Southerland G., 1977).

El Síndrome del cromosoma X frágil, también conocido como Síndrome FRAXA, FMR-1 o SXF, fue descubierto en el año 1968 cuando Lubs, describió la asociación entre la deficiencia mental presente en varones y una alteración citogenética consistente en unos "satélites" en la parte distal del brazo largo del cromosoma X (Fig. 1). Siendo así el autor que sentó las bases citogenéticas para su diagnóstico. Este hallazgo, era en realidad una pérdida de condensación en esa zona del cromosoma. La presencia del DNA satélite permitió definir esta patología como Deficiencia Mental ligada al cromosoma X Frágil (FRAXA), Xq27 (brazo largo, banda 27). El estudio citogenético desarrollado por Lubs no es totalmente informativo ya que solamente un 40 % de los individuos con este síndrome presentan la fragilidad y no permite diagnosticar a las posibles portadoras (Tarlenton y Salud., 1993).

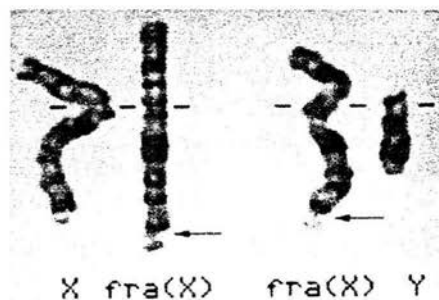


FIGURA 1. Cromosomas sexuales de una mujer y un hombre con sitio frágil en q27.3. Las flechas indican el sitio frágil y las líneas horizontales la posición del centrómero.

(Tomado de Lubs H., 1969).

Sin embargo, el hallazgo de Lubs quedó dormido durante años, pues hasta 1976 se redescubre con la publicación de Giraud, y un año después con la de Southerland y Harvey, aunque sin elucidarse, la causa íntima de la rotura del cromosoma y de los hechos clínicos (Meijer *et al.*, 1994).

Fue a partir de entonces cuando se multiplicaron las publicaciones de este síndrome y rápidamente se llegó a la conclusión de ser la causa más frecuente del retraso mental hereditario y la más común de todas después del Síndrome de Down.

## MANIFESTACIONES CLINICAS

Las manifestaciones clínicas son rara vez apreciables antes del año de vida y en tal caso, solamente en forma de retraso en el desarrollo psicomotor, no grave inicialmente, pero sí progresivo, pues su capacidad mental va disminuyendo para llegar en la vida adulta a grados habitualmente severos o moderados. En el caso de los rasgos físicos los más característicos son las orejas grandes y despegadas, la cara alargada con mentón prominente y asimetría facial (Curfs *et al.*, 1991).

Junto a la deficiencia mental de grado variable (habitualmente con IQ entre 40 y 60) (Turner *et al.*, 1986) también se encuentra, hipercinesia: "no pueden estar quietos" (75% de ellos); siendo frecuentes el aletear las manos o mordérselas en situaciones de nerviosismo (ambiente ruidoso, multitudes); la falta de atención: "se distraen con cualquier cosa" (en el 100%); la ecolalia "el lenguaje repetitivo" (60% de pacientes) y verborreico "la risa inmotivada" (hilaridad a "flor de piel"); la gran sociabilidad pero sin contacto físico y con "timidez": mirada huidiza. (Ribacoba *et al.*, 1995).

Ocasionalmente (aproximadamente un 15% de pacientes) tienen un comportamiento autista (Gillberg G., 1985), aunque se puede dar incluso en la misma familia, afectados con extroversión y otros con autismo. (Tarleton y Saul., 1993).

Desde el punto de vista histológico el hecho más llamativo encontrado en el sistema nervioso central son las anomalías dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza. También se ha comprobado que la incidencia de otitis media es superior a la esperada, así como los trastornos oculares (estrabismo y defectos de refracción fundamentalmente) y de mayor frecuencia la muerte súbita del lactante, siendo una de sus causas el reflujo gastro-esofágico (Fryns J., 1988).

En la edad pediátrica, los rasgos clínicos más sugerentes están constituidos por la asociación de: Retraso mental, déficit de atención e Hiperactividad. En las familias con antecedentes de esta enfermedad, el déficit mental es predominante en varones. Por otro lado las mujeres afectadas por el síndrome, suelen presentar un leve retraso mental, problemas de atención pero sin hiperactividad y lo más frecuente es la timidez que puede ser profunda en la adolescencia, pudiendo llevar a depresión (Cuadro 1) (Fernández *et al.*, 2001).

**CUADRO 1. RASGOS CLINICOS EN VARONES CON SINDROME FRAXA  
(Tarleton y Saul., 1993)**

<b>Retraso en el desarrollo psíquico y motor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Andar: 20.6 meses</li> <li>• Primeras palabras con significado: 20 meses</li> </ul>
<b>Prepubertad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteraciones del Lenguaje</li> <li>• Hiperactividad, poca atención, autismo.</li> <li>• Cara alargada, frente amplia, orejas grandes, mandíbula prominente</li> </ul>
<b>Pospubertad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macroorquidismo</li> <li>• Timidez</li> <li>• Estrabismo</li> <li>• Hiperextensibilidad articular, pies planos</li> <li>• Distracción y aislamiento.</li> </ul>
<b>Otros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prolapso de la válvula mitral</li> <li>• Piel usualmente suave y blanda</li> </ul>

# FRECUENCIA

Las cifras de incidencia en la población convierten al Síndrome X Frágil en la primera causa hereditaria de retraso mental y la segunda cromosopatía en frecuencia después del Síndrome de Down.

Aunque en nuestro país no existe una estadística al respecto, se estima que la frecuencia de este Síndrome es de 1 de cada 1250 nacimientos en hombres y de 1 de cada 2500 nacimientos en mujeres (Tarleton *et al.*, 1993). La frecuencia de portadores en la población general se calcula de 1 en cada 886 individuos. Sin embargo, Turner y col. (1997) consideran que esta enfermedad ha estado subestimada debido a la dificultad en su diagnóstico, reportando una frecuencia de 1 de cada 4000 nacimientos.

# GEN FMR1

En 1991, tres grupos simultáneamente describen el defecto molecular que origina el Síndrome de X Frágil (Verkerk *et al.*, 1991; Oberlé *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). El gen FMR1 asociado a este padecimiento se localiza en el locus FRAXA en la banda q27.3 del cromosoma X, tiene una longitud de 38 kb, con 17 exones y expresa un RNAm de 4 kb. Este gen codifica una proteína llamada FMRP, ausente o muy disminuida en los individuos afectados. Esto es debido a que la expansión anómala de los tripletes de CGG, está asociada a la hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen FMR1, lo que ocasiona la inhibición transcripcional del gen (Fig. 2).

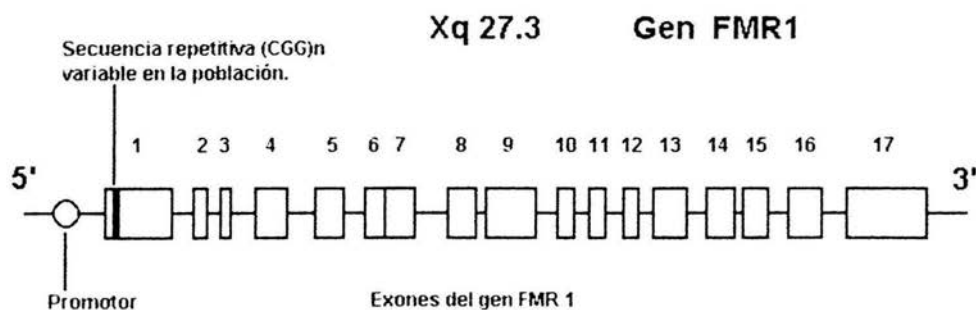


FIGURA 2. Representación esquemática del gen FMR1, localizado en el cromosoma X (Glover *et al.*, 2001)

# PROTEINA DEL GEN FMR1

El gen FMR1 codifica para una familia de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (FMRP's) (Ashley *et al.*, 1993). Estas proteínas se localizan principalmente en el citoplasma, aunque también se han detectado en el núcleo. Recientemente se demostró que una isoforma de estas proteínas presenta una señal de localización nuclear (NLS), como una señal de exportación nuclear (NES), que le permite salir al citoplasma y asociarse con la subunidad ligera del ribosoma, lo que sugiere un posible papel en el inicio de la traducción, ver figura 3 (Bontekoe *et al.*, 2001).

Esta familia de proteínas se han localizado en diversos órganos y tejidos como el sistema nervioso central y en las gónadas (Peng y Stephen ., 2000).

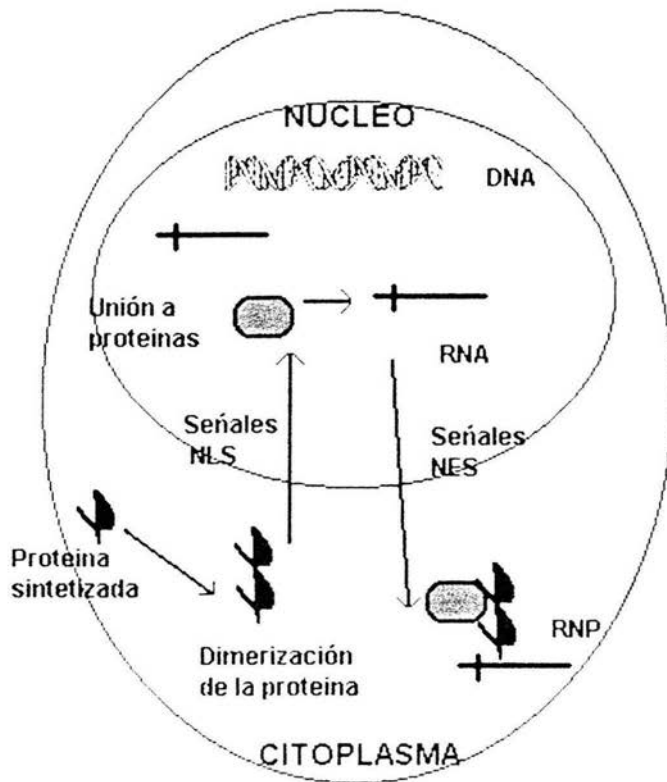


FIGURA 3. Modelo especulativo de la localización de la proteína del gen FMR1.

# HERENCIA

IZT.

Inicialmente se consideraba que el Síndrome de X frágil era una enfermedad recesiva ligada al X, con varones afectados y mujeres transmisoras. Sin embargo, pronto se observaron árboles familiares en los que había hombres transmisores, así como mujeres que padecían en mayor o menor grado la enfermedad. Pues bien, esto es debido a que la expansión anómala del triplete de CGG se desarrolla en dos etapas: Una primera que se denomina premutación en la que tanto mujeres como hombres son transmisores con inteligencia normal, y una segunda etapa denominada, mutación completa, en la que todos los varones presentan retraso mental, y aproximadamente un 59% de las mujeres (Oberle *et al.*, 1991). Es por ello que se considera hoy en día el Síndrome de X frágil como una enfermedad dominante con penetrancia incompleta ( Fig. 4 ).

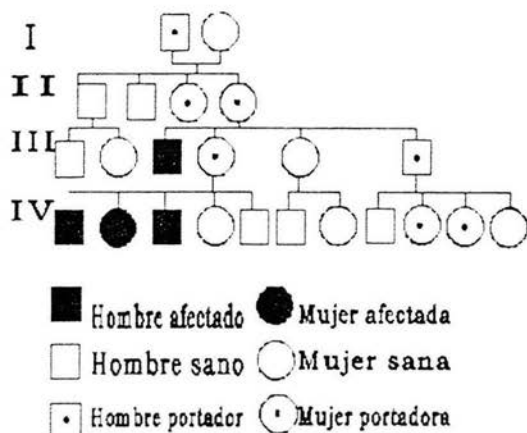


FIGURA 4. Árbol genealógico del Síndrome X Frágil.

En el exón 1 del gen FMR 1, existe una secuencia altamente polimórfica de repetidos CGG interrumpidos por tripletes de AGG en diversas posiciones, que varía en población no afectada entre 6 a 54 copias (figura 5). La variación en el número de repetidos constituye un polimorfismo genético heredado de manera estable. Cuando el número de repetidos de CGG es de 54 a 200 copias, se adquiere una inestabilidad tanto a nivel miótico como mitótico, de forma que, cada vez que las células se dividen, el número de repetidos de CGG aumenta ó disminuye. Los individuos que se encuentran en esta condición no manifiestan ninguna alteración fenotípica por lo que se denominan individuos con premutación. (Peng y Stephen., 2000).



Sin embargo, existe una gran diferencia entre los mujeres y hombres con premutación ya que las primeras sufren una gran inestabilidad en sus células germinales pasando a su descendencia un número mayor de repeticiones del triplete CGG del que poseían alcanzando 230 o más repeticiones (Fu *et al.*, 1991).

En estos casos que se conocen como mutación completa y que corresponden a más de 200 repeticiones se produce una metilación de la isla CpG que se localiza en la región promotora, aproximadamente a 250 pb del extremo 5' de los repeticiones. Esto ocasiona la inhibición de la transcripción del gen FMR1 (Verkerk *et al.*, 1991).

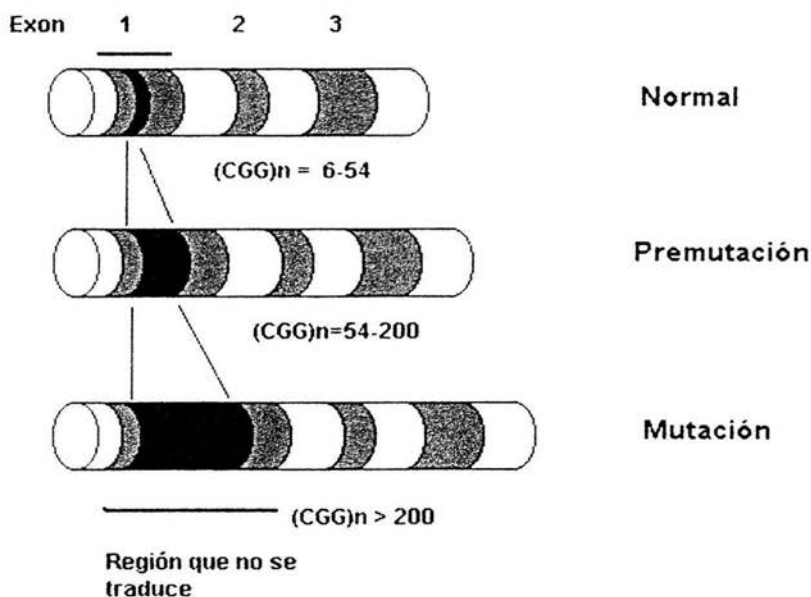


FIGURA 5. Esquema del gen FMR-1 y la expansión de tripletes de CGG en el exón 1.

Existen otras causas mutacionales diferentes a la expansión de los repetidos de tripletes de CGG, que están asociadas con el Síndrome de X frágil. En un pequeño número de pacientes que manifiestan la enfermedad, se ha detectado la existencia de eliminaciones totales o parciales del gen FMR1 y mutaciones puntuales que afectan los dominios funcionales de la proteína (Gedeon *et al.*, 1992). Estas mutaciones no relacionadas con la expansión de repetidos de trinucleotidos confirman que el gen FMR1 es el responsable del Síndrome de X frágil (Wohrle *et al.*, 1992).

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. Ya que no se han descrito mutaciones *de novo* 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 (Tarleton y Salud., 1993).

Actualmente se considera que hay al menos tres factores que puede influir en la expansión de los repetidos del gen FMR1. El número de repetidos, las secuencias genómicas que flanquean al gen FMR-1 y la distribución de las interrupciones AGG (Feng *et al.*, 1995).

En la actualidad los límites del número de repetidos de CGG en los individuos sin X frágil no están totalmente definidos lo cual acarrea un problema si se quiere saber el riesgo de una persona a transmitir a sus descendientes la premutación o incluso la enfermedad, todo esto es debido principalmente a que no se cuenta con los estudios y por tanto los datos suficientes de la composición genética del gen FMR1 con respecto a cada población. Aunado a esto la detección de la enfermedad es un problema ya que el estudio citogenético para la detección del sitio FRAXA no es preciso.

## **OBJETIVO**

Determinar el polimorfismo de repetidos (CGG)<sub>n</sub> del gen FMR-1 en individuos pertenecientes a la población mexicana, no afectada por el síndrome X frágil.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Obtener una colección de DNA genómico de individuos mexicanos no emparentados y sin antecedentes de X frágil.
  
- Establecer mediante amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) el número de repetidos (CGG)<sub>n</sub> del gen FMR-1, en individuos no afectados pertenecientes a la población mexicana.
  
- Determinar la frecuencia de los repetidos de (CGG)<sub>n</sub> en la muestra estudiada y establecer su relación con otras poblaciones mundiales.

# METODOLOGIA

## Origen de la muestra.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 62 hombres y 34 mujeres, pertenecientes a la población mexicana. Estas muestras se obtuvieron del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y de la FES Iztacala UNAM. Las muestras correspondieron a individuos sanos no emparentados entre sí con padres y abuelos nacidos en nuestro país.

La identificación y selección de las personas a participar en el estudio se realizó bajo los criterios del test de Fernández Carvajal (2001) para sospecha de síndrome de X frágil, que consiste en no tener antecedentes de familiares con retraso mental, rasgos físicos como son cara alargada, orejas grandes, conducta autista y falta de atención, además de ser personas mayores de 18 años y tener alguna actividad laboral o estudiantil.

## Obtención del DNA.

A partir de sangre periférica de individuos pertenecientes a la población Mexicana se obtuvo el DNA mediante el método descrito por Kempter (1992). El cual consiste en colocar a 15 ml de sangre, 2.5 ml de anticoagulante ( EDTA al 0.5% a pH 7.6) y centrifugar a 3000 r.p.m. 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 10 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 10 mM), posteriormente se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 10 min., eliminando el sobrenadante, repitiendo el paso anterior hasta que la pastilla se encontró con una tonalidad blanquecina. La pastilla se resuspendió en 886 µl de NaCl 5 mM agitando fuertemente y se le agregó 46 µl de SDS al 10 % y 308 µl de NaCl saturado, agitándose durante 5 min. posteriormente se centrifugó por 15 min. a 15 000 r.p.m, con la finalidad de remover las proteínas precipitadas en la solución. Se decantó el sobrenadante en tubos Eppendorff y se sometió a extracciones fenolicas (25:24:1 fenol:cloroformo:isoamílico ) agitándose y centrifugándose por 5min a 5000 r.p.m.

El DNA presente en la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se precipitó con un volumen de isopropanol. Se centrifugó nuevamente por 5 min. a 10 000 r.p.m. y se lavó la pastilla en dos ocasiones con etanol 70% centrifugándose a 15 000 r.p.m. durante 5 min. y se resuspendió la pastilla en 100 µl de ddH<sub>2</sub>O y se almacenó a -20°C.

La concentración y grado de pureza del DNA se determinó por medio de espectrofotometría a 260 nm y la pureza de la solución del DNA mediante el cociente 260/280 (Sambrook *et al.*, 1989).

La integridad del DNA se determinó en geles de agarosa al 1 % en TBE 1X ( Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM ), con 5 µl de bromuro de etidio. Una vez terminada la electroforesis se observaron los geles en un transiluminador de UV de onda corta y se tomaron las imágenes con el sistema de computo Alphamager 2000.

## **DETERMINACION DE REPETIDOS DE CGG**

La reacción en cadena de la polimerasa para los repetidos CGG del gen FMR1 se realizó con base al método descrito por Chong y col. (1994) en donde se empleó la enzima polimerasa termoestable PFU (Stratagene), para la amplificación de los repetidos de CGG mientras que las secuencias de los oligonucleotidos fueron tomadas de los trabajos descritos por Fu y col. (1991), y que consisten en:

- FMRX1 5' GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT3'.
- FMRX2 5' AGCCCCGCACTTCCACCACCAACTCCTCCA3'.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando solución amortiguadora PFU 1X, 0.3 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada oligonucleotido, 5% de dimetil sulfoxido (DMSO), 1 U. de PFU DNA polimerasa (Stratagene) y 200 ng de DNA problema, llegando a un volumen final de 10 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) 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, se tomaron alícuotas las cuales se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%. y en geles de poliacrilamida al 6 % los cuales se prepararon con 7.5 ml de una solución "stock" de poliacrilamida al 40 % ( acrilamida/bisacrilamida 30:1), 5 ml de TBE 5 X, 25 ml de agua desionizada, 0.4 ml de persulfato de amonio al 10 % y 30 µl de N,N,N',N'-tetrametiletileno diamida (TEMED). El tamaño de los productos amplificados se definió con los marcadores escaleras de 50 pb y 123 pb (SIGMA).

# RESULTADOS

## Cuantificación y Recolección del DNA

Se obtuvieron 96 muestras sanguíneas, 62 correspondieron a hombres y 34 mujeres, sin retraso mental ni parentesco entre sí. Obteniéndose de esta manera un total de 130 cromosomas X.

Para la extracción del DNA se utilizó el método de Kempter según se describe en métodos, extrayéndose el DNA de los linfocitos de sangre periférica. Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 200 a 300 ng/ $\mu$ l con un índice de pureza de 1.8 a 2 ( 260/280 ).

## Amplificación de repetidos de CGG.

El número de repetidos CGG en el gen FMR1 se determinó mediante la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) la cual utilizó los oligonucleotidos FMRX1 y FMRX2 que flanquean la región polimorfica de tripletes de CGG, del extremo 5' en el exón 1 del gen.

En la figura 6 se observa la fotografía de un gel de agarosa al 4 % con los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA de diversos individuos pertenecientes a la población mexicana. En el carril 1 y 2 se observan productos de 35 repetidos. En el carril 3 y 5, el producto fue de 37 repetidos. En el caso del carril 3 correspondió a una mujer homocigota, mientras que en el carril 5 fue de un hombre. En los carriles 4 y 6 no existió amplificación de las muestras de estudio. El tamaño de los repetidos de CGG, se determinó mediante la suma de 30 pb (tamaño del oligonucleotido FMRX1), más 30 pb (tamaño del oligonucleotido FMRX2), más 91 pb (distancia entre el oligo FMRX1 y el primer repetido), más 70 pb (distancia entre el último repetido y el oligonucleotido FMRX2), más el número de pb de los repetidos de CGG amplificados.

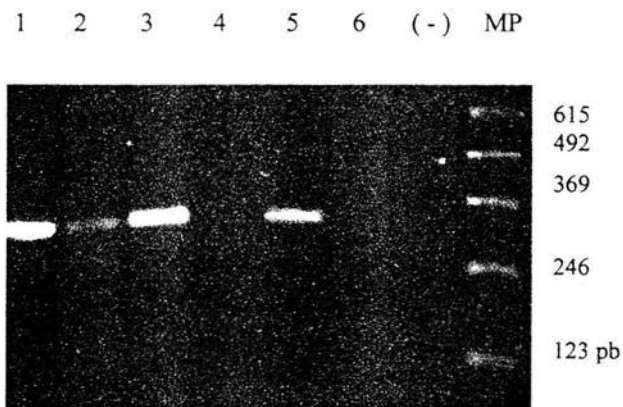


FIGURA 6. AMPLIFICACION DE LOS REPETIDOS DEL GEN FMR1. Los productos obtenidos del PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 4%. En los carriles se muestran distintos alelos. (-) = control negativo, MP = marcador de peso molecular, escalera de 123 pb.

En la figura 7 se observa un gel de agarosa al 4 % con el producto de la amplificación de repetidos de CGG y que corresponden para el primer carril a una mujer homocigota con 20 repetidos, mientras que en el carril 2 corresponde a un hombre con 20 repetidos. En el carril 3 se observa el producto de un hombre con 22 repetidos y por ultimo en el carril 5 el de una mujer homocigota con 18 repetidos.

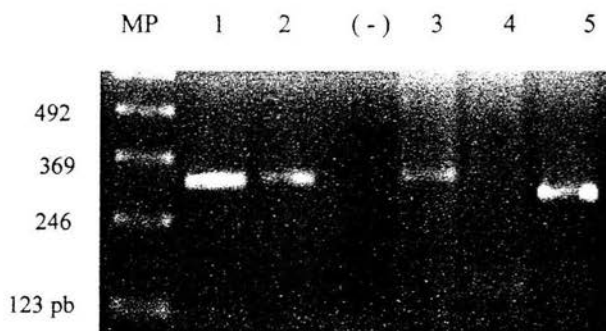


FIGURA 7. AMPLIFICACION DE LOS REPETIDOS DEL GEN FMR1. Productos obtenidos del PCR sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 4 %. En los carriles se muestran distintos alelos. (-) = control negativo, MP = marcador de peso molecular, escalera de 123 pb.

La figura 8 muestra la fotografía de un gel de poliacrilamida al 6 % en el cual se observan diversos productos amplificados correspondientes a los repetidos de CGG perteneciente a una muestra de la población mexicana no afectada por el síndrome. En el carril 1 se observa un producto de 40 repetidos perteneciente a un individuo del sexo masculino. En el carril 2 se observa el producto de un amplificado de 39 repetidos, también de un individuo del sexo masculino. En los carriles 3 y 4 corresponden a mujeres homocigotas con 39 y 38 repetidos, por ultimo en el carril 6 se muestra el producto de la amplificación de los repetidos de CGG en una mujer heterocigota con 34 y 38 repetidos en cada uno de sus alelos

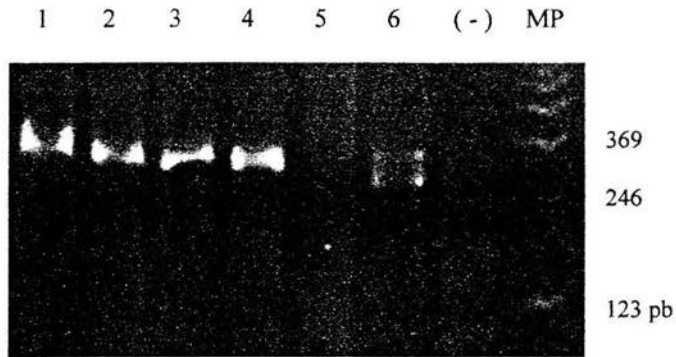


FIGURA 8 . AMPLIFICACION DE LOS REPETIDOS DEL GEN FMR1. Los productos obtenidos del PCR se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 6%. Los carriles muestran distintos alelos. (-) = control negativo, MP = marcador de peso molecular, escalera de 123 pb.



En la figura 9 se observa la fotografía de un gel de poliacrilamida al 6 %. En los carriles 1, 2 y 3 se observa un producto de 29 repetidos. Los productos de los carriles 2 y 3 corresponden a mujeres. El carril 4 corresponde a una mujer homocigota con 18 repetidos, en el carril 5 no existió amplificación de la muestra de DNA, mientras que el carril 6 pertenece a un individuo masculino con 24 repetidos.

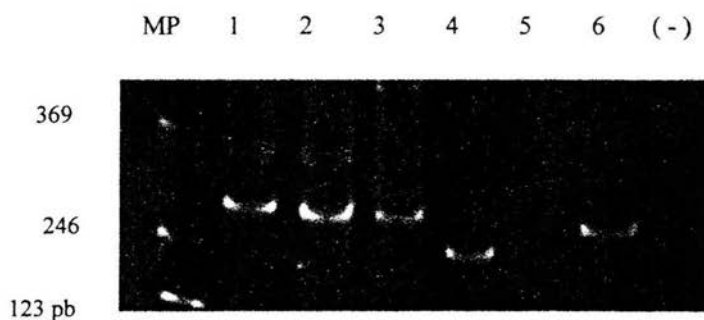


FIGURA 9. AMPLIFICACION DE LOS REPETIDOS DEL GEN FMR1. Los productos obtenidos del PCR se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 6%. Los carriles muestran distintos alelos. (-) = control negativo, MP = marcador de peso molecular, escalera de 123 pb.

De 130 cromosomas analizados se obtuvieron un total de 28 alelos diferentes y que abarcan desde 6 hasta 54 repetidos de CGG. Los alelos mas frecuentes fueron los de 29, 30 y 35 repetidos (cuadro 2).

CUADRO 2. Frecuencia de repetidos de CGG encontrados en una muestra de la población Mexicana sin síndrome de X frágil.

No. Repetidos de CGG	No. Alelos encontrados	Frecuencia Alélica
6	2	0.015
8	1	0.007
10	5	0.038
16	5	0.038
17	2	0.015
18	7	0.053
19	1	0.007
20	5	0.038
21	4	0.030
22	6	0.046
23	3	0.023
24	3	0.023
25	6	0.046
26	3	0.023
28	5	0.038
29	12	0.092
30	12	0.092
32	3	0.023
33	3	0.023
34	4	0.030
35	9	0.069
36	2	0.015
37	4	0.030
38	4	0.030
39	6	0.046
40	5	0.038
42	3	0.023
46	3	0.023
54	2	0.015

IZT.



U.N.A.M. FES  
IZTACALA

CUADRO 3. Frecuencias alélicas de distintas poblaciones a nivel mundial.

Alélicas	Poblaciones	Mataco	Navajos <sup>1</sup>	Mixtecos <sup>1</sup>	Mexicana <sup>2</sup>	Estudio <sup>3</sup>	Japonesa <sup>4</sup>	Tibetana <sup>4</sup>	Tunesina <sup>5</sup>	Arabes <sup>6</sup>	Ashkenazim <sup>6</sup>	Borneana <sup>6</sup>	Caucásica <sup>6</sup>	Mendeleka <sup>6</sup>	Wolof <sup>6</sup>	Afro-Am. <sup>6</sup>	Mundial
	6					0.01											0.01
	10					0.04											
	11															0.01	
	13												0.01				
	14														0.02	0.01	
	15															0.01	0.01
	16				0.03	0.04		0.02								0.01	0.01
	17					0.01			0.01		0.08						0.01
	18					0.05			0.01								0.01
	19						0.01		0.02	0.04						0.02	0.04
	20					0.04	0.01	0.02			0.02		0.03	0.01			0.02
	21			0.03	0.01	0.03	0.01		0.01	0.02	0.02		0.07	0.03		0.02	0.02
	22			0.05		0.05	0.02	0.02		0.02		0.03	0.04	0.06		0.02	0.05
	23			0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.11	0.02	0.06	0.02		0.02	0.04	0.01
	24				0.02	0.02	0.01		0.02	0.02			0.04	0.01	0.04	0.02	0.01
	25					0.05	0.01		0.06						0.05		
	26			0.05		0.02		0.05	0.01			0.03	0.01	0.01	0.04		0.01
	27			0.10		0.02		0.02	0.02		0.06		0.01			0.21	0.04
	28		0.03	0.25	0.04	0.4	0.02	0.01		0.02			0.04	0.01		0.3	0.15
	29	0.55	0.53	0.42	0.06	0.1	0.3	0.64	0.32	0.27	0.11	0.39	0.06	0.18	0.32	0.19	0.3
	30	0.45	0.32	0.47	0.08	0.1	0.02	0.14	0.32	0.22	0.61	0.39	0.34	0.28	0.3	0.05	0.15
	31				0.08		0.01	0.02	0.03	0.07	0.02		0.16	0.16	0.08	0.02	0.06
	32				0.04	0.02	0.01		0.01		0.02		0.05	0.01	0.04	0.02	0.02
	33				0.2	0.02	0.01			0.07			0.05	0.06		0.01	0.02
	34				0.03	0.01							0.02		0.06		0.02
	35				0.07	0.06	0.02		0.02				0.03		0.02	0.01	0.01
	36				0.01	0.02	0.05		0.01	0.04	0.03			0.03	0.02	0.04	0.01
	37				0.03				0.01	0.02	0.03			0.03	0.02	0.01	0.01
	38				0.03	0.01							0.01	0.04	0.04	0.01	0.01
	39		0.12		0.05				0.02		0.05			0.03			0.02
	40				0.04	0.01								0.03		0.01	0.02
	41						0.02			0.02			0.01			0.01	0.01
	42				0.02	0.01			0.01				0.01			0.01	
	43					0.01			0.03	0.02			0.02				0.01
	44								0.01		0.02			0.01			0.01
	45								0.01	0.02						0.01	0.01
	46				0.02												0.01
	47								0.02								
	49											0.03					
	51								0.01								
	54				0.01				0.01								0.01
<b>Total de Cromosomas</b>		29	34	38	85	130	370	66	150	45	44	31	110	80	50	228	492

1. Kunst et al 1996, 2. Pérez 1999, 3. Tadao et al 1993, 4. Crawford et al 2000, 5. Fu et al 1991, 6. Tzipora et al 1997.

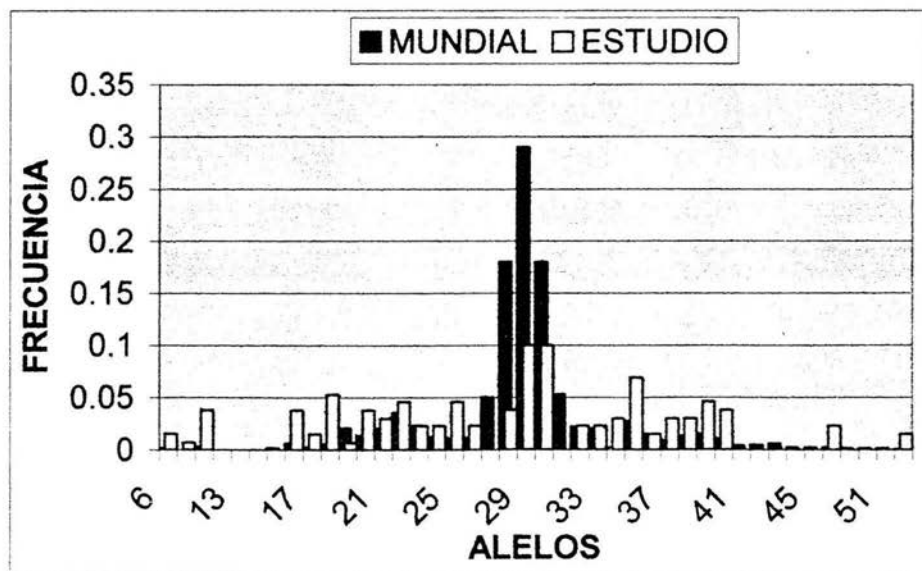
## DISCUSION

El síndrome de X frágil es una de las enfermedades genéticas hereditarias más frecuente en el ser humano, ésta es resultado de una expansión en el número de repetidos de CGG en la región 5' en el exón 1 del gen FMR1. Esta región de repetidos de CGG en individuos no afectados por el síndrome es altamente polimórfica y presenta valores que van desde los 6 hasta los 54 repetidos, pero cuando es superado este número de repetidos se crea un problema ya que se favorece la inestabilidad de la región de CGG, la cual provoca que en la siguiente generación se presente una premutación o mutación completa la cual está asociada a la enfermedad.

Los límites en el número de repetidos entre los individuos no afectados en las distintas poblaciones constituye aun un problema, ya que los datos obtenidos hasta el momento son insuficientes, esto ocasiona que el riesgo de conversión de un estado normal a uno de inestabilidad no se encuentre bien definido.

En este estudio se pudo analizar la estructura de los repetidos de CGG del gen FMR1 en una muestra de la población mexicana, encontrándose 28 alelos diferentes, que abarcan de 6 hasta 54 repetidos. Los alelos más frecuentes fueron los de 29 (10%), 30(10%) y 35(7%), que también son los más frecuentes en poblaciones Caucásicas, Asiáticas, de Negros y de Hispanos (Cuadro 3, Figura 10).

FIGURA 10. Frecuencias alélicas de repetidos de CGG en la población mundial y mexicana.



Fu y col. 1991 en su estudio poblacional no encuentra diferencias significativas entre sus poblaciones estudiadas y que abarcaron a caucásicos, asiáticos, negros e hispanos, pero señala que las frecuencias más altas lo presentan los alelos que cuentan con 28, 29 y 30 repetidos. Valores similares se obtuvieron en un estudio posterior que presentó Kunst y col. 1996, pero señalando que los caucásicos presentan una mayor diversidad de alelos.

En el caso de los estudios realizados hasta el momento en las poblaciones de Nativos Americanos como son Mixtecos, Navajos y Maticos se observó una frecuencia similar a lo reportado en las poblaciones Asiáticas. La misma frecuencia encontrada en nuestra población de estudio aunque el número de alelos fue mayor como se puede observar en la tabla 3.

Pérez 1999 en su estudio de la composición de repetidos de CGG en individuos de población mexicana, encuentra que los alelos más frecuentes corresponden a los de 27, 28, 29 y 33 repetidos, que siguen siendo valores que caen en el rango de normalidad y frecuencia a nivel mundial, siendo lo más significativos de estos valores el alelo con 28 repetidos que se encuentra como el más frecuente y que también es reportado con esta misma frecuencia para la población Japonesa, hecho que corrobora la similitud de esta población con la mexicana.

Dentro de estas poblaciones asiáticas (ver tabla 3) se observa que en el caso de la Japonesa los alelos frecuentes fueron los de 28, 29, 30 y 35 repetidos, que también fueron los más frecuentes en nuestro estudio. Estos datos sugieren la teoría de parentesco de las poblaciones Americanas con las Asiáticas. Se cree que poblaciones Asiáticas migraron de Asia hacia América por Beringia, un puente de tierra tendido hace 34 000 años atrás, cuando las glaciaciones bajaron el nivel del mar. Beringia constituía una región entre América del Norte y Siberia, donde actualmente se sitúa el estrecho de Bering. En aquel tiempo el clima era mucho más frío que ahora y los imponentes glaciares del Este y Oeste formaban una enorme placa de hielo, casi continua entre los dos continentes. Hay pruebas de que hace unos 15 000 años los glaciares comenzaron a derretirse y que se rompió el paso por donde pudieron haber transitado los primeros pobladores América. La colonización de América por poblaciones Asiáticas se ha apoyado por estudios de DNA mitocondrial y del cromosoma Y (Wallace *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1999).

Los datos obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de los rangos de los alelos más frecuentes a nivel mundial, pero mostrando una cierta similitud con la población Japonesa, lo cual corresponde principalmente con el alelo de 35 repetidos. Esta relación de parentesco también fue encontrada por Pérez (1999) en una muestra de la población mexicana, lo cual nos indicaría que existe parentesco con algunas de las poblaciones Asiáticas. Con la finalidad de confirmar el parentesco genético de nuestra población con poblaciones Asiáticas es necesario aumentar el tamaño de la muestra, así como estudiar otros aspectos involucrados en los repetidos, como pueden ser las interrupciones de AGG que se encuentran intercaladas entre estos triplete.

Por otro lado conocer la distribución de estas interrupciones en el gen FMR1 nos permitirá averiguar junto con el número de repetidos y algunas otras características genéticas, si en la población Mexicana existe las secuencias ancestrales relacionadas con esta enfermedad.

En la actualidad se están realizando esfuerzos multidisciplinarios para conocer todos los aspectos asociados a esta enfermedad tan frecuente en los humanos y que van desde los estudios moleculares hasta el diagnóstico, la prevención y tratamiento. La curación se plantea como una posibilidad en un futuro no muy lejano y que mira hacia la terapia génica o nuevas metodologías aun por descubrir, lo cual hace de este estudio un pequeño paso en el quehacer de la comprensión del gen FMR1.

## BIBLIOGRAFIA

Arenas D, Peñalosa R, Salamanca F. 1998. Patología médica ocasionada por repetidos de trinucleotidos. *Ga. Med. Mex.* 134 (4).

Ashley C., Wilkinson D, Reines D. Warren S. 1993. FMR1 protein : conserved RNP family domains and selective RNA Binding. *Science.* 262:563-566.

Bontekoe C. J, Bakker C. E, Nieuwenhuizen I. M, Hirst M. C, Oostra B. A. 2001. Instability of a CGG repeat in the FMR1 promoter. *Hum. Mol. Genet.* Vol. 10, No 16 : 1693-1699.

Chong, S., Eichelzer E, Nelson D. Hughey M. 1994. Robus amplifications and ethidium visible defection of the X syndrome CGG repeat using PFU polymerase . *Am. J. Med. Genet.* 51:522-526.

Christopher J. Cummings y Huda Y. Zoghbi. 2000. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* Vol. 9, No. 6 : 909-916.

Crawford D. C, Zhang F, Wilson B, Warren S. T, Sherman S. L. 2000. Fragile X CGG repeat structures among Africans Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum. Mol. Genet.* Vol 9, No 12 : 1759-1769

Curfs L.M, Wiegers A.M, Fryns J.P. 1991. Intelligence and the FRAXA syndrome: a review. *Genet Couns.* 2: 55-62

Feng Y, Zahng F, Lokey L.K, Chastain J, Lakkis L, Eberhart D, Warren S.T. 1995. Tanslational suppresiiion by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science* 286 :731-4.

Fernández Carbajal I, Blanco Quiros A, Fernandez T, J. J. Telleria O, M.J. Alonso Ramos, Sanz C. A. 2001. Eficacia de un test clínico como preselección de niños con sospecha de síndrome X Frágil. *An. Esp. Pediatr.* 54 : 326-330.

Fryns J.P. 1988. Suggestively increased incidence of sudden death in children of fra(X) positive mothers. *Am. J. Med. Genet.* 30: 73-75.

Fu Y-H, Kuhl D.P, Pizzuti A, Pieretti M. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-1058.

Gedeon A., Valker E., Robinson H., Partington M., Gross B. 1992. Fragile X syndrome without CGG amplification has an FMR1 deletion. *Nat. Genet.* 1:341-344.

Gillberg G. y Wahlstrom J. 1985. Chromosome abnormalities in infantile autism and other child psychoses: a population study of 66 cases. *Med. Chil. Neurol.* 27: 293-304.

Glover G, Bernabé M. J, Carbonell P. 2001. Diagnóstico del síndrome X frágil. *Rev. Neurol.* 30; S6-9.

Kempter B. 1992. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG.* 8:7-8.

Kunst C. B, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux J, Nelson L. Warren S.T. 1996. FMR1 in global populations. *Am. J. Genet.* 58 :513-522.

Lubs, H. A. 1969. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21:231-244.

Martin J. P, Bell J. A. 1943. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neural Psychiatry.* 6:151-154.

Meijer H., de Graff E., Mercky D., Jongbloed R., de Die-Smulders C. 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.* 3:6185-620.

Moxon Richard E, Willis Christopher. 1999. Microsatelites del DNA. *Inv. Cis.* Vol , No 3 :68-74 .

Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C . 1991 Inestabilidad of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252: 1097-1102.

Peng Jin, Stephen T. W. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* Vol 9 No 6.

Penrose L. S. 1938. A clinical and genetic study of 1280 cases of mental retardation. *Special Rep Med Res Council (Lond).* Ser. N° 229.

Pérez Herrera, S. E. 1999. Estudio molecular del Síndrome del X frágil en población mexicana. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp. 43.



Ribacoba Montero R, Salas Puig J, Fernández Toral J, Fernández Martínez J.M, Moral Rato M: 1995. Síndrome X frágil y epilepsia. *Neurol.* 10: 70-75.

Sambrook J, Fritsch E, and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory. Manual 2 Ed.* USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos F.R, Pandya A. Tyler- Smith S.D, schanfield W. R, Osipova L. 1999 . The central Siberian origin for native American Y-chromosome. *Am. J. Hum Genet.* No. 64; 619-628

Southerland G.R. 1977. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence of the type of tissue culture medium. *Science*, 197: 265-266.

Tadao A, Asano M, Kobayashi K, Hisako Yanagi H. 1993. Data on the CGG repeat at the fragile X site in the non-retarded Japanese population and family suggest the presence of a subgroup of normal alleles predisposing to mutate. *Hum. Genet.* 92 : 431-436.

Tarleton, J. C. and Saul R. C. 1993. Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J.Pediatr.* 122(2): 169-185.

Turner G, Opitz J.M, Brown WT. 1986. Conference report. Second International Workshop of the Fragile X and on X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* 23:11-67.

Verheij C, de Graaff E., Bakker C, Willemsen R, Willems J. 1995. Characterization of FMR1 protein isolated from different tissues. *Hum Mol. Genet* 4 (5): 895-901.

Tzipora C., Falik-Zaccai, Shachak E, Yalon M, Borochowitz Z, Macpherson J, Eichler E. 1997. Predisposition to the Fragile X syndrome in Jews of Tunisian Descent is Due to the Absence of AGG interruptions on a rare Mediterranean haplotype. *Am. J. Genet* 60 : 103-112.

Verkerk AJMH, Pieretti M., Sutcliff J. S. 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.

Wallace C. D. 1994. Mitochondrial DNA variation in human evolution. *Am J. Hum. Genet.* Vo. 57, No 2 ; 201-223.

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.

Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M . 1991. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* 252: 1179-1181.