



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

**ESTUDIO DE PACIENTES CON PROBABLE SÍNDROME  
DE X-FRÁGIL: DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y ESTUDIO  
MOLECULAR.**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE MÉDICO ESPECIALISTA EN:  
GENÉTICA MÉDICA**

**T E S I S**

**P R E S E N T A :  
MARIANA REYES ROSALES**

**PROFESOR TITULAR:  
DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES**

**ASESORES DE TESIS:  
DR. NORBERTO LEYVA GARCÍA  
DR. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE**



MÉXICO D. F.

FEBRERO 2015



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.

---

DRA. MATILDE L. ENRÍQUEZ SANDOVAL  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN EN SALUD

---

DRA. XOCHIQETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ  
SUBDIRECTORA DE EDUCACIÓN MÉDICA

---

DR. ALBERTO UGALDE REYES RETANA  
JEFE DE SERVICIO DE EDUCACIÓN MÉDICA

---

DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES  
PROFESOR TITULAR

---

DR. NORBERTO LEYVA GARCÍA  
ASESOR CLÍNICO

---

DR. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE  
ASESOR METODOLÓGICO



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Medicina Genómica del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) bajo la Asesoría metodológica del Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre y la Asesoría Clínica del Dr. Norberto Leyva García

Este trabajo fue financiado por el proyecto registrado como PICSA 12-162 de la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal bajo la responsabilidad del Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre

## Agradecimientos

A todos los pacientes que fueron y que serán, porque ellos son la inspiración para continuar y aprender cada día más.

# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1	<i>Aspectos históricos .....</i>	11
1.2	<i>Epidemiología.....</i>	15
1.3	<i>Etiología .....</i>	15
1.3.1	Gen <i>FMR1</i> .....	16
1.3.2	Estructura de la proteína FMRP.....	17
1.3.3	Bases genéticas del Síndrome de X-Frágil.....	18
1.3.4	Bases moleculares del Síndrome de X-Frágil.....	20
1.3.5	Bases moleculares del Síndrome de Tremor / Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS).....	24
1.3.6	Bases moleculares del Síndrome de Falla Ovárica Prematura asociado a X Frágil.....	26
1.4	<i>Cuadro clínico.....</i>	26
1.4.1	Hombres con mutación completa .....	27
1.4.1.1	Fenotipo asociado: Prader Willi like.....	29
1.4.2	Mujeres con mutación completa.....	30
1.4.3	Individuos con premutación.....	31
1.4.3.1	Síndrome de Tremor / Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS) .....	32
1.4.3.2	Falla ovárica prematura (FXPOI) .....	33
1.5	<i>Datos histopatológicos y de estudios de imagen .....</i>	34
1.5.1	Hallazgos neuropatológicos FXS .....	34
1.5.2	Hallazgos neuropatológicos en FXTAS .....	35
1.5.3	Hallazgos de neuroimagen en FXS.....	36
1.5.3.1	Hallazgos de neuroimagen en FXS .....	36
1.5.3.2	Hallazgos de neuroimagen en FXTAS .....	37
1.6	<i>Diagnóstico.....</i>	38
1.6.1	Diagnóstico de Síndrome de X Frágil .....	39
1.6.2	Diagnóstico de FXTAS.....	41
1.6.3	Diagnóstico de FXPOI .....	42
1.7	<i>Estudio citogenético para FXS.....</i>	43
1.8	<i>Pruebas moleculares para el diagnóstico .....</i>	44

1.8.1	Southern blot.....	44
1.8.2	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	45
1.8.2.1	PCR metilación .....	46
1.8.2.2	TP - PCR (Triplet repeat – primed PCR) .....	47
1.8.3	MS - MLPA (Methylation specific Multiplexed ligation probe amplification) .....	48
1.9	<i>Inmunohistoquímica</i> .....	49
1.9.1	Inmunohistoquímica en linfocitos .....	49
1.9.2	Inmunohistoquímica en raíz de cabello .....	50
1.10	<i>Diagnósticos diferenciales</i> .....	51
1.11	<i>Asesoramiento genético</i> .....	53
1.12	<i>Diagnóstico prenatal</i> .....	55
1.13	<i>Terapéutica</i> .....	56
1.14	<i>Manejo</i> .....	57
1.15	<i>Panorama en México</i> .....	58
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>65</b>
6.1	<i>Selección de pacientes</i> .....	65
6.1.1	Pacientes con déficit intelectual.....	65
6.1.1.1	Criterios de inclusión.....	65
6.1.1.2	Criterios de exclusión .....	65
6.1.1.3	Criterios de eliminación.....	65
6.1.2	Familiares de primer y segundo grado .....	66
6.1.2.1	Criterios de inclusión.....	66
6.1.2.2	Criterios de exclusión .....	66
6.1.2.3	Criterios de eliminación.....	66
6.2	<i>Caracterización clínica (Interrogatorio de los pacientes - Anexo 2)</i> .....	66

6.3	<i>Exploración física</i> .....	67
6.4	<i>Diagnóstico molecular y asignación de número de repetidos CGG</i> .....	67
6.4.1	<i>Extracción de DNA</i> .....	67
6.4.2	<i>Identificación de la expansión anormal de los repetidos CGG del gen FMR1</i> .....	68
6.5	<i>Análisis estadístico</i> .....	69
6.6	<i>Consideraciones éticas</i> .....	70
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
7.1	<i>Características generales de la muestra</i> .....	71
7.2	<i>Estudio molecular de pacientes con diagnóstico sugestivo de FXS</i> .....	76
7.3	<i>Características de pacientes FXS</i> .....	82
7.4	<i>Estudio de probables portadoras con la premutación</i> .....	84
7.5	<i>Estudios Familiares</i> .....	85
7.5.1	<i>Familia A</i> .....	85
7.5.2	<i>Familia B</i> .....	86
7.5.3	<i>Familia C</i> .....	90
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>91</b>
8.1	<i>Sensibilidad de la técnica diagnóstica</i> .....	92
8.2	<i>Selección de pacientes con probable FXS</i> .....	93
8.3	<i>¿Cómo caracterizar finamente a los pacientes con probable FXS?</i> .....	96
8.4	<i>Premutación y portadoras</i> .....	99
8.5	<i>Síndrome de X – Frágil vs Síndrome de Deleción 8p-</i> .....	100
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>101</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>103</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>105</b>
11.1	<i>Anexo 1. Carta de consentimiento informado</i> .....	105

11.2	<i>Anexo 2. Hoja de recolección de datos</i> .....	106
11.3	<i>Anexo 3. Puntuación de Hagerman</i> .....	108
11.4	<i>Anexo 4. Formato de entrega de resultados (Negativo)</i> .....	109
11.5	<i>Anexo 5. Formato de entrega de resultados (Positivo Premutación)</i> .....	110
11.6	<i>Anexo 6. Formato de entrega de resultados (Positivo Mutación completa)</i> .....	111
<b>12</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>112</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Dentro de los principales problemas de salud a nivel mundial se encuentra el déficit intelectual (DI) y el desorden del espectro autista (ASD), los cuales son los principales padecimientos que originan la discapacidad intelectual. La prevalencia del DI varía entre 1 - 3% en la población general, mientras que para el ASD se ha reportado una frecuencia de 1/50 niños en edad escolar (Srivastava, et al., 2014; Pereira et al., 2014). La incidencia en Estados Unidos y Finlandia de acuerdo a estudios epidemiológicos realizados en estas poblaciones es de 9.1 y 12.6 / 1000 habitantes, respectivamente (Maulik, et al., 2011). El DI se caracteriza por un coeficiente intelectual  $<70$  en conjunto, con limitaciones en las funciones adaptativas, esto puede ocurrir de forma aislada o asociado a malformaciones, alteraciones neurológicas, crisis convulsivas y/o alteraciones en el desarrollo (Srivastava, et al., 2014), mientras tanto, los individuos con ASD por lo general presentan retrasos significativos en el desarrollo del lenguaje, problemas de socialización y comunicación, así como conductas inusuales. Es importante mencionar que muchas personas con ASD también presentan déficit intelectual.

La discapacidad intelectual en México y a nivel mundial es considerada como una condición de enorme impacto social y económico (Pereira et al., 2014), ya que afecta directamente a los individuos que la experimentan, a su familia y a la sociedad, de manera adicional modifica la capacidad productiva de este conjunto de individuos, además de repercutir en los costos directos para su atención especializada. En México según estimaciones del INDESOL (Instituto Nacional de Desarrollo Social) hay 292,500 personas con algún tipo de discapacidad intelectual (Consejo Nacional para prevenir la Discriminación, 2009). Según datos presentados por el INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) hay 5,979,270 personas con algún tipo de discapacidad, esto representa 5.1% de la población mexicana, de la cual el 58.3% presenta discapacidad motriz, 27.2% tiene discapacidad visual, 12.1% tiene discapacidad auditiva, 8.3% tienen dificultad para hablar o comunicarse, 5.5% dificultad para el autocuidado, 4.4% presenta dificultad para poner

atención o aprender y el 8.5% del total presenta retraso mental, es importante mencionar que una persona puede tener más de una discapacidad, ya que si se suman los porcentajes anteriores superan el 100% (INEGI 2010; INEGI 2013); sin embargo muchos de estos padecimientos pueden pasar inadvertidos y ser subdiagnosticados, por lo que los datos epidemiológicos actuales podrían presentar diversos sesgos.

Actualmente, dentro de estas entidades patológicas se reconoce al síndrome de X-Frágil (FXS) (MIM #30955) como la primera causa de retraso mental de etiología hereditaria a nivel mundial y constituye la segunda causa de discapacidad intelectual después del Síndrome de Down (García et al., 2008). La mutación de X Frágil es también la causa monogénica más común de autismo, ocurre en 1 – 6% de niños con desorden del espectro autista (Bagni et al., 2012). FXS es causada por una mutación en el gen *FMR1* el cual se localiza en Xq27.3 el cual coincide con un sitio frágil sensible a folatos, en el cual se produce por la expansión de un repetido trinucleótido inestable de citosina-guanina-guanina (CGG) al final del promotor 5' de dicho gen (Gallagher et al., 2012). Esto resulta en la ausencia de la proteína *FMR1* (FMRP), que es importante para el desarrollo sináptico y plasticidad cerebral (Hagerman et al., 2013). Debido a su importancia, el estudio de este padecimiento es de gran importancia para el estudio de la discapacidad intelectual.

## 1.1 Aspectos históricos

El FXS fue descrito por primera vez por James Purdon Martin y Julia Bell en 1943. Dicho estudio reportó una familia en la cual 11 hombres presentaban déficit intelectual en dos generaciones (ver Fig. 1), así mismo se identificaron dos mujeres con una deficiencia mental menor. Estos pacientes fueron producto de madres con inteligencia normal, además los afectados presentaron un grado severo de demencia, con una edad mental entre 2 y 4 años, pero con un estado afectivo normal. Posterior a una vigilancia por 17 años, no fue posible

realizar el estudio histopatológico del cerebro de alguno de los pacientes (Martin & Bell, 1943) por lo que no se logró identificar la causa de la patología.

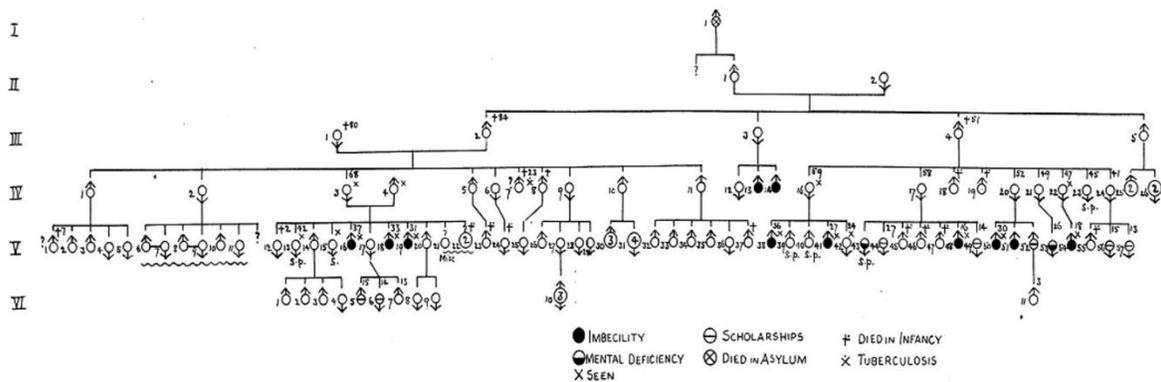


Figura 1. Árbol genealógico de la primera familia reportado con FXS.

Tomado de *J Neurol Psychiatry*. 1943 Jul;6(3-4):154-7.

Años después, en 1969 Herbert Lubs reportó la presencia de un cromosoma “X marcador” anormal (que consistía en una constricción cerca del final del brazo largo del cromosoma X) en una familia que presentó hombres con retraso mental que seguían una herencia ligada a X (Lubs, 1969). Posteriormente, en 1975 Turner et al., describieron dos familias en las cuales los hombres afectados presentaron macroquidismo y retraso mental (ver Fig. 2) (Turner et al, 1975), refiriendo un estudio previo de Escalante et al, donde una de estas familias se caracterizó por sobrecrecimiento genital, tanto de pene, escroto y testículos (Escalante et al., 1971). A través de estos datos se logró concluir que ambas familias presentaron un tipo de retraso mental ligado al X, por lo que se reportó la asociación de la patología a un sobrecrecimiento testicular con un volumen entre 35 y 45 mL, lo que equivale a casi dos veces el tamaño de un individuo sano (Turner et al., 1975).

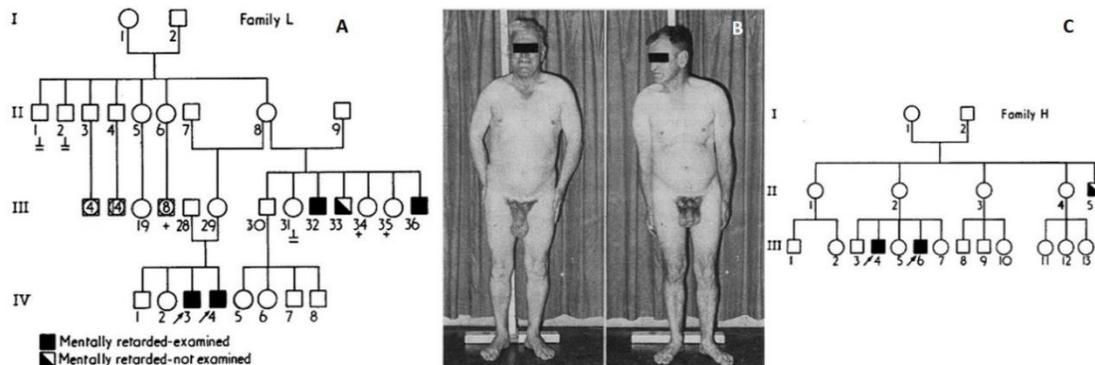


Figura 2. Árbol genealógico de las familias “L” y “H”. A. Árbol genealógico de la Familia “L”. B. Individuos III.32 y III.36 de la Familia “L”, donde se observa el macro-orquidismo. C. Árbol genealógico de la familia H.

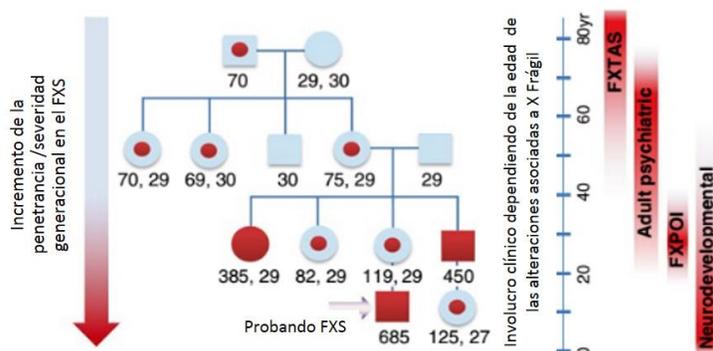
Tomado de *Journal of Medical Genetics* (1975). 12, 367.

Fue hasta 1977 cuando Sutherland et al., demostraron que la expresión del cromosoma X marcador estaba asociada a bajas concentraciones de folatos en el medio de cultivo celular (Sutherland, 1977; McConkie-Ross et al., 2005), así mismo se confirmó la localización del sitio frágil en la región cromosómica Xq27.3 (Sutherland, 1977; Hersh et al., 2011). Finalmente, en 1985 Sherman et al., reportaron un patrón inusual ligado al cromosoma X en las familias con FXS, este trastorno incluía un mayor riesgo para la presentación de FXS en generaciones posteriores (anticipación), mujeres afectadas y la identificación de hombres portadores no afectados (Sherman et al., 1984; Sherman et al., 1985; Abrams et al., 2012), con lo que se pudo caracterizar esta patología de manera más adecuada (ver Fig 3). Estos hallazgos llevaron a Sherman a concluir que la herencia del FXS posee ciertas características que se pueden describir en diversos puntos (ver Tabla 1), denominados actualmente como “la Paradoja de Sherman”.

<b>Tabla 1 Paradoja de Sherman</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No existen mutaciones “de novo” (espontáneas)</li> <li>• Todas las madres de varones afectados son portadoras</li> <li>• 20% de varones portadores no expresan ningún tipo de síntoma</li> <li>• Un porcentaje considerable de mujeres portadores presentan algún tipo de déficit intelectual</li> <li>• El riesgo de SXF en los descendientes dependía del sexo y el fenotipo del progenitor portador: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Las hijas de varones portadores asintomáticos, casi nunca tienen déficit intelectual, mientras que las hijas de mujeres portadoras asintomáticas tienen un 30% de riesgo de padecer el FXS.</li> <li>- Las mujeres portadoras con déficit cognitivos presentaban un mayor riesgo de tener hijos/as con FXS que las portadoras con inteligencia normal.</li> <li>- El riesgo de tener un descendiente con FXS aumentaba en cada generación. A este fenómeno se le denomina “anticipación genética”</li> </ul> </li> </ul>

Con el conocimiento general de la patología y posteriormente con los avances de la biología molecular, en el año 1991 el trastorno pudo ser ligado a un defecto genético específicamente en el gen FMR1, la mutación se adjudicó a la inestabilidad de los triplete CGG la cual se localiza en la región X frágil. Hoy en día, se define que la expansión anormal del repetido CGG inestable conduce a más casos de este síndrome con las generaciones venideras (ver Fig 3). Desde esta perspectiva, el significado de la "premutación" se define

como un umbral de número de repetidos que son cada vez más inestables (favoreciendo una mayor expansión) durante la transmisión (Hagerman et al., 2013).



**Figura 3. Penetrancia y anticipación en el FXS.** Representación de un árbol genealógico de FXS, donde se observa un giro intergeneracional de premutación a mutación completa, con el consiguiente aumento de la penetrancia y la gravedad (anticipación), debido a la inestabilidad de los repetidos CGG durante la transmisión. El número de debajo de cada individuo representan el tamaño del repetido CGG (dos alelos para mujeres), puntos rojos indican premutación, y el relleno rojo indica mutación completa. En el lado derecho de la figura se observa como los alelos en premutación se asocian con al menos uno de los cuatro dominios fenotípicos.

Modificado de *Acta Neuropathol* (2013) 126:1–19

En 1991 Verker identificó el gen y fue nombrado *FMR1* (fragil X mental retardation 1), el cual codificaba para la proteína FMRP (Fragil X mental retardation protein), la cual fue identificada en 1993 (Ramos-Fuentes et al., 2001). Estos eventos son considerados como los eventos más importantes en la identificación de FXS, lo cual se muestra como una línea del tiempo en el estudio de esta patología (ver Fig.4).



**Figura 4.** Línea del tiempo de FXS.

Modificado de *Annu. Rev. Neurosci.* 2012. 35:417–43

## 1.2 Epidemiología

En 1980, Herbst y Miller estimaron que la prevalencia del retraso mental ligado a X (RMLX) era de 1,8/1000 individuos. Como se detalló en secciones anteriores el FXS es la causa monogénica más frecuente de RM, por lo que representa el 15-20% del total de RMLX (Gillén-Navarro et al., 2006). Este padecimiento afecta tanto a hombres como mujeres, sin embargo, el grado de afectación cognitiva es típicamente más severa en hombres (Willemsen et al., 2011). Datos recientes señalan que FXS tiene una frecuencia aproximadamente de 1 en 2500 – 4000 hombres y 1 en 5000 - 8000 mujeres afectadas a nivel mundial (Bagni et al., 2012), presentando una prevalencia de la premutación de 1 de 251 hombres y 1 en 100 mujeres (Gallagher et al., 2012; Monaghan et al., 2013). Sin embargo, existe una variación en la prevalencia dependiendo a la población o región geográfica reportada, por ejemplo se ha reportado en Israel una frecuencia de portadoras de la premutación de 1 en 130 con mutación completa a 1 en 2500 mujeres; mientras en Canadá la prevalencia de la premutación es de 1 en 800 hombres y 1 en 260 mujeres (Gallagher et al., 2012).

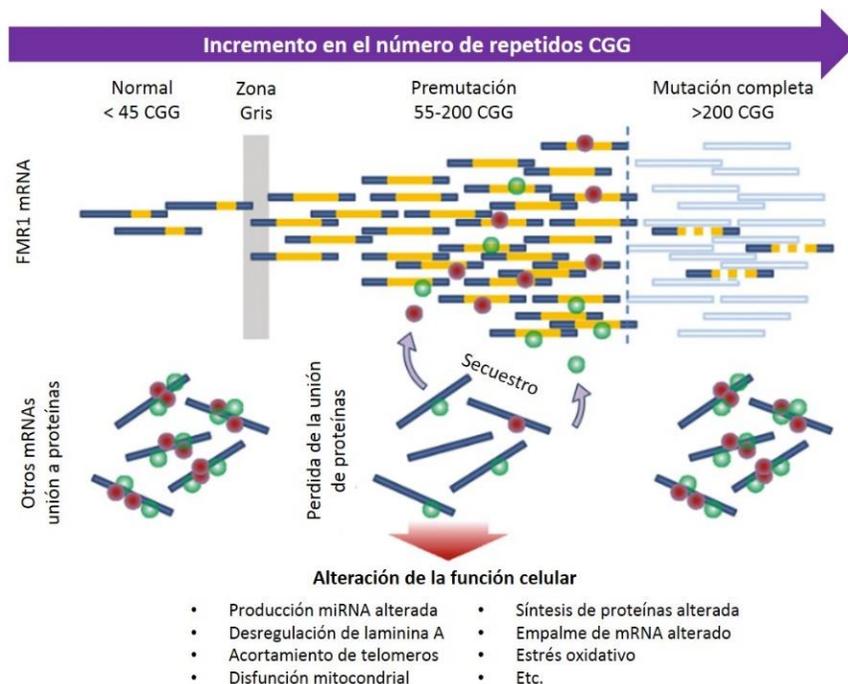
Es interesante que los individuos con premutación pueden presentar ciertas manifestaciones clínicas sin expresar los rasgos típicos del padecimiento; por ejemplo las mujeres con premutación pueden presentar falla ovárica. Considerando estas afecciones, la prevalencia de la falla ovárica prematura en mujeres portadoras de la premutación de *FMR1* se estima entre 13 y 26 %. La premutación se ha identificado en 0.8 a 7.5% de las mujeres con falla ovárica prematura esporádica y en más del 13% de las mujeres con falla ovárica prematura familiar (Wittenberger et al., 2007).

## 1.3 Etiología

El FXS es causado por una deficiencia o ausencia de la proteína conocida como FMRP (Fragil X mental retardation protein). Teóricamente, puede ocurrir algún tipo de delección o una



sináptica, en el desarrollo de dendritas y axones, así como en el aprendizaje y memoria (Hersh et al., 2011; Maurin et al., 2014).



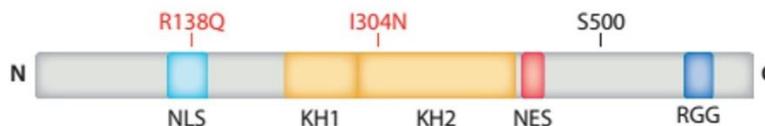
**Figura 6. Revisión de la expresión del gen *FMR1*.** Los niveles de mRNA-*FMR1* aumentan al aumentar la longitud de los repetidos CGG (amarillo) en todo el rango de premutación, y experimentan una transición considerable al disminuir los niveles de este en el rango de premutación, debido a la hipermetilación de la región promotora de *FMR1*. En el rango de mutación completa se presenta un mosaicismo de metilación, lo que ocasiona una producción continua de niveles bajos a moderados de mRNA. En el rango de premutación existe una toxicidad, que se cree que deriva del secuestro de RNA, mediante la asociación de una o más proteínas de unión a los repetidos CGG del mRNA, que normalmente se asocian con otros mRNAs. El secuestro a su vez conduce a la pérdida de la función normal de estas proteínas, que pueden incluir modulación de empalme y la regulación de la producción de los genes miRNA, entre otras funciones. La desregulación del procesamiento del RNA se cree que conduce a múltiples formas de desregulación celular corriente abajo.

*Modificado de Tremor Other Hyperkinet Mov 2012;2: <http://tremorjournal.org/article/view/63>*

### 1.3.2 Estructura de la proteína FMRP

La proteína FMRP (ver Fig. 7) puede ser dividida estructuralmente en tres regiones: región N-terminal, región central y la región C-terminal (Bagni et al., 2013). La región N-terminal presenta dos dominios Tudor (TD); evidencia a partir de estudios *in vitro* han demostrado su unión en forma de homopolímeros al RNA y a una pequeña región no codificante BC1. Se ha descrito la presencia de cuatro dominios de unión a RNA, que interactúan con diversos mRNAs incluyendo su propio mensajero, también contiene una región de señal para localización nuclear (NLS), sin embargo no ha sido descrita a la fecha su secuencia motivo específica. Es seguida de dos dominios KH (KH1 y KH2), una señal de exporte nuclear (codificada en el exón 14) y una caja RGG (arginina-glicina-glicina). La región C-terminal es

de gran importancia ya que tanto KH como la caja RGG cuenta con secuencias específicas de unión a diversas proteínas (Bardoni et al., 2001; Terracciano et al., 2005; Fernández et al., 2013).



**Figura 7. Dominios funcionales de FMRP.** FMRP humano tiene 632 aminoácidos (barra gris), tiene una señal de localización nuclear (NLS; azul), 2 dominios con homología K (KH1 y KH2; amarillo), una caja RGG (arginina-glicina-glicina, azul oscuro) y una secuencia de exportación nuclear (NES; rojo). R138Q y I304N son mutaciones que ocurren en pacientes con retraso desarrollo y una forma severa de FXS, respectivamente. I304N abole la asociación con poliribosomas. S500 es un sitio de mayor fosforilación. N: amino terminal; C: carboxilo terminal.

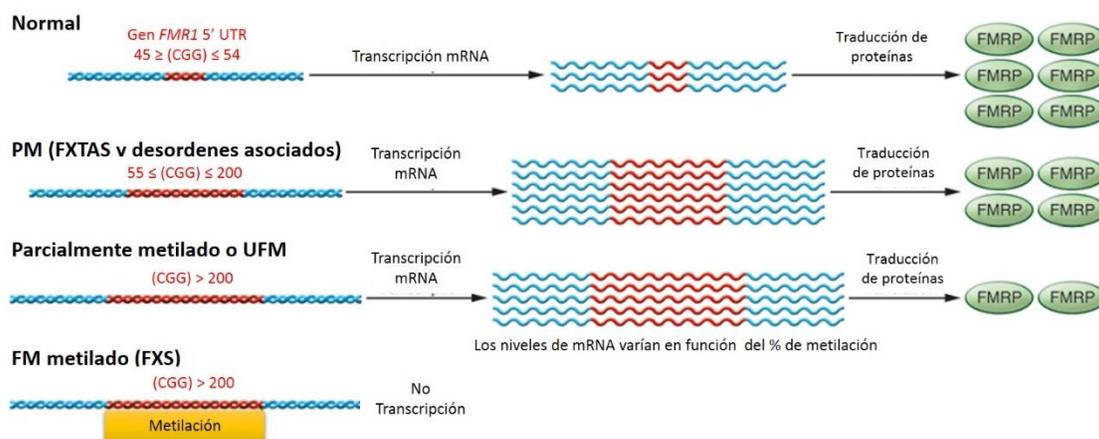
*Modificado de Annu Rev Neuroci 2012 35;417-443*

FMRP es considerada como una proteína citoplasmática, sin embargo tiene dominios funcionales que permiten su paso entre el núcleo y el citoplasma. Se expresa en diferentes tejidos, por ejemplo cerebro, espermatozonias y diversos tejidos epiteliales, pero es más abundante en los dos primeros; además funciona como una proteína de unión a RNA que es capaz de reconocer RNAs codificantes y no codificantes (Bagni et al., 2013).

### 1.3.3 Bases genéticas del Síndrome de X-Frágil

La mutación de X Frágil es una expansión inestable del trinucleótido CGG (ver Fig. 5), localizado en el primer exón (región no codificante) del gen *FMR1*. La variabilidad en el número de tripletes define cuatro tipos de alelos (ver Fig. 8): Normal que va de 5 a 54 repetidos CGG, con un promedio de 30; premutación (PM) de 55-200 repetidos CGG, este tipo de alelos son inestables y tienen una alta tendencia a expandirse cuando hay transmisión materna; alelos intermedios o zona gris que va de 45 a 54 repetidos CGG, estos alelos son llamados así porque aunque generalmente presentan una transmisión estable, se han reportado casos esporádicos en donde se ha incrementado el número de repetidos, comportándose como alelos premutados en generaciones sucesivas (Hersh et al., 2011); y finalmente, la mutación con penetrancia completa (FM, *del inglés full mutation*) que

presenta > 200 repetidos CGG. El riesgo de PM a FM depende del tamaño de repetidos CGG, a partir de la información reportada a nivel mundial el riesgo de expansión es cercano al 100% para alelos >99 repetidos CGG, también conocidos como altamente inestables. Algunos individuos con FXS pueden mostrar un patrón en mosaico (una mezcla entre alelos con premutación y mutación completa), que puede estar causada comúnmente por una inestabilidad somática de la mutación completa durante la embriogénesis temprana, ocasionado una retracción del expandido de repetidos CGG (Gallagher et al., 2012; Bagni et al 2012).



**Figura 8.** Los 4 alelos del gen *FMR1* humano. De acuerdo al grado de expansión del triplete CGG y del nivel de transcripción del mRNA de *FMR1* y los cambios postraduccionales, se generan 4 alelos: normal, PM, UPM y FM.

*Modificada de J Clin Invest 2012; 122 (12):4313-4322*

La expansión de los repetidos CGG es mitóticamente inestable favoreciéndose la heterogeneidad somática y la presencia de mutaciones en mosaico, esto quiere decir que un individuo mosaico tiene alelos en mutación completa y premutación; de igual manera también es posible que ocurra un mosaico de metilación, esto significa que existen alelos con FM hipermetilados y alelos desmetilados amplificados en el rango de PM y/o FM (6% de los pacientes FXS) (Puig et al., 2014). Este patrón en mosaico ocurre porque el número de expandidos del repetidos CGG es mayor de 200 en algunas células (mutación completa), mientras que en otras células el número de repetidos falla al incrementarse en un tamaño de 200 CGG (premutación). Este patrón en mosaico ocurre aproximadamente en el 15% de los casos, aunque se han observado cifras de hasta el 40% (Mandel et al., 2004). Un tipo más raro de mosaicismo es el "mosaicismo de metilación" y se asocia con individuos que

tienen >200 repetidos CGG, pero con metilación incompleta del gen *FMR1* y con reducción de cantidad de FMRP. Por lo tanto, las mutaciones en mosaico permiten la expresión disminuida de FMRP, lo que en algunos casos se han asociado con menores grados de discapacidad intelectual (Gallagher et al., 2012; Bagni et al., 2012).

De manera general la trasmisión de una premutación a una mutación completa se da por transmisión materna del alelo anormal, específicamente alelos con < 40 repetidos CGGs presentan una mayor estabilidad y raramente expanden, alelos entre 40 y 54 CGGs ocasionalmente expanden, y alelos mayores a 54 CGGs comúnmente expanden en varios cientos de repetidos causando FSX. (Gallagher et al., 2012; Latham et al., 2014). Recientemente, se ha estudiado el papel de la interrupción AGG intercalada en el repetido CGG, lo cual ocurre en alelos normales, intermedios y premutados en un rango de cada 9 o 10 repetidos CGG ininterrumpidos [(CGG)<sub>9</sub>AGG(CG)<sub>9</sub>AGG(CG)<sub>n</sub>] (Dombrowski, et al., 2002; Yrigollen et al., 2011), esta interrupción AGG se ha visto que confiere estabilidad, en comparación con grandes repetidos donde no se intercala este triplete en los cuales hay un mayor riesgo de expansión (Yrigollen et al., 2011; Abrams et al., 2012), se ha observado que aproximadamente en el 95% de los individuos sanos presentan de 1 a 2 interrupciones AGG (Latham et al., 2014). Por lo tanto, la constitución de la secuencia y modificaciones en *cis* son importantes directamente en la inestabilidad del repetido CGG, estos datos han sido de gran relevancia en el estudio de diversas enfermedades producidas por expansiones de trinucleótidos o tetranucleótidos (Pearson et al., 2005).

#### 1.3.4 Bases moleculares del Síndrome de X-Frágil

El número de repetidos influye directamente en la expresión del gen, los pacientes con mutación completa presentan niveles de mRNA elevados, mientras en las personas con premutación se ha observado un decremento del mismo (Hersh et al., 2011), esto puede estar asociado a que al ser FMRP una proteína transportadora de RNA, al faltar esta se pueden acumular, sin embargo hay reportes que mencionan que aun con la falta de esta proteína no se afecta el transporte de RNA, probablemente porque se lleve a cabo por otras

proteínas transportadoras, así que esto no está bien determinado (Bagni et al., 2013). No obstante, la mutación completa ocasiona una pérdida de función de la proteína FMRP. De manera relevante a pesar de la presencia de diversas mutaciones que causan la pérdida de la función de FMRP, el cuadro clínico es dependiente del tipo de mutación, ya que la expansión del repetido CGG presenta fenotipos diferentes al ocasionado por una delección o mutación puntual. Se han reportado más de 15 delecciones en hombres afectados, que van de 1.6 kb a 13 Mb. Cuando la delección es muy grande causa manifestaciones clínicas adicionales. Solo se han reportado tres mutaciones puntuales patológicas en el gen *FMR1*; I304N (cambio de isoleucina por asparagina en la posición 304) una mutación sin sentido que afecta el dominio de unión a RNA KH2, que fue encontrada en un paciente con un fenotipo inusualmente severo, lo que sugiere un efecto de dominancia negativa y dos mutaciones de codón de paro que ocasionan en la ausencia de FMRP (Bardoni et al., 2001).

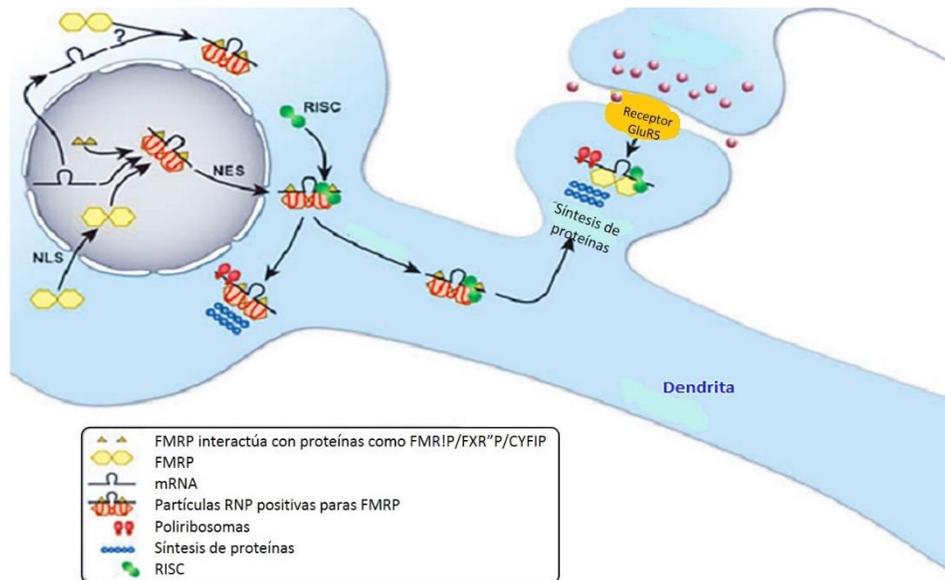
Para comprender como las mutaciones del gen *FMR1* produce diversos problemas a nivel del sistema nervioso central, es fundamental conocer la función normal de la proteína FMRP, la cual es abundante en neuronas, particularmente de la corteza cerebral, cerebelo e hipocampo, así mismo se presenta en otros tejidos incluidos la espermatogonia y varios tejidos epiteliales (Gallagher et al., 2012). FMRP está presente principalmente en el soma celular de las neuronas y se empaqueta junto con otras proteínas y mRNAs en complejos de ribonucleoproteínas (RNP). Importantes cantidades de estas RNP se transportan a través de la dendrita y durante el desarrollo una pequeña parte se localiza directamente en los axones.

Usualmente una mutación completa resulta en una hipermetilación de las islas CpG en la región del promotor del gen *FMR1*. La metilación del promotor de secuencias de ADN se asocia con el silenciamiento de genes y puede estar acompañado de una serie de modificaciones en la histonas N-terminal, cuando el promotor inicia la transcripción de genes típicamente esta desmetilado el ADN y se acetilan las lisinas en N-terminal de las histonas H3 y H4. Pietrobono et al., mostraron que los primeros eventos en la cascada que

conduce a la inactivación de un gen *FMR1* expandido parece ser la desacetilación de histonas y la metilación de H3-K9, que son seguidos por la metilación del ADN y la desmetilación de H3-K4 (Terracciano et al., 2005; Willemsen et al., 2011). De igual forma se ha visto que el silenciamiento del gen *FMR1* se produce por su propio mRNA expandido a través de la hibridación entre las porciones complementarias de repetidos CGG, formando un complejo RNA-DNA e impidiendo su expresión (Pugin et al., 2014).

A nivel neuronal hay diferentes tipos de gránulos citoplasmáticos: gránulos estrés, cuerpos P y gránulos de RNA, en los cuales FMRP juega un papel fundamental. Los gránulos citoplasmáticos de estrés son focos donde se acumulan mRNAs no traducidos cuando la célula se somete a varios factores ambientales estresantes. Por otro lado, los cuerpos P son sitios donde se produce la degradación de mRNA, son también importantes en el procesamiento de microRNA y contienen el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RNP). Finalmente, los gránulos de RNA se pueden dividir en dos tipos, los que contienen subunidades ribosomales (partículas RNP) y los que no contienen subunidades ribosomales (transporte de gránulos). La función exacta del FMRP en los diferentes tipos de gránulos no se conoce, pero se ha observado su participación en la represión de la traducción del mRNA durante el transporte dendrítico y en la sinapsis (ver FIG 9). FMRP también se expresa en astrocitos, durante su desarrollo y es esencial para la sinaptogénesis en estos. La expresión de FMRP en astrocitos es importante para la formación de las espinas dendríticas neuronales en FXS. Debido a que FMRP se une a mRNAs y se encuentra en los gránulos de RNA se plantea la hipótesis de que éste es importante para el transporte de mRNAs diana en las dendritas. (Willemsen et al., 2011)

FMRP es típicamente conocida como un represor de la traducción específicamente de mRNA y de la síntesis de proteínas en la sinapsis, y esto involucra un número significativo de procesos celulares. El decremento de FMRP causa una sobre-regulación a la baja de los efectos de los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs) y estos se asocian con una morfología anormal de las espinas dendríticas que son sugestivas de conexiones insuficientes durante el desarrollo y a lo largo de la maduración (Schneider et al., 2013).



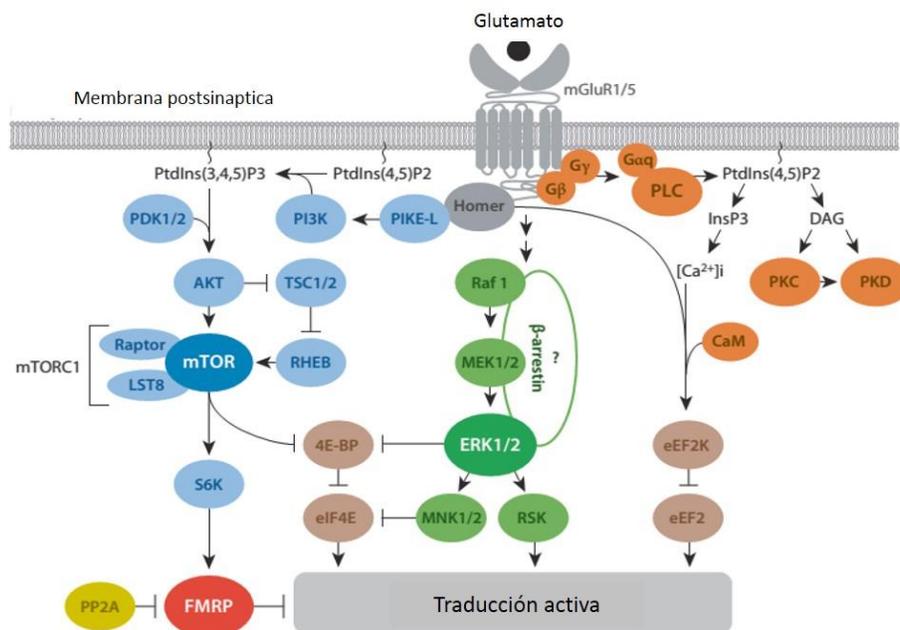
**Figura 9. Modelo de la función de FMRP en las neuronas.** FMRP se sintetiza en el citoplasma. Los dímeros de FMRP (hexágonos amarillos) entran al núcleo a través de la señal del dominio de localización nuclear (NLS). En el núcleo, FMRP se une al mRNA diana y otras proteínas, formando partículas de ribonucleoproteína (RNP). La partícula FMRP - RNP se transporta de vuelta al citoplasma, a través de la señal de exportación nuclear (NES) de FMRP. En el citoplasma, la partícula FMRP - RNP puede interactuar con los miembros del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC; círculo verde) y también se asocia con ribosomas (óvalos rojos). Partículas FMRP - RNP regulan la síntesis de proteínas (cadena de círculos azules) en el cuerpo de la neurona. Una proporción de las partículas de FMRP - RNP se empaquetan en gránulos de mRNA y se transporta en las dendritas. Durante el transporte, FMRP cumple su papel principal como un represor de la traducción de sus mRNA. Tras la estimulación sináptica del grupo I mGluRs, FMRP permite la traducción de sus mRNA. Las proteínas que se sintetizan parecen estar implicados en la internalización cíclica de los receptores AMPA y otros procesos neuronales.

*Modificado de Clin Genet 2011; 80:216*

La teoría de mGluR5 para FXS ha sido validada, no se entiende por completo como mGluR5 (ver FIG 10) se une a la síntesis de proteínas y como este proceso se altera en la ausencia de FMRP para la disfunción sináptica (Bhakar et al., 2012).

La teoría del mGluR ha contribuido a un cambio de paradigma en la forma de X frágil (FX) y otros trastornos genéticos del desarrollo cerebral. Los datos indican ahora que una constelación de síntomas aparentemente no relacionados y complejos podría ser una consecuencia de metabolismo sináptico cerebral alterado –síntesis de proteínas en el caso de FX-. FMR1 se expresa normalmente temprano en la embriogénesis y los pacientes con mutación completa no expresan FMRP. FMRP se requiere para la apropiada neurogénesis prenatal y la diferenciación neuronal, por lo tanto el cerebro de los pacientes con FXS es diferente al nacimiento, sin embargo la neurogénesis ocurre durante toda la vida en el giro

dentado del hipocampo, sorprendentemente las alteraciones de la memoria dependientes de hipocampo han sido rescatadas con la re-expresión del FMRP en células madre neurales en el ratón knockout *Fmr1*, en humanos esto puede observarse tras la administración de un inhibidor de la glucógeno cinasa-sintasa3 (GSK3); la actividad de GSK3 es elevada en el *Fmr1KO* corriente abajo de mGluR5, lo que sugiere que la teoría mGluR también puede ser relevante a este aspecto de la fisiopatología FXS. Estas características moleculares podría explicar los rasgos fenotípicas de la enfermedad, sin embargo, como se mencionó anteriormente, la premutación puede estar acompañada de alteraciones fenotípicas, por lo que es importante explicar como un umbral de repetidos entre 55 y 200 puede originar algunas modificaciones sistemáticas.

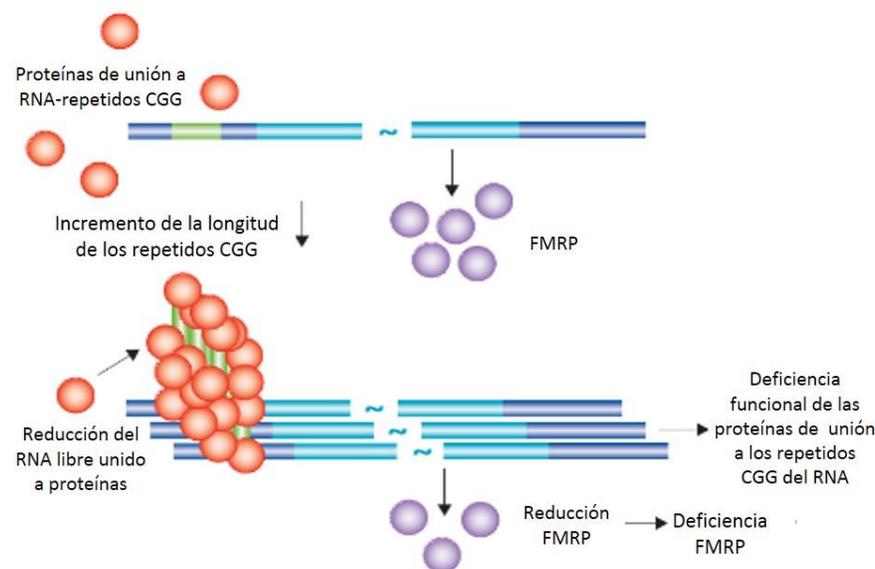


**Figura 10. Vía de señalización mGluR1/5 relevantes para la síntesis de proteínas.** La unión de glutamato a Gp1 mGluRs activa tres vías principales que acoplan los receptores a la regulación de la traducción: (a) la vía PLC / calcio-calmodulina (óvalos anaranjados), (b) la vía mTOR (óvalos azules), y (c) la vía ERK (óvalos verdes). Componentes reguladores clave en la traducción implicados en estas vías se muestran en café. mGluR1/5 también puede inhibir la función de FMRP (óvalo rojo) para regular la traducción a través de una cuarta vía que requiere la estimulación de PP2A (óvalo amarillo). Los signos de interrogación indican asociaciones indeterminadas. Las flechas indican una consecuencia positiva en los componentes aguas abajo; líneas perpendiculares indican una consecuencia inhibitoria. *Abreviaturas:*  $[Ca^{2+}]_i$ , la liberación de calcio intracelular; *CaM:* Calmodulina; *ERK:* Señal extracelular reguladora cinasa; *FMRP:* Proteína retraso mental X frágil; (*Gαq, Gβ, Gγ*), proteínas G heterotrimericas; *InsP3:* inositol-1,4,5-trifosfato; *mGluR,* receptor de glutamato metabotrópico; *PtdIns:* Fosfoinosítidos; *PLC:* Fosfolipasa C; *PP2A,* proteína fosfatasa 2A; *Raptor:* Proteína reguladora asociado a mTOR.

*Modificado Annu. Rev. Neurosci. 2012.35:417-443*

### 1.3.5 Bases moleculares del Síndrome de Tremor / Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS)

Hay evidencia que señala que el mecanismo mediante el cual se produce FXTAS es por una ganancia de función tóxica del RNA (ver FIG 11), como lo que se ha observado en patologías como la distrofia miotónica tipo 1 y tipo 2 (Magaña JJ et al., 2009). El aumento de los niveles de mRNA-FMR1, que contienen los repetidos CGG de PM y la presencia de mRNA mutante dentro de las inclusiones intranucleares son los primeros indicios de un mecanismo de neurodegeneración mediado por RNA. De hecho, la evidencia experimental mostró la acumulación de una gran variedad de proteínas dentro de las inclusiones, esto utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo Pura, hnRNP A2/B1, CUGBP1 y Sam68. El secuestro de Sam68 y la proteína de unión al ARN que participan en la regulación del corte y empalme alternativo, resulta en la pérdida parcial del corte y empalme sensible a Sam68 sensible, y por lo tanto hay una regulación deficiente del corte y empalme del pre-ARNm diana en pacientes FXTAS (Willemsen, 2011).



**Figura 11. Diagrama del modelo de secuestro de RNA para la toxicidad en los trastornos de premutación en X frágil, incluyendo FXTAS.** Una o más proteínas de unión de ARN se unen a los repetidos CGG del RNA dependiendo de la longitud, de tal manera que se produce poca unión en los repetidos CGG normales y mayor unión en los repetidos CGG grandes. El exceso de unión de estas proteínas conduce a una insuficiencia funcional para la función normal. Concentraciones disminuidas de FMRP pueden contribuir a los fenotipos de premutación en el caso de alelos grandes.

*Modificado de Lancet Neurol 2013; 12: 786–98*

Portadores de premutación con más de 100 repetidos CGG es más común que presenten deficiencias leves en FMRP, problemas de desarrollo y manifestaciones por alteración en la función de la amígdala. Deficiencia en FMRP ocasionan una sobre regulación del sistema mGluR5 y una infraregulación del sistema GABA<sub>A</sub> resultando en un desequilibrio de la

excitación-inhibición que se observa en el modelo neuronal de premutación en ratones. Las alteraciones en GABA<sub>A</sub> pueden predisponer a los portadores a trastorno de déficit de atención e hiperactividad que se observa en el 30% de los hombres con la premutación. (Hagerman & Hagerman, 2013)

#### 1.3.6 Bases moleculares del Síndrome de Falla Ovárica Prematura asociado a X Frágil

La cuestión clave en los estudios para obtener conocimientos sobre la etiología de la insuficiencia ovárica en las mujeres con el PM es: ¿Cómo un mRNA con PM puede producir menopausia prematura?. La hipótesis de ováricos se encuentra actualmente en estudio por un examen detallado de los folículos ováricos de ratones KI hembras (R. Willemsen, datos no publicados; Hagerman, 2013). Los datos preliminares muestran alta expresión de FMRP en occitos y células de la granulosa en ovarios humanos durante la foliculogénesis. Quizá la longitud promedio de los repetidos resulta en una mayor expresión de mRNA en lo ovarios lo que produce una mayor toxicidad. Es posible que el tamaño de los repetidos confiera una conformación específica a los mRNA, como horquillas, y después interactúen con diferentes proteínas u otros mRNA dependiendo del tamaño del repetido. Estudios posteriores serán muy importantes para elucidar el/los mecanismos involucrados en este tipo de alteraciones.

#### 1.4 Cuadro clínico

En las secciones anteriores se ha analizado como los cambios genéticos y moleculares inducen modificaciones tanto en sistema nervioso central como en otros tejidos, por lo tanto estos cambios se reflejan con signos y síntomas específicos de FSX, así como las alteraciones observadas en la presencia de las premutaciones. De manera general el diagnóstico de FSX temprano se da en niños menores de 3 años de edad, los cuales presentan retraso o ausencia en el desarrollo de lenguaje. Antes de los 2 años se ha encontrado hipotonía, retraso en el desarrollo motor, aleteo de manos, poco contacto visual, emesis constante y/o otitis media e irritabilidad. Los niños presentan trastorno por

déficit de atención e hiperactividad, impulsividad y ansiedad. Aproximadamente el 30% de los niños con FSX cumplen con criterios diagnósticos de autismo (Bagni et al., 2012). De manera interesante, al ser una patología ligada al cromosoma X, el fenotipo varía de acuerdo al sexo del paciente y al número de repetidos que presenten.

#### 1.4.1 Hombres con mutación completa

Los individuos con FSX se caracterizan clásicamente por alteraciones cognitivas y de comportamiento, dismorfias faciales (ver Fig. 12), anormalidades en tejido conjuntivo y macroorquidismo (Terracciano et al., 2005). El macroorquidismo (ver Fig. 13) se considera cuando el volumen testicular es de aproximadamente 50 mL, siendo que el volumen normal promedio es de <25 mL, este signo es el más frecuente, presentándose en el 90% de los niños a la edad de 14 años (pospuberes), pero es poco común en niños prepuberes (Gallagher et al., 2012; Hersh et al., 2011). Más del 5% de los hombres con FXS tienen un coeficiente intelectual >70, típicamente atribuible a mosaicismo (una combinación entre alelos metilados y no metilados) que resulta en la producción de FMRP en una fracción de células (Abrams et al., 2012). Las características generales de estos individuos se describen en la tabla 2.

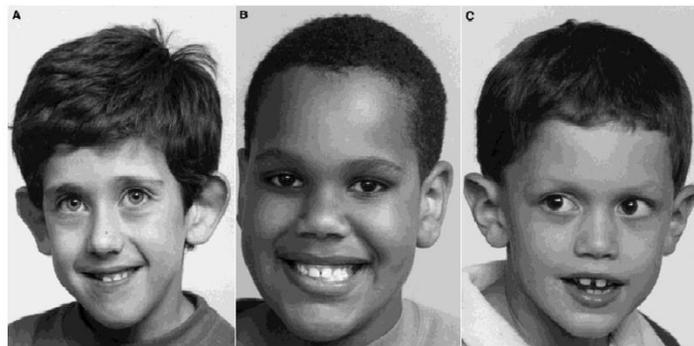
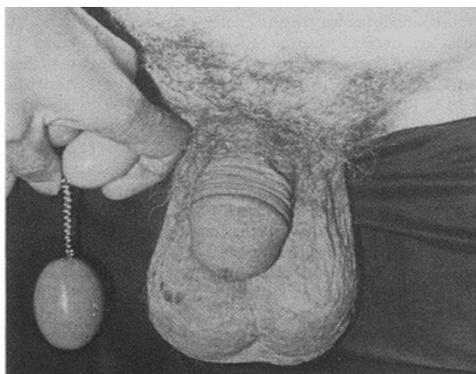


Figura 12. Características faciales de tres niños con FXS. A. Presenta más marcadas las características faciales como son orejas prominentes, frente amplia, cara alargada. B. Este niño tiene la cara alargada solamente. C. Este niño es el que tiene las características faciales menos marcadas pero sus hélices tiene una configuración simple.

*Modificado de Am. J. Med. Genet. 92:229-236, 2000.*



**Figura 13.** Volumen testicular comparado con un orquidómetro de 25 mL

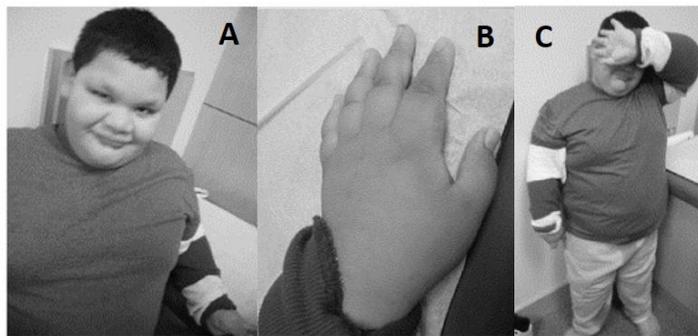
*Modificado de Journal of Medical Genetics (1975). 12, 367*

<b>Tabla 2 Características físicas y psicológicas de pacientes masculinos con mutación completa para FXS</b> (Gallagher et al., 2012; Pirozzi et al., 2011; Hersh et al., 2011)		
<b>Características físicas</b>	<b>Alteraciones cognitivas</b>	<b>Alteraciones conductuales</b>
Hipotonía muscular generalizada	Discapacidad intelectual moderada a severa (CI 40 aproximadamente)	Aislamiento social
Frente ancha	Retraso en el lenguaje (inician 2-3 años)	Agresividad
Cara larga y estrecha	Déficit en el lenguaje conservado	Inquietud
Orejas prominentes y grandes	Déficit funciones ejecutivas	Esparcimiento
Paladar alto y arqueado	Déficit de atención	Impulsividad
Paladar hendido	Déficit en la memoria a corto plazo	Hipersensibilidad a estímulos sensitivos
Apiñamiento y mala oclusión dental		Movimientos estereotipados
Estrabismo		
Nistagmos		
Ptosis palpebral		
Hiperlaxitud de pequeñas articulaciones		
Piel delgada		
Pie plano		
Displasia congénita de cadera		
Escoliosis		
Pie equino varo		
Pliegue palmar único		
Macroorquidismo (90%)		
	<b>Otras alteraciones</b>	<b>Alteraciones psiquiátricas</b>
	Otitis media (60-80%)	Obsesivos
	Otitis recurrente (23%)	Desorden del espectro autista (>30% ♂ y 20% ♀)
	Crisis convulsivas (13-18% ♂ y 5% ♀ FM)	Déficit de atención e hiperactividad
	Problemas gastrointestinales	Ansiedad
	- Enfermedad por reflujo gastroesofágico	Labilidad emocional
	Errores de refracción (hiperopia, astigmatismo) (23-50%)	Autolesión
	Obesidad	Rabietas
	Hipertensión	
	Prolapso de la válvula mitral (adultos)	

Es importante tener en cuenta que aproximadamente un 30% de los casos de paciente con FXS no presentan las características fenotípicas clásicas, ni antecedentes familiares de DI, y solamente se pueden manifestar como retraso del lenguaje o TDAH, lo que puede dificultar y retrasar el diagnóstico (Pugin et al., 2014).

#### 1.4.1.1 Fenotipo asociado: Prader Willi like

En algunos casos se han observado pacientes con características inusuales, en menos del 10% de los individuos con FXS presentan un fenotipo asociado con obesidad severa, hiperfagia, hipogonadismo o retraso puberal, el cual es denominado como fenotipo Prader-Willi like (McLennan et al., 2011). El fenotipo de Prader – Willi like (FIG 14) en FXS fue reportado primero en cuatro hombres con obesidad extrema, talla baja, dedos de manos y pies pequeños e hipogonadismo.



**Figura 14. Fenotipo Prader - Willi like.** Niño de 9 años con mutación completa FXS con fenotipo Prader-Willi. A. Cara redonda con orejas prominentes. B. Dedos pequeños. C. Obesidad troncal

*Modificado de Current Genomics, 2011, Vol. 12, No. 3*

La causa de este singular fenotipo además de presentar la mutación completa (Hersh et al., 2011), es la baja expresión del gen *CYFIP1* (Cytoplasmic FMRP interacting protein 1) que se localiza en la región 15q11-q13 y codifica para una proteína CYFIP1, una proteína que trabaja en conjunto con FMRP. FMRP se une a CYFIP1, juntas forman un complejo que se une a eIF4E, un factor de iniciación de la traducción que participan en la dirección de los ribosomas para la traducción de RNAm. El complejo eIF4E-CYFIP1-FMRP resultante es muy importante a nivel del Sistema nervioso central, ya que se encuentra presente en las sinapsis. La estimulación sináptica conduce a la liberación de CYFIP1 de eIF4E, lo que permite que la traducción se produzca. (McLennan et al., 2011). Se ha reportado que estos pacientes presentan mayor frecuencia de trastorno del espectro autista que los individuos con FXS sin el fenotipo de Prader-Willi. Las características principales de este fenotipo se definen en la tabla 3.

**Tabla 3 Fenotipo Prader Willi - Like (McLennan et al., 2011)**

<b>Características faciales</b>	<b>Características del comportamiento</b>
Cara redonda	Retraso en el desarrollo
Ojos almendrados	Problemas en la conducta alimentaria: Hiperfagia
Orejas pueden o no ser prominentes	Dificultad para las transiciones o cambios
<b>Características físicas</b>	Emesis
Obesidad	Habla repetitiva
Retraso en la pubertad	Problemas de conducta
Pene pequeño	Aleteo de manos
Hipotonía	Poco contacto visual
<b>Macroorquidismo</b>	Desorden del espectro autista
Si, en la pubertad	Trastorno obsesivo compulsivo

#### 1.4.2 Mujeres con mutación completa

Las diferencias fenotípicas observadas entre mujeres y hombres con mutación completa, se explican por los distintos niveles de expresión de FMRP y por una inactivación no al azar del cromosoma X mutado. Las mujeres con inactivación preferencial del cromosoma X normal presentan mayor DI y niveles bajos de FMRP, presentando un fenotipo físico y neuropsiquiátrico similar al observado en hombres, pero más leve (Puig et al., 2014), teniendo en cuenta lo anterior sabemos que aproximadamente el 40% de las mujeres con mutación completa en *FMR1* tienen discapacidad intelectual, otro 40% tiene dificultades en el aprendizaje y en el comportamiento. Aproximadamente el 25% de la mujeres con mutación completa tienen un coeficiente intelectual dentro del rango normal (>85), pero pueden tener alteraciones en las funciones ejecutivas y en la salud mental.

**Tabla 4 Características físicas y psicológicas de pacientes femeninos con mutación completa para FXS**

(Gallagher, 2012; Pirozzi, 2011; Hersh, et al., 2011)

<b>Características físicas</b>	<b>Alteraciones cognitivas</b>	<b>Alteraciones psiquiátricos</b>	<b>Alteraciones conductuales</b>	<b>Otras alteraciones</b>
Usualmente no hay evidencia o características faciales muy leves	DI limítrofe Inteligencia normal Déficit en las funciones ejecutivas	Ansiedad Incremento en obsesividad TDAH Depresión	Ansiedad social Timidez Aislamiento social Labilidad emocional Abuso de alcohol	Crisis convulsivas

Se han identificado mujeres con mutación completa posterior al nacimiento de un niño afectado, que presentan características físicas leves o no aparentes de FXS (Abrams et al,

2012). Como se observa en la tabla 4 existen datos clínicos que difieren de los pacientes de sexo masculino.

### 1.4.3 Individuos con premutación

Por otro lado, los individuos con premutación, además de ser un umbral inestable que puede generar expansiones anormales en sucesivas generaciones, también pueden llegar a presentar algunos datos clínicos y alteraciones que difieren de los pacientes que presentan la mutación con penetrancia completa. De manera general en la Tabla 5 se describen las características generales de estos individuos, las cuales se describen con mayor detalle en las siguientes secciones.

<b>Tabla 5 Características físicas y psicológicas de pacientes con premutación para FXS</b> (Gallagher, 2012; Pirozzi, 2011; Hersh, et al., 2011)					
	<b>Características físicas</b>	<b>Alteraciones cognitivas</b>	<b>Alteraciones psiquiátricas</b>	<b>Alteraciones conductuales</b>	<b>Otras alteraciones</b>
♂	Rasgos faciales sutiles	Inteligencia normal Déficit en las funciones ejecutivas Déficit en la memoria a corto plazo	Obsesivos Deterioro cognitivo Desordenes del humor (depresión) TEA TDAH	Abuso de alcohol y drogas Desinhibición	Síndrome de Tremor – Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS) Hipotensión ortostática Incontinencia Impotencia Neurpatía periférica Parkinsonismo
♀	Usualmente no hay evidencia o rasgos faciales sutiles - Pabellones auriculares prominentes Hiper movilidad de pequeñas articulaciones	Inteligencia normal Deficiencia sutil en las funciones ejecutivas	Incremento en la obsesividad Ansiedad Depresión Esquizotipia	Abuso de alcohol Desinhibición	FXTAS Falla ovárica prematura (antes 40 años) (20%) Enfermedad tiroidea Dolor muscular crónico Hipertensión Fibromialgia Dolor muscular

#### 1.4.3.1 *Síndrome de Tremor / Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS)*

Es una enfermedad neurodegenerativa de inicio tardío (por encima de los 50 años), principalmente se presenta en hombres (Leehey, 2009), producida por una premutación en el gen *FMR1*. Se describió inicialmente en los abuelos maternos de niños con X-Frágil, es decir, en portadores de la premutación que hasta ese momento se consideraban asintomáticos. Afecta aproximadamente al 46% de los varones y del 8% al 17% de las mujeres con premutación. Se manifiesta por un cuadro de temblor intencional y ataxia, acompañado de forma variable de parkinsonismo, deterioro cognitivo, neuropatía periférica, síntomas psiquiátricos como ansiedad, depresión, incremento de la irritabilidad y comportamiento compulsivo (Bagni et al., 2012; Cortés-Velarde, et al., 2012; Abrams et al, 2012).

Se inicia en promedio a los 60 años y existe una relación inversa entre la edad de inicio y la longitud de la repetición. (Cortés-Velarde et al, 2012). La penetrancia de FXTAS depende de la edad, con aproximadamente 40% en hombres mayores de 50 años y 8% de las mujeres portadoras mayores de 40 años (Leehey, 2009). El síntoma inicial suele ser el temblor intencional y postural, suele iniciarse en la mano dominante para hacerse posteriormente bilateral y puede ser incapacitante. La neuropatía periférica en miembros inferiores aparece en más de la mitad de los casos. En algunos pacientes también aparecen signos de disfunción autonómica como hipotensión ortostática, impotencia y pérdida del control de esfínteres. El deterioro cognitivo se caracteriza inicialmente por un síndrome disejecutivo y una alteración de la memoria de trabajo, seguido de trastornos conductuales y cambios de personalidad, también es frecuente la presencia de ansiedad y depresión, se ha visto que en las mujeres la sintomatología es casi siempre más leve que en los hombres (Cortés-Velarde et al., 2012). En la tabla 6 se describen las características principales de FXTAS, sin embargo existe variabilidad dentro de este grupo de individuos, se han observado diferentes presentaciones y características clínicas reportadas en personas que presentan un número de repetidos CGG entre 55 y 200 (Tabla 7).

<b>Problemas autonómicos</b>	<b>Síntomas motores</b>	<b>Alteraciones del sueño</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Constipación</li> <li>• Síndrome de intestino irritable</li> <li>• Disfunción eréctil</li> <li>• Problemas de deglución</li> <li>• Reflujo gastrointestinal</li> <li>• Hipotensión ortostática</li> <li>• Hipertensión</li> <li>• Incontinencia o urgencia urinaria y/o fecal</li> <li>• Arritmia cardiaca</li> <li>• Vértigo o mareo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temblor               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Intención</li> <li>- Reposo</li> </ul> </li> <li>• Ataxia               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disartria</li> <li>- Dismetría</li> <li>- Anormalidades en la postura y marcha</li> </ul> </li> <li>• Debilidad muscular</li> <li>• Parkinsonismo               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Leve bradicinesia</li> <li>- Leve rigidez de extremidades</li> <li>- Signo de rueda dentada</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insomnio</li> <li>• Apnea del sueño</li> <li>• Sueño durante el día</li> </ul>
		<b>Alteraciones psiquiátricas</b>
<b>Desordenes inmunológicos</b>		<b>Alteraciones sensoriales</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotiroidismo</li> <li>• Fibromialgia</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disfunción olfatoria</li> <li>• Hipoacusia</li> <li>• Neuropatía periférica</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibromialgia</li> <li>• Dolor neuropático</li> </ul>

<b>Características variables asociadas</b>	<b>Presentaciones poco comunes</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disfunción autonómica</li> <li>• Neuropatía sensorial de fibra grande</li> <li>• Características psiquiátricas               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Depresión</li> <li>- Ansiedad</li> <li>- Irritabilidad</li> </ul> </li> <li>• Deterioro cognitivo y demencia</li> <li>• Disfunción oculomotora</li> <li>• Distonía focal (extremidades, cuello uterino, laringe)</li> <li>• Paraparesia espástica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de tremor esencial like</li> <li>• Síndrome MSA (Multiple System Atrophy) like</li> <li>• Demencia rápidamente progresiva</li> <li>• Neuropatía CMT like</li> <li>• Paraparesia espástica</li> </ul>

#### 1.4.3.2 Falla ovárica prematura (FXPOI)

La falla ovárica prematura asociada a X Frágil (FXPOI) se caracteriza por una reserva ovárica disminuida que conduce a menstruaciones irregulares, nivel de FSH elevado, disminución de la fertilidad y en el caso más grave del espectro, insuficiencia ovárica prematura (Abrams

et al., 2012), que es el cese de la menstruación, antes de la edad normal de menopausia (Wittenberger et al., 2007), aproximadamente 5 años antes que las mujeres no portadoras (Willemsen et al., 2011). Este desorden se observa en aproximadamente 20% de las mujeres portadoras de la premutación (Abrams et al., 2012), en comparación con aproximadamente 1% de la población general. La disfunción ovárica subclínica que muestra los niveles elevados de hormona folículo estimulante, se observa otro 25% de las mujeres menores de 40 años con premutación (Hersh et al., 2011).

La gravedad y la edad de inicio de FXPOI se correlaciona de forma no lineal con el tamaño del expandido de la premutación, con un riesgo creciente exponencial en mujeres con 60 a 100 repetidos CGG y que disminuye en mujeres con premutaciones de 100 a 200 repetidos CGG (Abrams et al, 2012).

## 1.5 Datos histopatológicos y de estudios de imagen

### 1.5.1 Hallazgos neuropatológicos FXS

Se han reportado espinas dendríticas alargadas y delgadas en la mayoría de las sinapsis, lo que sugiere una posible desregulación en su desarrollo y maduración (ver FIG 15). FMRP tiene un importante rol en la regulación de la síntesis proteica a nivel de las dendritas neuronales. La síntesis proteica es importante para la transmisión sináptica, plasticidad, aprendizaje y memoria. Un rol propuesto para FMRP es que es un regulador negativo de la síntesis proteica estimulada por la activación del grupo de receptores metabotrópicos de glutamato 1 (mGluR) [Irwing et al, 2000].

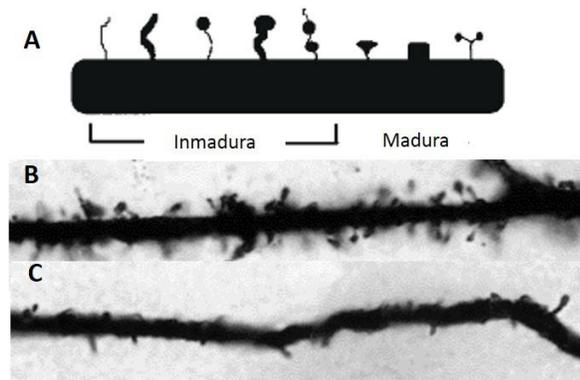


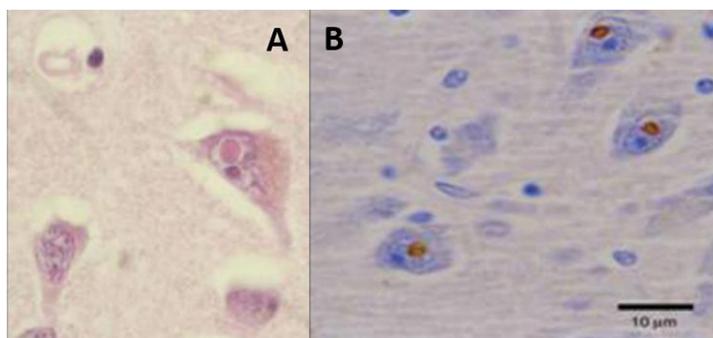
Figura 15. Ejemplo de la morfología típica de las dendritas impregnadas en Golgi. A. Esquema de la morfología de las espinas dendríticas definidas como maduras e inmaduras. B. Humano afectado por FXS. C. Control sano.

*Modificado de Cerebral Cortex Oct 2000; 10; 1038-1044*

FXS es parcialmente resultado de una respuesta exagerada de la respuesta de la estimulación mGluR (Hersh, 2011). También se ha observado un incremento en el volumen de la sustancia gris en núcleo caudado y giros fusiformes en adultos y jóvenes (Niños de 1 – 3 años).

### 1.5.2 Hallazgos neuropatológicos en FXTAS

El marcador neuropatológico de FXTAS es la presencia difusa en neuronas y astrocitos de todo el cerebro, más numerosos en el hipocampo, tálamo, ganglios basales (incluyendo la sustancia negra), oliva inferior y núcleos dentados (Hall DA, O’Keefe JA, 2012) de inclusiones intranucleares eosinofílicas (ver Fig 16), ubiquitina positivo, negativas para tau y alfa-sinucleína, que contienen mRNA de *FMR1*. Otro hallazgo encontrado es la pérdida de células de Purkinje, gliosis y afectación de la sustancia blanca con pérdida irregular cerebral y cerebelosa, con un patrón diferente del vascular, y espongiosis, particularmente, en los pedúnculos cerebelosos medios. Se ha encontrado una fuerte asociación entre la longitud del repetido CGG y el número de inclusiones intranucleares (Gallagher, 2012; Cortés-Velarde, 2012; Hagerman, 2013).

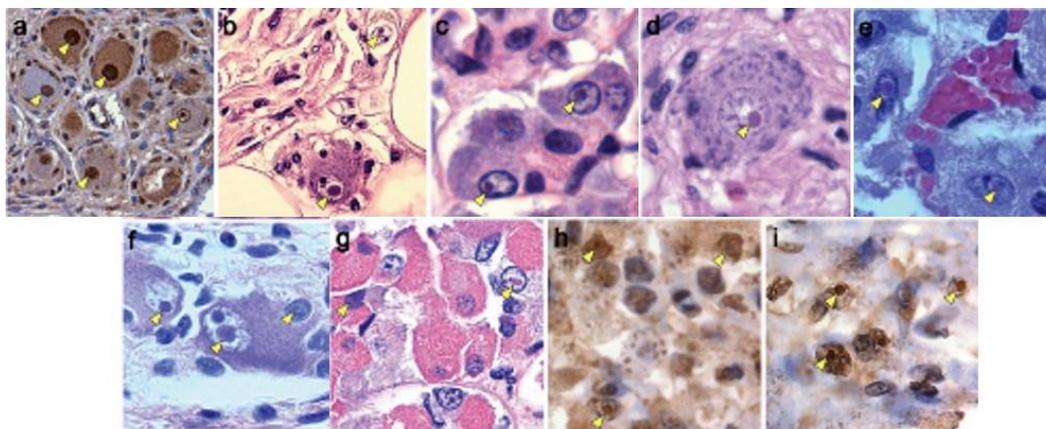


**Figura 16.** Imágenes histopatológicas de FXTAS. (A) Secciones de cerebro con inclusiones intranucleares eosinofílicas neuronales que van desde 2 – 5  $\mu$ m (H&E; 1000x) (B) Inclusiones intranucleares teñidas con anticuerpos anti-ubiquitina (1000x).

Modificada de *Other Hyperkinet Mov* 2012;2: <http://tremorjournal.org/article/view/56>

La médula espinal, ganglios autonómicos y el núcleo del nervio craneal XII también demuestran inclusiones intranucleares. Informes recientes muestran patología nervioso no

central extendida por órganos y sistemas, incluyendo inclusiones, en los órganos endocrinos, el tracto gastrointestinal, el corazón y los riñones (ver Fig 17) (Hall et al., 2012; Hagerman, 2013).



**Figura 17. Ejemplo representativo de las inclusiones intranucleares post-mortem, tejidos no SNC de pacientes con FXTAS.** En cada imagen hay puntas de flecha apuntando a las inclusiones. A. Miocardiocitos (ubiquitina; x400); B. Células ganglionares autonómicas cardíacas (H & E, x 600); C. Páncreas (ubiquitina, x 1000); D. Pared intestinal (H & E, x 400); E. Médula adrenal (H & E, x 600); F. Plexo mientérico estomacal (H & E, x 400); G. Pituitaria anterior (H & E, x 400); H. Células de Leydig testicular (ubiquitina, x 400); I. Túbulo distal renal (ubiquitina, x 400).

*Modificado de Acta Neuropathol (2013) 126:1–19*

### 1.5.3 Hallazgos de neuroimagen en FXS

Se debe considerar que los métodos de neuroimagen no están indicados en pacientes con FXS, sin embargo algunos pacientes puede contar con este estudio como parte del protocolo de estudio de un paciente con retraso mental.

#### 1.5.3.1 Hallazgos de neuroimagen en FXS

En la imagen por resonancia magnética (IRM) se han observado diferencias morfológicas en la estructura del cerebro en individuos con FXS comparado con controles sanos. Los hallazgos más frecuentes incluyen incremento del volumen del núcleo caudado, reducción del volumen del cerebelo comparado con sujetos sanos y con pacientes con trastorno del espectro autista. Otros hallazgos encontrados son incremento del volumen de los

ventrículos laterales, hipocampo, lóbulos parietales, tronco encefálico y reducción del volumen del vermis cerebeloso (Gallagher et al., 2012).

### 1.5.3.2 Hallazgos de neuroimagen en FXTAS

En la IRM de pacientes con FXTAS se ha observado de forma muy característica lesiones hiperintensas en secuencias T2 y FLAIR (ver Fig 18) en pedúnculos cerebelosos medios (incremento de señal en 60% de los hombres afectados y 13% de las mujeres afectadas), así como alteración en la sustancia blanca periventricular y subcortical. También se ha observado una reducción del volumen cerebral y cerebeloso (hombres>mujeres) en comparación con controles sanos, así mismo hay reducción del volumen de varias regiones que incluye el complejo amígdala-hipocampo bilateral, hipocampo izquierdo, tálamo izquierdo y tronco encefálico, cuerpo caloso y puente (Gallagher, 2012; Cortés-Velarde, 2012; Leehey, 2009). La sustancia blanca de cerebro y cerebelo presentan una intensidad de señal aumentada en T2 y una disminución en T1. Estos cambios en la sustancia blanca asemejan imágenes que se ven por lo general en isquemia microvascular, a excepción de que a menudo es subcortical y desigual (Leehey, 2009).

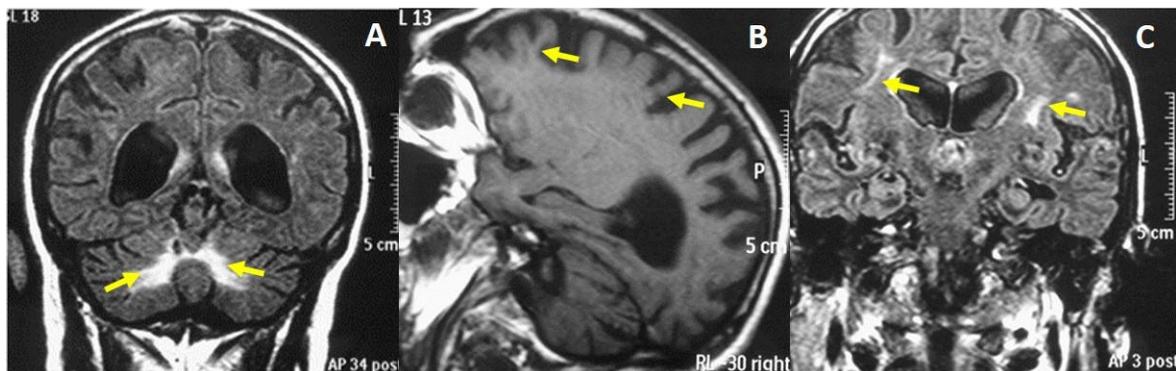


Figura 18. IRM de un paciente de 65 años con premutación en el gen FMR1 (95 repetidos). A. IRM Coronal: Hiperintensidad de los pedúnculos cerebelosos medios en secuencia FLAIR (Flecha). B. IRM corte sagital: Marcada atrofia frontal y parietal en secuencia T1 (Flecha). C. IRM corte coronal: Hiperintensidades en la sustancia blanca en secuencia FLAIR (Flecha)

*Modificada de Neurología 2007;22(4):251-252*

Algunos portadores asintomáticos presentan solamente atrofia cerebelosa. El volumen del tronco cerebral fue significativamente menor en los hombres portadores no afectados en comparación con personas sanas (Leehey, 2009).

## 1.6 Diagnóstico

De acuerdo a la sintomatología de la enfermedad y a las complicaciones de la misma, así como por la necesidad de implementar programas de asesoramiento, es prioritario establecer el diagnóstico debido a que un diagnóstico genético favorece la necesaria y adecuada intervención educativa en los pacientes afectados y por otro lado, tras el diagnóstico se podrían establecer los mecanismos oportunos de prevención, ofreciendo un adecuado consejo genético a las familias portadoras y de esta manera tratar de prevenir la transmisión a la descendencia (García, et al., 2008). Para un diagnóstico verás es necesario conjuntar un detallado análisis clínico, así como un estudio molecular de los pacientes con probables características de la enfermedad (ver FIG 19). Es importante verificar diversos aspectos para dirigir un diagnóstico de FXS de las alteraciones ligadas a la pre-mutación.

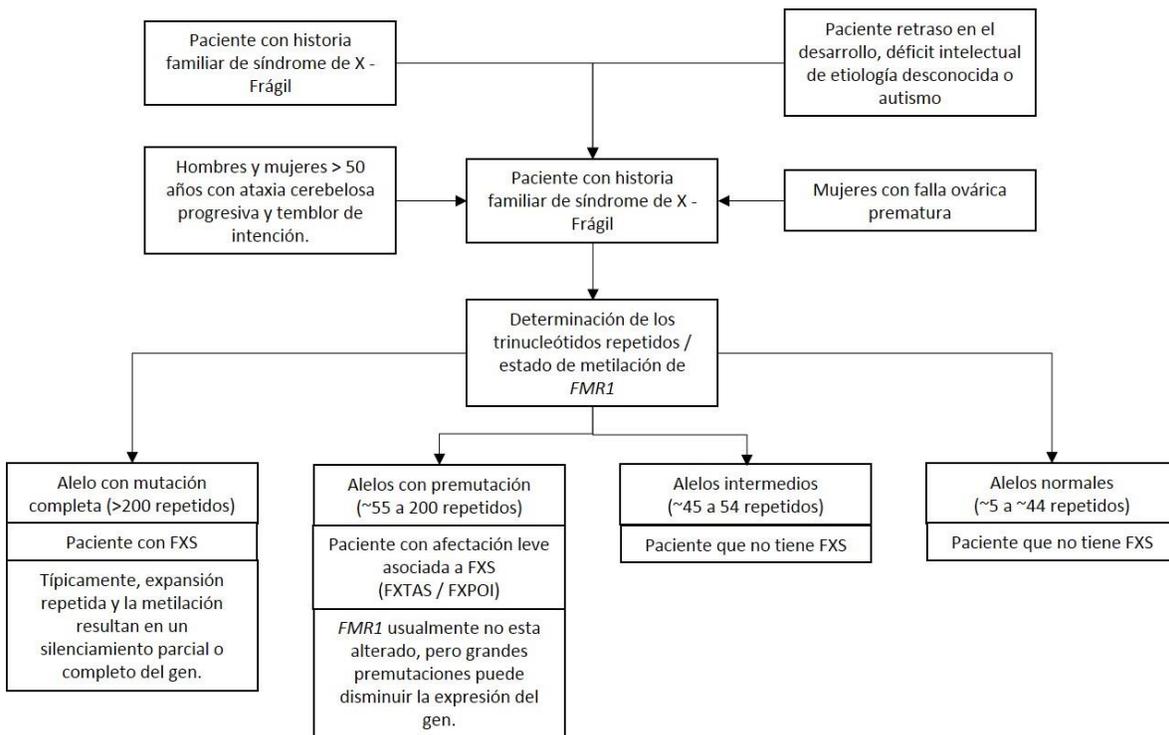


Figura 19. Algoritmo diagnóstico para Síndrome de X – Frágil y alteraciones relacionadas a FMR1.

Modificado de Pediatrics 2011; 127:994-1006.

### 1.6.1 Diagnóstico de Síndrome de X Frágil

Debido a que los niños con FSX pueden no tener alguna manifestación física, cualquier niño que presente retraso en el desarrollo, habilidades intelectuales limítrofes, retraso mental o diagnóstico de autismo sin una etiología específica debe someterse al estudio molecular para FXS para determinar el número de repetidos CGG. Aproximadamente del 2% – 6% de esta población de pacientes puede presentar la mutación en *FMR1* (Hersh et al., 2011).

En 1991 Hagerman desarrolló un puntaje con 13 apartados (anexo 3) en los cuales daba un puntaje de 0 en caso de que la característica no estuviera presente, 1 punto si la característica era cuestionable, dudosa o borderline y finalmente 2 puntos si la característica está presente, se suman los puntos y una puntuación total  $\geq 16$  resulta significativo para un resultado positivo ( $\geq 45\%$ ) (Hagerman et al., 1991; Taboada, 2003) (Ver Tabla 8).

	0 puntos	1 punto	2 puntos
Retraso mental	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperactividad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dificultad de atención	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Defensa táctil	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aleteo de manos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mordida de manos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Difícil contacto visual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Habla repetitiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperextensibilidad de la articulación metacarpo-falángica (doble articulación)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Orejas grande y/o prominentes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Macroorquidismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pliegue palmar único o línea de Sydney	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Historia familiar de retraso mental	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

0: No presente; 1: Cuestionable, dudoso o borderline; 2: Presente

En 2008 se publicó un estudio en el cual analizaron 285 varones en los centros de discapacidad de Burgos, España, utilizando el Test de Hagerman que se basó en el protocolo propuesto por Hagerman en 1991, donde se valoran 13 parámetros clínicos con puntuación de 0 a 2 para cada uno, que proporcionan un valor orientativo sobre el fenotipo del



Tabla 8 Criterios para el diagnóstico de genético de FXS (Monaghan et al., 2013)		
Niños	Hombres	Mujeres
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retraso del desarrollo incluyendo el específico del lenguaje.</li> <li>• Retraso motor o del lenguaje.</li> <li>• Discapacidad intelectual de etiología desconocida</li> <li>• Desorden del espectro autista</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayores de 50 años con inicio reciente de temblor, trastornos del equilibrio, o parkinsonismo sin diagnóstico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infertilidad inexplicable</li> <li>• Falla ovárica prematura               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Problemas de fertilidad o reproductivos asociados a niveles elevados de FSH</li> <li>- Historia familia de falla ovárica prematura o FSX</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individuos con historia familiar de FXS para determinar el estado de portadores y el riesgo de recurrencia.</li> <li>• Individuos con historia familiar de retraso mental o autismo de etiología desconocida.</li> </ul>		

El diagnóstico de FXS es benéfico para el paciente y la familia, debido que se establece una causa por la cual el niño presenta déficit cognitivo y/o problemas de conducta. El diagnóstico ayuda a la familia a enfocar adecuadamente estrategias para el manejo del paciente y así maximizar su potencial.

### 1.6.2 Diagnóstico de FXTAS

Existen diversas características que pueden ayudar a decidir a qué paciente se le puede sospechar de FXTAS como se especifica en la tabla 10.

Tabla 9 Directrices para decidir a quién hacer la prueba de FXTAS (Leehey, 2009)	
<b>Ataxia cerebelosa</b>	50 años o más; Causa desconocida
<b>Temblor de intención</b>	Presencia de ataxia cerebelosa, parkinsonismo, demencia; 50 años o más de edad, causa desconocida
<b>Demencia</b>	Presencia de ataxia cerebelosa, parkinsonismo, temblor de intención, 50 años o más de edad, causa desconocida
<b>Algunos signos de FXTAS</b>	Signo del pedúnculo cerebeloso medio; o historia familiar o en el paciente de falla ovárica prematura; o historia familiar de alteraciones asociadas a <i>FMR1</i>
<b>Atrofia de múltiples sistemas , subtipo cerebeloso*</b>	
* Sobre todo si tiene temblor de intención o una duración de la enfermedad mayor a lo esperado.	

Además, los criterios diagnósticos de FXTAS propuestos por Jaquemont se basan en criterios clínicos y radiológicos (Tabla 11), sin embargo es necesario la confirmación de la premutación de *FMR1* para establecer diagnóstico (Cortés-Velarde, 2012).

**Tabla 10 Criterios diagnósticos de Jaquemont para FXTAS (Hagerman, 2013; Cortés-Velarde, 2012)**

Criterios diagnósticos		Diagnóstico
<b>Clínicos</b>		Presencia de expansión del repetido CGG  • Definitivo: 1 mayor radiológico + 1 mayor clínico Inclusiones de FXTAS  • Probable: 1 mayor radiológico + 1 menor clínico 2 mayores clínicos  • Posible: 1 mayor radiológico + 1 menor clínico
<i>Mayores</i>	Temblor de intención Ataxia de la marcha Parkinsonismo	
<i>Menores</i>	Afectación de la memoria a corto plazo Alteración de funciones ejecutivas	
<b>Radiológicos</b>		
<i>Mayores</i>	Lesiones de sustancia blanca en pedúnculos cerebelosos medios o tronco encefálico	
<i>Menores</i>	Lesiones de sustancia blanca cerebrales Atrofia generalizada moderada - severa	
<b>Neuropatológicos</b>		
<i>Mayor</i>	Inclusiones FXTAS	

### 1.6.3 Diagnóstico de FXPOI

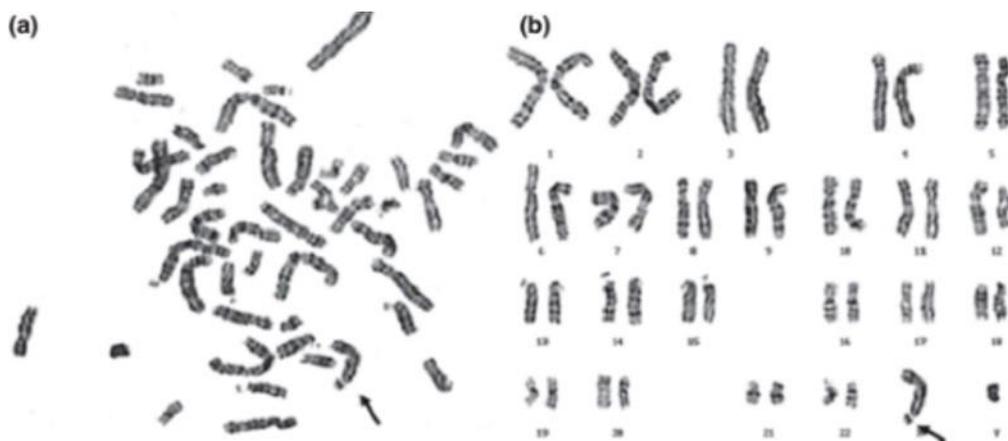
Se debe sospechar de FXPOI en el caso de:

- Mujer joven que pierde la regularidad de las menstruaciones durante tres o más meses consecutivos, con periodos largos sin menstruación.
- Problemas reproductivos asociados con elevación de los niveles de FSH, especialmente si:
  - Historia familiar de falla ovárica prematura
  - Historia familiar de síndrome de X – Frágil
  - Familiares masculinos y femeninos con retraso mental de etiología no especificada
  - Familiares con FXTAS o desordenes del movimiento como temblor o ataxia cerebelosa sin diagnóstico

Se debe realizar estudios hormonales: Prolactina en suero, FSH (rango de menopausia en una mujer <40 años). Estudio debe repetirse a los 2 meses, indicando además el estudio de estradiol en suero (E2), para confirmar hipogonadismo y por consiguiente, el diagnóstico de falla ovárica prematura (GIRMOGEN, 2006).

### 1.7 Estudio citogenético para FXS

El síndrome de X – Frágil se caracteriza citogenéticamente (ver FIG 21) por la presencia de una constricción o rotura a nivel de la banda q27.3, la cual es visible sólo empleando cultivos de linfocitos en medios pobres en ácido fólico (Lubs 1969; Milá M., et al., 1996).



**Figura 21.** Cariotipo con bandas G donde se observa el sitio frágil (Xq27.3) . Flecha negra indica el sitio frágil en el brazo largo del cromosoma X: A. Metafase; B. Cariotipo 46,Y fra(X)(q27.3)

*Modificado de Clin Genet 2013; 84: 577–580*

Durante más de 10 años (1979 – 1991), este fue el estudio de laboratorio de elección para confirmar el diagnóstico clínico, ya que cromosoma frágil en Xq27.3 puede detectarse en prácticamente todos los varones afectados, ya que se considera como un estudio positivo cuando se analizan >4% de metafases con un cromosoma X Frágil, pero difícilmente en las mujeres portadoras. Se ha visto que en las mujeres portadoras estudiadas, sólo el 20% presentaban fragilidad del cromosoma Xq27.3 y generalmente al realizar el estudio molecular se observa que estas mujeres son portadoras de la mutación completa, por lo tanto es difícil detectar mujeres y hombres portadores de la premutación, ya que se ha visto que es menos sensible y en ocasiones no se encuentra la fragilidad en ninguna metafase

(Milá M., et al., 1996). En este estudio la especificidad y sensibilidad clínica y analítica son insuficientes, en comparación con las pruebas moleculares (Winarni et al., 2013; Monaghan, et al., 2013), esto es debido a que el sitio frágil FRAXA en Xq27.3 se encuentra cerca de otro sitio frágil en Xq27.2 conocido como FRAXD, que es un sitio que en citogenética comúnmente se confunde con FRAXA, solo que FRAXD no presenta ningún significado patogénico (Debacker et al., 2007).

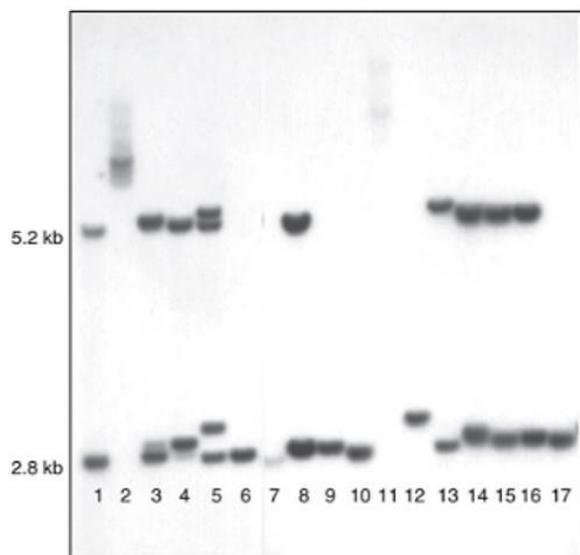
## 1.8 Pruebas moleculares para el diagnóstico

Se considera que la mayoría de los laboratorios necesitan usar más de un método, ya que un solo método no caracteriza todos los aspectos de la mutación completa del *FMR1*, y es preciso determinar el número de repetidos con precisión, ya que al no diferenciar entre mutación, mosaicismo y premutación puede modificar el asesoramiento genético que se otorgue al paciente, por esto mismo la ACMG (American Collage of Medical Genetics and Genomics) recomienda el Southern blot sobre la PCR, incluso mediante este último se puede determinar una premutación. Sin embargo la utilización otros métodos como RT-PCR o PCR sensible a metilación eliminan la necesidad de realizar un análisis de Southern blot para comparar resultados (Monaghan et al., 2013), pero de cualquier manera cada método presenta algunas ventajas y desventajas que es necesario conocer.

### 1.8.1 Southern blot

El método de Southern blot para el *FMR1* es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de FXS. Se utiliza para caracterizar muestras con números de repeticiones CGG demasiado grandes para amplificarlas mediante la PCR, así como para determinar el estado de metilación del gen (ver Fig 22). Esta técnica es costosa, requiere mucho tiempo y trabajo de laboratorio, además necesita grandes cantidades de ADN genómico y un marcaje mediante radioisotopos radioactivos, por lo que no es adecuada para la identificación sistemática de la población. Además para los casos limítrofes de normalidad, premutación

o mutaciones pequeñas, puede originar controversias debido a la amplia difusión de las bandas en un gel de agarosa (GIRMOGEN, 2006; Monaghan et al., 2013), esto es considerado como una limitante de la técnica ya que no puede dar el número exacto de repetidos CGG, cosa que es especialmente necesario para las portadoras y los alelos que se encuentran en la llamada zona gris (Pandey et al., 2004).



**Figura 22. Southern blot usando digestión con *EcoR1* y *EagI*, sonda StB12.3, utilizando electroforesis extendida para ilustrar varias muestras.** 1. Femenino normal. 2. Hombre con mutación completa. 3. Femenino con 28 y 52 repetidos, con un alelo activo pequeño predominante. 4. Femenino con 28 y 52 repetidos, con un alelo activo predominantemente largo. 5. Femenino con 18 y ~80 repetidos, con una inactivación X igual. 6. Masculino normal. 7. Masculino normal. 8. Femenino normal. 9. Masculino normal. 10. Masculino normal. 11. Masculino afectado (difusa). 12. Masculino con premutación. 13. Femenino con 20 y 70 repetidos, con un alelo pequeño virtualmente activo. 14. Femenino con 27 y 42 repetidos, el alelo alargado activo.

*Modificado de Genet Med 2013;15(7):575-586*

### 1.8.2 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Esta técnica se basa en la amplificación de la zona repetitiva y el posterior análisis del fragmento amplificado para medir su tamaño. Proporciona información sobre el número exacto de repeticiones por debajo de 100-120 CGG. No proporciona información sobre expansiones mayores ni sobre el estado de metilación de la isla CpG, por lo tanto esta técnica nos permite realizar la confirmación de normalidad en un individuo, y el diagnóstico de individuos con PM solo se haría en caso que se encuentre en el rango bajo, no permite

el diagnóstico de afectados, ni de portadores en el rango alto de la premutación. En un cierto número de mujeres (alrededor de un 30%), tan solo amplifica un solo alelo, debido a que son homocigotas por lo que tampoco da la información suficiente (GIRMOGEN, 2006).

El hecho de realizar el estudio por PCR se debe a que es más rápido, barato y proporciona un número exacto de repetidos CGG (con una variación de +/-2), mientras que el Southern es una técnica más compleja, necesita más tiempo y el número de repeticiones obtenido no es tan exacto, pero sí proporciona un resultado claro de alelos normales, premutados y con mutación completa (GIRMOGEN, 2006). Ante este panorama conociendo que los alelos con un elevado número de repeticiones (CGG)<sub>n</sub> son muy difíciles de amplificar, se han realizado diversas modificaciones a las condiciones de PCR, uso de diferentes coadyuvantes de reacción, para incrementar el límite de detección de la técnica, sin embargo la sensibilidad sigue siendo baja para expansiones muy grandes, además cabe la posibilidad de originar falsos negativos en el estudio. Por lo tanto se han desarrollado técnicas complementarias que pueden dar una alta sensibilidad para un diagnóstico de inclusión y/o exclusión de la enfermedad (GIRMOGEN, 2006).

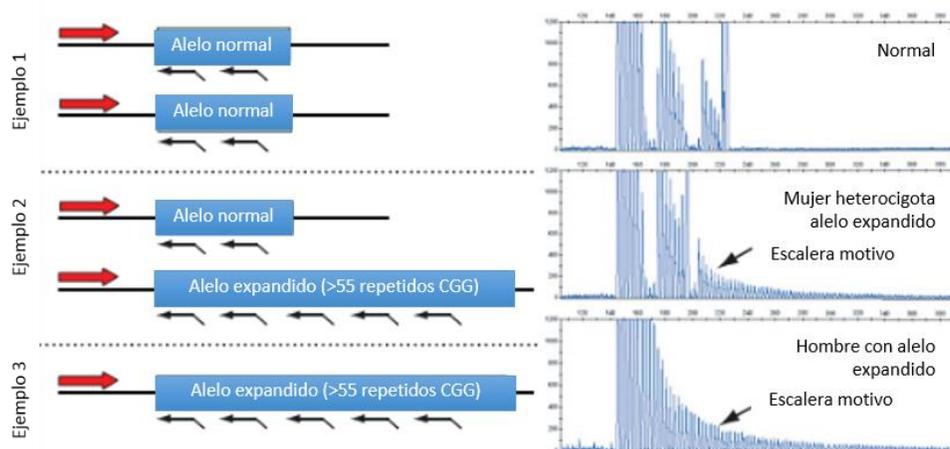
#### *1.8.2.1 PCR metilación*

Este método se utiliza para determinar la metilación del ADN e implica el tratamiento del ADN con la utilización de enzimas de restricción específicas para metilación, seguida por una PCR alelo-específica y la utilización de electroforesis capilar para la determinación del tamaño de los productos. Este método no solo determina el estado de metilación sino también el tamaño del FMR1 hasta de 250 repetidos, para determinar el tamaño de alelos >250 repetidos es necesario el análisis de Southern blot (Monaghan et al., 2013). Un problema de las técnicas basadas en metilación es que no detectan aproximadamente el 20% de las mujeres con mutación completa, donde la expansión se presente en el otro cromosoma X (Monaghan et al., 2013).

Es importante mencionar que la técnica de PCR sensible a metilación no es adecuada para el diagnóstico prenatal temprano, ya que las pruebas se basan en la metilación del DNA, y esta no se encuentra completa en los primeros meses de embarazo en las muestras de vellosidades coriónicas y aún no ha sido evaluada la que tan eficaz es si se realiza en amniocitos (Biancalana et al., 2006).

### 1.8.2.2 TP - PCR (Triplet repeat – primed PCR)

Como complemento de PCR que acota la región de repetidos CGG, se ha desarrollado una técnica conocida como TP-PCR, este nuevo método de biología molecular se usa para identificar rápidamente la presencia o ausencia de los expandidos CGG (Basehore et al., 2014).

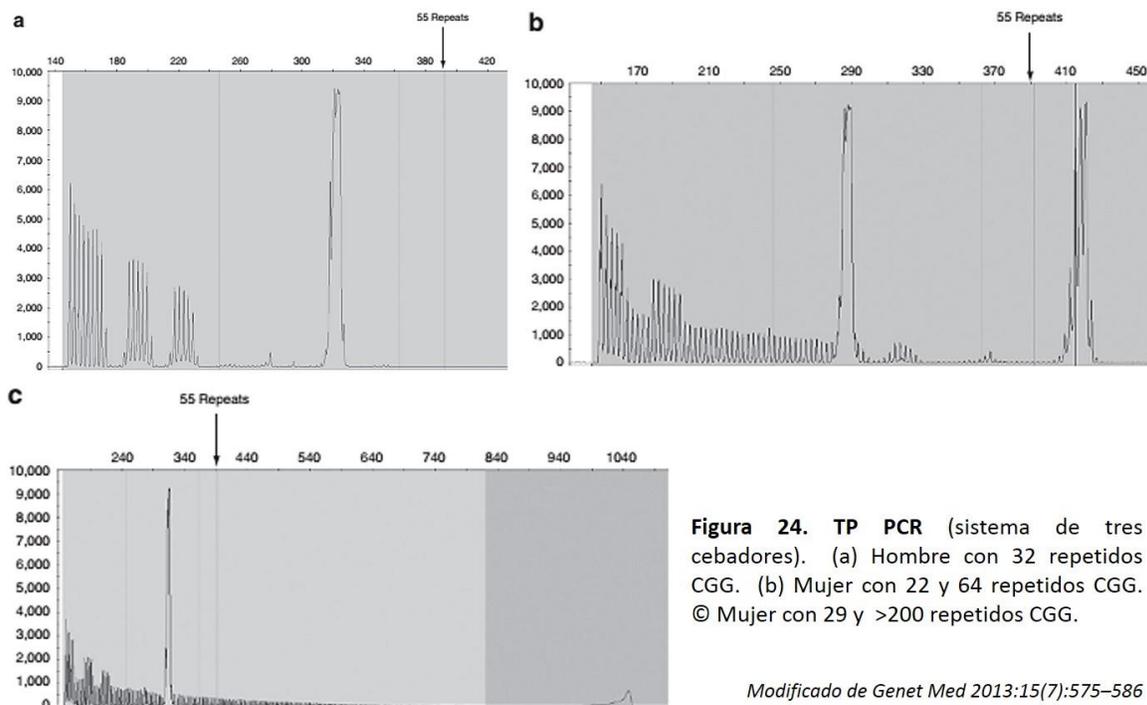


**Figura 23 PCR triple primer para los repetidos CGG en el gen *FMR1*.** El primer sentido se localiza río arriba de la región CGG del gen *FMR1*, mientras que el primer antisentido que se encuentra marcado con fluorescencia se une al azar dentro de la región de repetidos CGG en el gen *FMR1*. Estos primers generan amplicones de diferentes tamaños en función del número de repetidos CGG presentes. La presencia o ausencia de una “escalera” de trinucleótidos que se extiende más allá de un umbral 55 repetidos CGG puede reconocerse fácilmente y se utiliza generalmente para identificar alelos expandidos de *FMR1*. **Ejemplo 1:** Muestra el trazo en una mujer con ambos alelos normales, ninguno muestra el patrón de escalera característica de los alelos expandidos. **Ejemplo 2:** Ilustra un patrón típico de una mujer con un alelo normal y un alelo expandido, mientras que el **Ejemplo 3:** ilustra el patrón típico de un hombre con amplificación en el locus de *FMR1*.

Modificado de Curr. Protoc. Hum. Genet.80:9.5.1-9.5.19.

TP-PCR *FMR1* (ver FIG 23) es una técnica de biología molecular que se utiliza para determinar el número de repetidos CGG en el gen *FMR1* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar. El uso de esta técnica permite medir de forma precisa los alelos de hasta 200 CGG, así como identificar los

alelos con mutación completa con más de 200 CGG y detectar un perfil de picos característico que resuelve la cigosidad en muestras de mujeres. Se basa en una reacción de PCR con tres primers; un primer sentido, un primer antisentido y un primer que se une de forma aleatoria dentro de la región de repetidos CGG y genera amplicones de diferentes tamaños dependiendo del tamaño de la expansión del trinucleótido CGG (ver FIG 24). Una limitante de esta técnica es que no se puede establecer el número de repetidos CGG después de 200, sin embargo al no correlacionarse el número de repetidos con la severidad de la enfermedad y ser más importante saber si existe la mutación completa esto puede pasarse por alto. Otro inconveniente es que el grado de metilación del promotor tampoco puede detectarse por este método, por eso si queremos conocer el grado de metilación y el tamaño exacto después de 200 repetidos se debe hacer el estudio mediante Southern blot (Monaghan et al., 2013; Basehore et al., 2014).



### 1.8.3 MS - MLPA (Methylation specific Multiplexed ligation probe amplification)

La sonda de MLPA ha sido descrita para identificar a los varones con alelos metilados con X frágil (FIG. 24). En este método, la secuencia específica de las sondas se hibrida con alelos

metilados y con los no metilados. Las sondas que se ligaron, se digieren con una endonucleasa de restricción sensible a metilación simultáneamente. Un conjunto cebador universal PCR amplifica sólo las sondas que se ligan y no son digeridas, lo que indica alelos metilados (Monaghan et al., 2013).

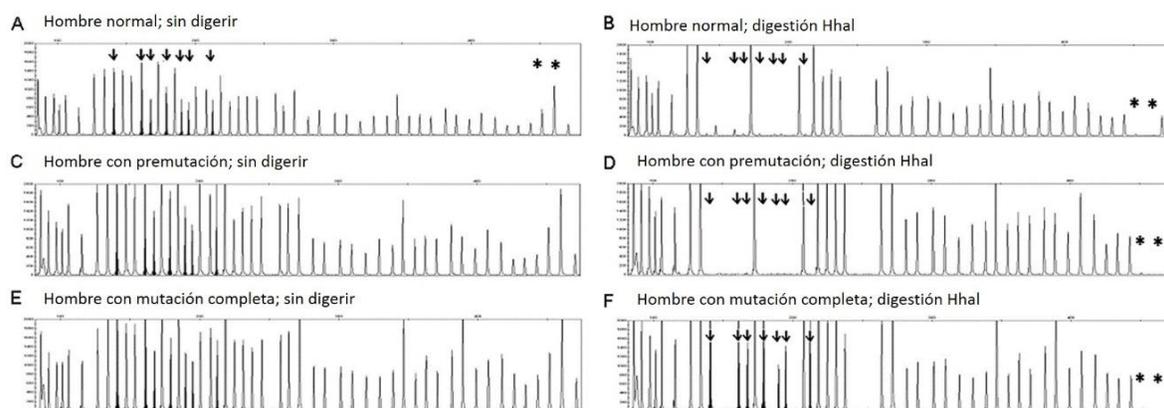


Figura 25. Electroferogramas que muestran los resultados del análisis de MS-MLPA del gen FMR1: A, B = Hombre normal; C, D = Hombre con premutación; E, F = Hombre con mutación completa. (Flechas: Sondas específicas para la metilación de FMR1; Asteriscos: Sondas encargadas del control de la digestión)

Modificado de Gatta et al. BMC Medical Genetics 2013, 14:79

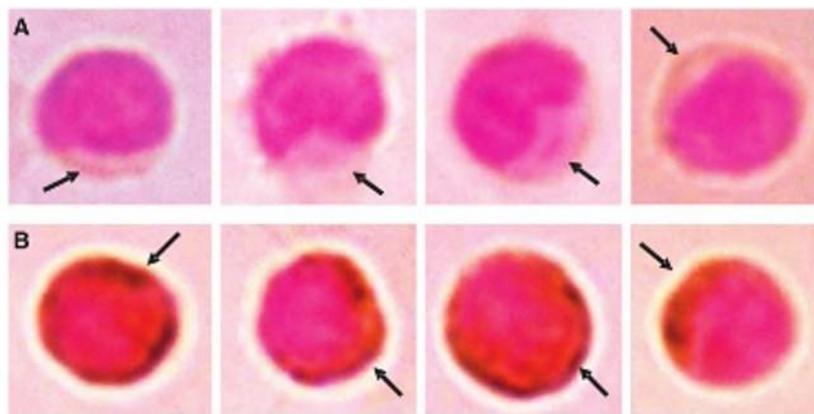
## 1.9 Inmunohistoquímica

Willemsen et al, desarrollaron el protocolo para la detección directa de la proteína FMRP, por medio de Inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales de ratón, que permite la identificación de las posibles personas afectadas. El procedimiento puede ser aplicado para el diagnóstico posnatal, en frotis de sangre periférica y raíces de cabello, y prenatalmente en muestras de vellosidades coriónicas. El estudio consiste en la determinación de la expresión de la proteína, en forma de porcentaje. (Ramos-Fuentes, 2001; Vindas-Smith, 2011). Sin embargo este tipo de estudio presenta diversas limitaciones y sesgos.

### 1.9.1 Inmunohistoquímica en linfocitos

Consiste en la toma de una o dos gotas de sangre que se extendían en un portaobjetos, los resultados pueden obtenerse en pocas horas, y esto supone un importante ahorro de tiempo respecto a las técnicas con DNA. Willemsen et al., establecieron como puntos de corte (porcentajes) de expresión de la proteína en varones 42% (por debajo=afectado; por

encima=sano) y en mujeres 83% (por abajo=afectada; por encima=sana); estos valores poseen una sensibilidad del 100% en ambos sexos y una especificada del 100% en varones y del 41% en mujeres, para esto es necesario examinar como mínimo 80 linfocitos en varones y 50 en mujeres. Este test es “ideal” para el diagnóstico en varones (ver Fig 26) por que discrimina sin ningún solapamiento entre varones normales y afectados (mutación completa); sin embargo, este no es válido para la detección de individuos con premutación, ya que el alelo portador tiene una transcripción normal de la proteína. (Ramos-Fuentes, 2001; Vindas-Smith, 2011)

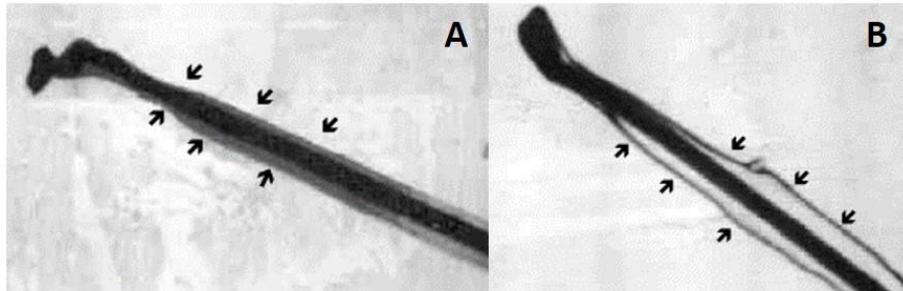


**Figura 26 Inmunohistoquímica en SP para FXS.** A. Linfocitos de pacientes con FXS que muestran un citoplasma limpio sin la proteína FMR1 (flechas). B. Linfocitos individuos sanos donde se muestra intensamente coloreado el citoplasma donde se encuentra la proteína FMR1 (flechas).

*Modificado de Gentic Testing and Molecular Biomarkers, Vol. 14, No. 4, 2010*

### 1.9.2 Inmunohistoquímica en raíz de cabello

En 1999 Willemsen et al., introdujeron esta forma de análisis de la expresión del a FMRP en el FXS, en raíces de cabello (ver Fig 27). Ellos establecieron que un 77% es el intervalo mínimo en varones no afectados de FXS, mientras que los afectados muestran un nivel de expresión máxima del 33% de cabello, cifras claramente separables y que no ofrecen ningún problema de solapamiento, ni de resultados ambiguos. Para validar los resultados se recomienda estudiar un mínimo de 10 cabellos, y asegurarse de que todos posean la raíz en uno de sus extremos (Ramos-Fuentes, 2001).



**Figura 27. Inmunohistoquímica en cabello para FRS.** Cabello de un individuo sano en el que se ve (zona oscura periférica – flechas-) la expresión de FMRP en la raíz y tallo del cabello. B. Cabello de individuo con FRS en la que no hay expresión de la FMRP (tallo claro –flechas-).

*Modificado de REV NEUROL 2001;33 (Supl 1): S9-S13*

Según lo reportado por varios autores el estudio de la expresión de FMRP en raíces de cabello parece ser el estudio más conveniente para el tamizaje poblacional y sobre todo cuando hay que enviar muestras desde lugares mal comunicados y en los que el envío de sangre pudiera verse afectado (GIRMOGEN 2006; Vindas-Smith et al., 2011). Sin embargo su especificidad y sensibilidad no es del todo adecuada, ya que se considera que en hombres en los que menos del 42% de los linfocitos expresan la proteína, hay una sensibilidad y una especificidad del 100%, se ha visto que en las mujeres que requiere un umbral de 83% de los linfocitos para obtener una sensibilidad y especificidad del 41% (Biancalana et al., 2006), esto es lo que hace que esta técnica no pueda ser considerada como un estándar de oro para el diagnóstico, ya que es necesario confirmar el diagnóstico con PCR o Southern blot, además de que si no se cuenta con el observador adecuado y la muestra no está bien tomada el porcentaje de expresión de la proteína se vea afectada.

### 1.10 Diagnósticos diferenciales

Condiciones que deben considerarse en el diagnóstico diferencial se incluyen las siguientes (GeneReviews, 2012; Saldarriaga et al., 2014):

- **Síndrome de Sotos:** Se caracteriza por la apariencia típica facial, crecimiento excesivo, y la discapacidad de aprendizaje que van de leves a severos. Se asocia con problemas de conducta, anomalías cardíacas congénitas, ictericia neonatal, anomalías renales,

escoliosis, convulsiones y un ligero aumento del riesgo de teratoma sacrococcígeo y neuroblastoma. Aproximadamente el 80% -90% de las personas con síndrome de Sotos tienen una mutación demostrable o supresión de NSD1.

- **Síndrome de Prader-Willi (SPW):** Un pequeño grupo de personas con el síndrome de X frágil tienen la hiperfagia y obesidad características de PWS. PWS se caracteriza por hipotonía severa y dificultades de la alimentación infantil, seguido por la aparición de la primera infancia de la alimentación y el desarrollo de la obesidad mórbida excesiva a menos controlada. Todas las personas que tienen retraso en el desarrollo y el deterioro cognitivo. Las rabietas, terquedad, conductas manipuladoras y características obsesivo-compulsivas son comunes. El hipogonadismo (hipoplasia genital, la pubertad incompleta, y, en la mayoría, infertilidad), baja estatura y apariencia facial característica son comunes. El diagnóstico es mediante pruebas de metilación basado en el ADN para detectar la impronta anormal específicos del padre dentro de la región crítica de Prader-Willi en el cromosoma 15.
- **Autismo:** Comportamiento similar al del autista se encuentra con frecuencia en las personas con síndrome X frágil.
- **Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH):** La hiperactividad se ve con frecuencia en las personas con síndrome X frágil.
- **Síndrome XE Frágil (FRAXE):** Discapacidad intelectual leve (no tan grave como que normalmente se ve en el síndrome X frágil) sin características físicas consistentes ha sido descrito en los hombres con expandido CCG repite en FMR2 en el sitio frágil FRAXE. FRAXA y FRAXE son sitios frágiles distintos, aunque en estrecha proximidad en el cromosoma X. Los genes que abarcan los dos sitios frágiles son designados FMR1 (FRAXA) y FMR2 (FRAXE). Sin embargo, los genes no tienen ninguna similitud detectable a nivel de ADN y las entidades clínicas asociadas son discretas.
- **Síndrome de Klinefelter:** Talla alta, hipogonadismo, déficit intelectual (20%).
- **Déficit intelectual y otros sitios frágiles (FRAXD y FRAXF):** Alteración en FRAXD y FAM11A respectivamente.

**Tabla 12. Diagnósticos diferenciales de FXS.** (Saldarriaga et al. 2014)

Síndrome	Déficit intelectual	Talla	Perímetro cefálico	Tamaño testicular	Peso
<b>FXS</b>	Leve a moderado	+++	++	+++	++/+++
<b>Síndrome de Sotos</b>	Leve a problemas de aprendizaje	+++	+++	++	++
<b>Síndrome de Prader Willi</b>	Leve a moderado	+	++	+	+++
<b>Klinefelter</b>	Ausente o leve	+++	++	+	++/+++

+: Pequeño para la población general; ++: Igual a la población general; +++: Mayor que la población general

### 1.11 Asesoramiento genético

El síndrome de X-Frágil y los desórdenes asociados a *FMR1* (FXTAS y POI) tienen una herencia dominante ligada al cromosoma X, con penetrancia reducida (Willemssen et al., 2011). El asesoramiento genético se recomienda para todos los miembros de la familia que podrían estar afectados, existiendo un riesgo de tener la premutación y/o de heredarlo a su descendencia; este aspecto es crítico para proveer de información sobre el tipo de herencia, la variabilidad de las características fenotípicas en personas afectadas con la mutación completa o la premutación, y ofrecer opciones sobre el diagnóstico molecular; se puede informar sobre opciones de planificación familiar en el caso de pacientes con riesgo de tener un hijo afectado (Hersh et al., 2011).

**Tabla 13. Riesgo de transmisión de la mutación a la descendencia según el género del progenitor** (Pugin et al., 2014)

Progenitor	Tipo de mutación	Riesgo de hijo afectado	Riesgo de hija afectada
<b>Varón</b>	Premutación	0%	100% Premutación
	Mutación completa	0%	100% Mutación completa
<b>Mujer</b>	Premutación	50% Mutación completa o premutación*	50% Mutación completa o premutación*
	Mutación completa	50% Mutación completa	50% Mutación completa

\*El riesgo de que una premutación se amplifique a mutación completa dependerá del tamaño de la premutación (Ver tabla 14)

El riesgo de transmitir la mutación a la descendencia depende del género (Tabla 13) y del número de repetidos, así mismo se puede ver modificado por el número de interrupciones AGG que presente la madre con la premutación, como se puede observar en la Tabla 14,

también en esta tabla se observa que el riesgo de expansión se ve ligeramente modificado por la edad materna, la cual al ser mayor también favorece la expansión hacia FM del repetido CGG, las interrupciones AGG también modifican esto último.

**Tabla 14 Riego de expansión a mutación completa en un varón, en base al número de repetidos CGG, las interrupciones AGG y la edad materna (Hersh, 2011; Yrigollen et al., 2012; Yrigollen et al., 2014; Saldarriaga et al., 2014)**

Número de repetidos CGG	Edad materna	% Riesgo de expansión a mutación completa	0 Interrupciones AGG	1 Interrupción AGG	2 o 3 Interrupciones AGG
55 - 59	20	3.7	0.4 %	0.1 %	0 % - 0.1 %
	30		1.6 %	0.5 %	0 % - 0.3 %
	40		6.5 %	2.3 %	0.1 %
60 – 69	20	5.3	1.5 – 6.3 %	0.5 – 2.2 %	0 – 0.1 %
	30		6.4 – 22.9 %	2.2 – 9 %	0.1 – 0.5 %
	40		23.1 – 56.6 %	9.1 – 30.2 %	0.5 – 21 %
70 – 79	20	31.1	22.7 – 56 %	8.9 – 56 %	0.5 – 2.1 %
	30		56.3 – 84.8 %	30 – 84.7 %	2.1 – 8.5 %
	40		85 – 96.1 %	65.3 – 96.1 %	8.9 – 28.9 %
80 – 89	20	57.8	84.7 - 96 %	64.8 - 88.9 %	8.4 - 28.4%
	30		96 – 99.1 %	89 – 97.2 %	28.7 – 63.6 %
	40		99.1 99.8 %	97.2 - 99.4 %	63.8 – 88.4 %
90-99	20	80.1	99 – 99.8 %	97.2 - 99.3 %	63.3 - 88.2 %
	30		99.8 - 99.9 %	99.3 – 99.8 %	88.3 – 97 %
	40		100 %	99.8 – 100 %	97.1 – 99.3 %
100 – 109	20	100	99.9 – 100 %	99.8 -100 %	97 – 100%
	30		100 %	100 %	99.3 – 100 %
	40		100 %	100 %	99.8 – 100 %
≥ 110	20	100	100 %	100 %	99.8 – 100 %
	30		100 %	100 %	100 %
	40		100 %	100 %	100 %

Un varón portador de una premutación transmitirá está al 100% de sus hijas, el gen mutado de estas mujeres heredado por el padre tendrá un número de repeticiones CGG igual o ligeramente expandido. Sin embargo el número de repetidos CGG puede cambiar a una expansión, cuando una mujer portadora de la premutación lo hereda a un varón, lo que puede resultar en una mutación completa y por lo tanto FXS en la descendencia. Una

pequeña expansión que resulta en premutación, o una expansión mayor que resulte en una mutación completa en sus hijos, como se puede observar en la tabla 13 (Hersh et al, 2011), pudiendo existir cierta variación. Una premutación en un varón no se transmitirá a su descendencia masculina, debido a que su hijo heredará el cromosoma Y de su padre.

El FMRP juega un rol importante en la espermatogénesis, en un estudio se encontró que los hombres con FXS tienen un número significativo de espermatozoides malformados y una reducción en el número normal de las espermátides diferenciadas, lo que ocasiona una disminución de la fertilidad. Una mutación completa no puede mantenerse durante la espermatogénesis; por lo tanto, los espermatozoides contienen solo FMR1 expandido con el repetido CGG en el rango de premutación (Hersh et al, 2011).

### 1.12 Diagnóstico prenatal

Las opciones para diagnóstico prenatal en FXS incluyen amniocentesis y biopsia de vellosidades coriales cuando se conoce que los padres son portadores de la mutación. La amniocentesis es precisa y fiable cuando se utiliza en combinación con los métodos de Southern blot y PCR; también se puede determinar el estado de metilación y el número de repetidos CGG en los amniocitos. La detección del número de repetidos CGG para el FXS es correcta y fiable, sin embargo hay consideraciones especiales que deben tenerse en cuenta en relación con el grado de metilación del tejido placentario, ya que el patrón de metilación observado en el tejido placentario en las 10 a 12 semanas de gestación es incompleta y no siempre refleja la observada en el recién nacido (McConkie-Rossell et al., 2005).

Las personas con riesgo de transmisión a su descendencia de la mutación de X Frágil tienen una variedad de opciones pre y posconcepcionales disponibles. Algunas parejas pueden considerar la adopción con el fin de evitar el riesgo y la transmisión. El embarazo puede lograrse en los portadores de mutaciones con la utilización de donadores de ovulo o espermatozoides respectivamente, dada la alta prevalencia del síndrome de X Frágil en la población

general, los posibles donantes de gametos deben ser examinados en busca de estas mutaciones (McConkie-Rossell et al., 2005).

El diagnóstico genético pre-implantación (PGD) es posible, pero debe utilizarse con cautela. El PGD se puede realizar ya sea en el cuerpo polar o en biopsia en los embriones. Se han encontrado dificultades en la recuperación de ovocitos, número de embriones viables, la capacidad de distinguir los alelos y la amplificación del repetido CGG. En un estudio realizado por Platteau et al en 2002 en un centro de PGD encontró que el volumen de los ovocitos recuperado era reducido, y solo el 55% de los ovocitos fecundados llegó a la etapa de biopsia, lo que reduce la oportunidad de lograr un embarazo, así mismo dado que las paciente con premutación tienen riesgo de falla ovárica prematura, estas deben ser evaluadas por subfertilidad antes de considerar el PGD (McConkie-Rossell et al., 2005).

### 1.13 Terapéutica

Hasta la fecha, no existe tratamiento farmacológico disponible que aminore el déficit cognitivo en FXS. Hay una variedad de agentes que se han utilizado para las alteraciones psicológicas y del comportamiento como se puede observar en la tabla 15 (Gallagher et al., 2012).

	<b>Dificultades del comportamiento</b>	<b>Atención</b>	<b>Conductas repetitivas</b>	<b>Hiperactividad</b>	<b>Cognición</b>	<b>Inestabilidad del comportamiento / depresión</b>	<b>Ansiedad</b>
<b>Estimulantes</b> • Metilfenidato • L-acetilcarnitina	+	+	+	+	-	-	-
<b>Antidepresivos</b> • SSRIs • TCAs	-	-	+	-	-	+	+
<b>Anticonvulsivos</b>	+	-	-	-/+	-	+	+

• Valproato de sodio							
• Carbamacepina							
Antagonistas mGluR5	+	+	+	+	-	-	-
• MPEP							
• AFQ056							
• Fenobam							
Minociclina	+	-	-	-	+	-	-

+ : Beneficio potencial; - : No hay evidencia para el beneficio; +/- : Evidencia equivoca de beneficio; SSRIs: Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina; TCAs: Antidepresivos tricíclicos; mGluR: Receptores de glutamato metabotropicos; MPEP: 2-metil-6-feniletinil-piridina

### 1.14 Manejo

Las personas con síndrome de X – Frágil y los trastornos relacionados con *FMR1* enfrentan desafíos a lo largo de su vida. Por lo tanto, la coordinación de los servicios médicos, vigilancia del desarrollo y comportamiento con los recursos disponibles en la comunidad pueden maximizar el potencial de las personas afectadas y reducir al mínimo los factores de estrés enfrentando otros miembros de la familia, esto en base con la vigilancia de estos pacientes mediante las acciones observadas en la tabla 16 (Hersh et al., 2011).

	Infancia a 1 año			Infancia temprana 1 – 5 años	Infancia tardía 5 – 12 años	Adolescencia a adultez temprana, ≥13 a
	Recién nacido	1 – 6 meses	6 – 12 meses			
<b>Examen</b>						
Oftalmológico	✓ <sup>a</sup>	✓ <sup>a</sup>	✓ <sup>a</sup>	✓ <sup>a</sup>	✓	✓
Orejas, nariz, garganta	-	✓ <sup>b</sup>	✓ <sup>b</sup>	✓ <sup>b</sup>	✓	✓
Esquelético	✓ <sup>c</sup>	-	-	-	✓	✓
Cardiaco	-	-	-	-	✓ <sup>d</sup>	✓ <sup>d</sup>
Medición testicular	-	-	-	✓	✓	✓
Desarrollo	✓	✓	✓ <sup>e</sup>	✓	✓	✓
Neurológico	-	-	✓ <sup>f</sup>	✓	✓	✓ <sup>g</sup>

Comportamiento	✓ <sup>h</sup>	✓ <sup>h</sup>	✓ <sup>h</sup>	✓ <sup>h</sup>	✓ <sup>i</sup>	✓ <sup>i</sup>
<b>Normas de prevención</b>						
Genética	✓ <sup>j</sup>	✓	✓	✓	✓ <sup>k</sup>	✓ <sup>k</sup>
Psicosocial	✓ <sup>l</sup>	-				
Grupos de soporte	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Intervención temprana, terapias físicas y otros	-	✓	✓	✓	✓	✓
Comportamiento	✓	✓	✓	✓	✓ <sup>m,n</sup>	✓ <sup>m,n</sup>
Educación	-	-	-	✓ <sup>o</sup>	✓ <sup>p</sup>	✓ <sup>p</sup>

a. Estrabismo puede ocurrir en cualquier momento entre el nacimiento y los 4 años de edad.  
b. Otitis serosa puede ocurrir durante la infancia, y la pérdida de la audición resultante pueden deteriorar aún más el desarrollo de la habla. Se pueden necesitar tubos de ventilación.  
c. Laxitud articular, luxación de cadera, pie equino varo.  
d. Prolapso de la válvula mitral es posible.  
e. Pueden comenzar a verse Irritabilidad, hipotonía, berrinches.  
f. Las convulsiones ocurren con mayor frecuencia en este grupo de edad.  
g. Evaluación para las convulsiones atípicas, especialmente cuando existen síntomas neurológicos o si la función intelectual disminuye.  
h. Los niños con FXS a menudo se describen como rígido, irritable y puede alimentarse mal.  
i. Arrebatos violentos pueden aparecer en este grupo de edad.  
j. Revisión de pruebas moleculares y discutir los riesgos dentro de la familia; asesoramiento genético es altamente recomendable.  
k. Revisión del riesgo de tener descendencia afectada.  
l. Hablar sobre la necesidad del apoyo familiar y el que se va a decir a otras personas, al momento del diagnóstico, aparte de la edad del niño.  
m. Hablar sobre sexualidad  
n. Preguntar a los padres sobre la presencia de arrebatos violentos  
o. Revisar el programa preescolar con respecto a las necesidades educativas especiales y planeación del futuro.  
p. Discutir sobre la necesidad de planificar la formación profesional.

### 1.15 Panorama en México

En México se han realizado algunos estudios sobre el síndrome de X Frágil, uno de los primeros que se realizó fue el hecho por Díaz – Gallardo, et al., en 1995 en el cual incluían 58 individuos, 29 hombres y 29 mujeres de 10 familias con al menos un caso de FSX, en total 18 afectados fueron estudiados. Se utilizaron como grupos control a 39 hombres y 37 mujeres sanos sin antecedentes de retraso mental. En este estudio para la realización de la prueba molecular recurrieron a PCR y a Southern blot, previamente a los pacientes con alta sospecha FXS se les realizó el estudio citogenético en medio pobre en folatos para observar el sitio frágil en Xq27.3. Con los datos encontrados en los casos y controles se pudo obtener

lo siguiente, el rango de número de repetidos en los pacientes del grupo control fue de 26-43, el de portadoras fue de 83-185 y de los pacientes afectados fue de 231-915 (Díaz-Gallardo et al., 1995), uno de los principales problemas del estudio es que es costoso y fue necesario la utilización de sondas radioactivas para la técnica de Southern blot, además que solo se describe un número de repetidos aproximado.

En el año 2000 González – del Ángel et al., realizó el estudio molecular a base de PCR y confirmación mediante Southern blot para FXS en pacientes con retraso mental de etiología desconocida, con 62 familias mexicanas no relacionadas, donde se estudiaron 53 hombres y 9 mujeres, 20 pacientes tenían historia familiar de retraso mental, pero solo dos compatibles con herencia ligada a X (González-del Ángel et al., 2000). Con el estudio de PCR obtuvieron como resultado 2 pacientes positivos para la expansión del repetido CGG. El primero de los pacientes presenta historia familiar de RM ligado a X y fenotipo sugestivo de FXS. El segundo paciente no tenía un fenotipo específico, pero presentaba crisis convulsivas y retraso mental; sin embargo el hecho de que se incluyeran tantos pacientes de los cuales pocos tenían datos clínicos sugestivos de FXS, ocasiona que al momento de obtener resultados sean pocos los pacientes con un estudio positivo.

En 2005 Rosales – Reynoso, et al., reportaron la diversidad en la distribución del número de repetidos en el gen *FMR1* en población mexicana sana. Estudiaron 129 mexicanos mestizos no relacionados de la región occidental de México, de los cuales 46 eran hombres FRAXA negativos con retraso mental y 83 individuos sanos (38 hombres y 45 mujeres). Encontrando que los individuos sanos tenían 16-40 repetidos CGG, en pacientes con premutación el rango iba de 64-76, este paciente presentaban retraso mental leve sin otros datos de FXS. Este estudio a pesar de no ser un estudio en pacientes, da una visión del comportamiento de los repetidos en la población mexicana, sin embargo al enfocarse a una población del bajío, no representa de manera total el comportamiento de nuestra población, ya que el background genético de la población mexicana es muy diverso (Rosales-Reynoso et al., 2005).

Barros – Núñez, et al., reportaron la diversidad en la distribución de las variaciones genéticas en el gen *FMR1* en cuatro poblaciones mexicanas: Mestizo, huichol, purépecha y tarahumara. Estudiaron 412 individuos sanos no relacionados: 157 individuos (107 hombres y 50 mujeres), 110 tarahumaras (80 hombres y 30 mujeres), 107 huicholes (76 hombres y 31 mujeres) y 38 purépechas (36 hombres y 2 mujeres). La distribución de repetidos del gen *FMR1* fue el siguiente: Mestizos son 16 a 76 repetidos, con un promedio de 32; tarahumaras de 15 a 59 repetidos, con un promedio de 32; huicholes de 19 a 87 repetidos, con un promedio de 30; purépechas de 25 a 55 repetidos con un promedio de 29 (Barros-Núñez et al., 2008). Con estos datos pudieron encontrar que el número repetidos del triplete CGG de 32 es el más frecuente en la población mestiza, tarahumara y purépecha, sin embargo la frecuencia de 30 repetidos en los huicholes no tiene comparación con otras etnias mexicanas u otros grupos poblacionales del mundo, y en ellos se muestra una distribución unimodal. La frecuencia de alelos premutados en la población mexicana es significativamente alta y esto contrasta con la baja frecuencia de alelos en la zona gris, esto es compatible con lo que se ha observado en poblaciones asiáticas, caucásicas y brasileñas. La mayoría de los alelos se encuentran entre los 31 – 35 repetidos, con un promedio de 32 repetidos, es posible suponer que este alelo podría tener una alta predisposición para expandirse, alcanzar el estado premutación que los situados en la zona gris. Este estudio es importante ya que permite darnos una idea de cuál es el promedio de expandidos en la población nativa mexicana y podría ayudar a explicar por qué en los estudios en pacientes con déficit intelectual, a pesar de ser el FXS una de las principales causas de déficit intelectual a nivel mundial, en México tiene una baja incidencia, ya que al tener en promedio alelos de 32 repetidos la probabilidad de que ese alelo expanda a una mutación completa es baja, sin embargo el hecho de que no se haga un estudio más representativo de toda la población ocasiona que no se pueda generalizar, ya que la mayoría de la población ya no es nativa pura.

En 2010 Romero-Espinoza et al., compararon la expresión de la proteína FMRP mediante Inmunohistoquímica en linfocitos de sangre periférica en relación con el estado de metilación del DNA de pacientes sanos y con FXS, como método de tamizaje previo a una confirmación mediante Southern blot, ellos incluyeron 22 individuos de los cuales 11 eran masculinos con molecular positivo para FXS y 11 masculinos sanos como controles; se tomaron tres gotas de sangre de cada paciente a las cuales se les agregó un anticuerpo monoclonal para FMRP, y se leyeron 100 linfocitos, considerando una expresión de 0 a 10% como negativa y por lo tanto un resultado positivo para FXS y en el caso de los controles tomaban 73 a 94% de expresión como positiva y confirmaba el hecho de que eran pacientes sanos, ellos concluyen que es una técnica útil como tamizaje, solo que al ser una prueba cualitativa es necesario la confirmación mediante otras técnicas de biología molecular, además de ser operador dependiente, que en caso de tener un técnico adecuado se obtiene una sensibilidad y especificidad del 100% en comparación con el Southern blot, por lo que es limitado su uso diagnóstico.

## 2 JUSTIFICACIÓN

El retraso mental es una de las principales causas de referencia pediátrica para la consulta de neuro-pediatria y genética; en países desarrollados se ha determinado una alta prevalencia que va del 2 al 3%, siendo más frecuente su aparición en hombres, por lo que la herencia ligada a X es más común. Se ha descrito ampliamente que el padecimiento más frecuente ligado a déficit intelectual de etiología hereditaria es el Síndrome de X Frágil (Ropers et al., 2005), con una prevalencia estimada entre 1/4000 a 1/8000 (Hagerman PJ., 2004), por lo tanto es considerado como un problema importante de salud a nivel mundial.

Desafortunadamente en México no existen datos epidemiológicos que indiquen la prevalencia y/o incidencia de la enfermedad, por lo que su frecuencia se sigue estimando conforme a los datos obtenidos en otras poblaciones. La falta de información en nuestra población va de la mano con la ausencia de métodos diagnósticos eficaces a nivel de sector salud, lo que complica un diagnóstico certero y eficaz. Por este motivo es muy importante realizar un estudio que refleje el comportamiento de la patología en nuestra población, así como una mejor caracterización clínica de la enfermedad que logre estratificar con mayor precisión a los pacientes con probable diagnóstico de FXS. Esto se reflejará en un diagnóstico mucho más certero y rápido, y con ello se puede realizar estudios familiares para poder brindar un mejor asesoramiento genético al paciente y a toda la familia. De manera relevante, también se ha considerado como un padecimiento subdiagnosticado, debido a que las características clínicas en niños prepúberes no son muy sugerentes de este padecimiento, y si se retrasa el resultado hasta la pubertad puede haber más miembros afectados en la familia por falta de un diagnóstico oportuno.

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se realizó el estudio molecular a pacientes con discapacidad intelectual, que presentaron o no historia familiar de retraso mental y/o características físicas que se asociaran a FXS, ya obtenido el resultado se realizó una caracterización de los pacientes y se corroboró con lo reportado en la literatura. La finalidad del estudio fue caracterizar a pacientes Mexicanos con FXS y a los pacientes con DI negativos a FXS para determinar características clínicas sugerentes para una mejor indicación del diagnóstico molecular, esto nos llevó a considerar como preguntas de investigación:

- a) ¿Existen características clínicas indicativas para un mejor diagnóstico de FXS en nuestra población y si estas correlacionan con lo reportado en la literatura?
- b) ¿La frecuencia de FXS reportada en la literatura es similar a la encontrada en este estudio? Y con ello sugerir especificaciones para poder realizar un estudio poblacional de mayor magnitud en nuestro país.

## 4 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de pacientes con síndrome de X-Frágil en un grupo de pacientes con déficit intelectual, así como identificar las características clínicas más comunes en los pacientes con resultado positivo.

## 5 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar pacientes con características clínicas compatibles con el síndrome de X-Frágil, que sean candidatos para la realización de estudio molecular.
- Realizar la caracterización fenotípica de todos los pacientes candidatos en base a lo reportado en la literatura.
- Identificar los pacientes con expansiones anormales del repetido CGG en el gen *FMR1*.
- Determinar las características clínicas más comunes en pacientes con FXS en nuestra población.
- Realizar el estudio familiar en pacientes con resultado positivo para *FMR1*.
- Elaboración de árboles genealógicos y análisis del patrón de transmisión por vía materna.

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Selección de pacientes

El presente estudio conjuntó a pacientes con diagnóstico sugestivo para FSX, los cuales presentaron déficit intelectual. Se reclutaron pacientes de cualquier sexo y edad, que hayan aceptado su participación en el estudio y que hayan firmado la carta de consentimiento informado (ver anexo 1). Además se conjuntó un segundo grupo conformado por familiares de primer y segundo grado de los pacientes índice, con la finalidad de realizar un estudio familiar e identificar individuos con la presencia de pre-mutación, expansión anormal de repetidos CGG y/o portadoras de la patología.

#### 6.1.1 Pacientes con déficit intelectual

##### 6.1.1.1 *Criterios de inclusión*

- Todos aquellos individuos con fenotipo compatible con FXS, caracterizado por déficit intelectual de etiología desconocida, macroorquidismo y alteraciones del tejido conjuntivo (Hiperlaxitud, piel delgada y laxa), características faciales como cara alargada y estrecha, con orejas grandes (Willemsen et al., 2011); así como pacientes con historia familiar de déficit intelectual y/o autismo de etiología no especificada.

##### 6.1.1.2 *Criterios de exclusión*

- Todos aquellos pacientes con déficit intelectual con etiología ya conocida que explique los datos clínicos del paciente, como son el síndrome de Prader Willi, síndrome de Sotos, síndrome de déficit intelectual asociado a FRAXE, autismo o TDAH asociado a otro síndrome genético.

##### 6.1.1.3 *Criterios de eliminación*

- Todos aquellos casos en los cuales no fue posible realizar todos los procesos requeridos en la investigación, como la revisión del paciente, toma de muestra, firma del consentimiento informado, etc.
- Pacientes que no aceptaron participar de manera voluntaria en el estudio.

## 6.1.2 Familiares de primer y segundo grado

### 6.1.2.1 *Criterios de inclusión*

- Familiares en primer y segundo grado en riesgo de heredar la mutación, identificados por árbol genealógico ya sean asintomáticos o con sintomatología dudosa que sea sugerente de FXS.
- Madres de pacientes con déficit intelectual con o sin antecedentes familiares de déficit intelectual en hombres.
- Mujeres con falla ovárica prematura o historia familiar de falla ovárica prematura.
- Pacientes con temblor distal o datos sugestivos de FXTAS.

### 6.1.2.2 *Criterios de exclusión*

- Todos aquellos individuos con otro tipo de patología que explique su cuadro clínico y que descarte FXS, FXTAS o FXPOI.
- Todos aquellos individuos que no sean familiares directos de algún afectado o que no estén en riesgo de heredar la mutación, por ejemplo hijos adoptivos.

### 6.1.2.3 *Criterios de eliminación*

- Todos aquellos casos en los cuales no fue posible realizar todos los procesos requeridos en esta investigación.

## 6.2 Caracterización clínica (Interrogatorio de los pacientes - Anexo 2)

Para realizar de manera correcta y ordenada recolección de datos se diseñó un cuestionario para la obtención de la ficha de identificación, antecedentes familiares (para identificar familiares afectados y/o en riesgo) y datos clínicos sugerentes o asociados a FXS, todo esto mediante interrogatorio directo o mixto en caso de pacientes con la capacidad para contestar y de manera indirecta en los casos en los que los pacientes no pudieran responder el cuestionario (Anexo 2).

El interrogatorio fue dirigido a la búsqueda en cada paciente de antecedentes personales y/o familiares de déficit intelectual retraso en el desarrollo psicomotor, problemas de aprendizaje y/o trastornos del lenguaje, hipotonía, poco contacto visual, estereotipias, falla ovárica prematura, ataxia, temblor distal, hipotensión y alteraciones psiquiátricas, así mismo se interrogó intencionadamente a la madre en busca de FXPOI, FXTAS, déficit intelectual, alteraciones psiquiátricas como depresión, ansiedad, obsesividad; antecedente de toxicomanías, enfermedad tiroidea, mialgias o fibromialgia.

### 6.3 Exploración física

- Se realizó la exploración física a cada paciente en compañía de uno o ambos padres del mismo, haciendo especial énfasis en los datos clínicos reportados en pacientes con FXS (Gallagher et al., 2012; Pirozzi et al., 2011; Hersh et al., 2011; McLennan et al., 2011), como son los datos que se pueden observar en la hoja de recolección de datos y en la puntuación de Hagerman. (Anexo 2 y Anexo 3)
- Se exploró a la madre en busca de características físicas sugestivas como pabellones auriculares grandes e hipermovilidad articular, temblor postural e intencional, datos de neuropatía periférica, entre otros datos que se observan en el anexo 2 (Gallagher et al., 2012; Pirozzi et al., 2011; Hersh et al., 2011).
- A los familiares en riesgo que decidieron participar en el estudio se les realizó exploración física en busca de datos sugestivos de síndrome de X-Frágil asociado a premutación (ver Tablas 5, 6 y 7)

### 6.4 Diagnóstico molecular y asignación de número de repetidos CGG

#### 6.4.1 Extracción de DNA

- Se extrajeron 5 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA como anticoagulante.
- Se procedió a la extracción de DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica usando el “Gentra Puregene blood kit “(Quiagen, Hilden, NRW, Germany).

#### 6.4.2 Identificación de la expansión anormal de los repetidos CGG del gen *FMR1*

- Se utilizaron diluciones de la muestra problema a una concentración de 40 ng/μL, la cuantificación se realizó a través de un sistema NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Se realizó la reacción de PCR usando el estuche diagnóstico “kit AmpliDeX™ *FMR1* PCR” (Asuragen, Austin, Texas, USA) con un volumen final de 15 μL empleando las siguientes cantidades (los volúmenes utilizados se consideraron conforme a las concentraciones ya estas especificadas por el kit):

Componentes	TP-PCR CGG
Solución amortiguadora	11.45 μl
Cebadores F,R FAM del <i>FMR1</i>	0.50 μl
Cebador CGG del <i>FMR1</i>	0.50 μl
Diluyente	1.50 μl
Mezcla de polimerasa	0.05 μl
Muestra de ADN [40 ng/μl]	1.00 μl
Volumen total por reacción	15.00 μl

- La mezcla se agitó en un vórtex (MS 3 Digital S1, IKA), después se distribuyó la muestra en tubos 0.2 mL (Axygen).
- Cada tubo se agitó en el vórtex con suavidad y posteriormente se centrifugó (MiniSpin, Eppendorf) para eliminar las burbujas que pudiera haberse formado (1 minuto a 1 600 rcf)
- La reacción de PCR se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), mediante el siguiente protocolo:
  - Desnaturalización inicial: 95°C durante 5 minutos
  - 10 ciclos de desnaturalización a 97°C durante 35 segundos, de hibridación a 62°C durante 35 segundos y finalmente de extensión a 68°C durante 4 minutos.
  - 20 ciclos de desnaturalización a 97°C durante 35 segundos, de hibridación a 62°C durante 35 segundos, y finalmente de extensión a 68°C durante 4 minutos + 20 segundos por ciclo.

- Extensión Final: 72°C durante 10 minutos
- Posteriormente, una alícuota de la reacción de PCR se mezcló con formamida desionizada (Hi-Di™) y con el marcador de peso molecular interno (ROX 1000) el cual es indispensable para la asignación del tamaño de los fragmentos debido a que realiza una curva patrón de pesos moleculares conocidos y dependiendo de la migración del fragmento analizado se le determina un peso específico y por consiguiente un número exacto de repeticiones (ver Figura 10).
- Se calentó la mezcla a una temperatura de 95°C por 7 minutos y se transfirió inmediatamente a hielo por otros 5 minutos, para disminuir la temperatura rápidamente.
- Las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis capilar en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando una temperatura constante de 60°C, un voltaje de 15 kV, con las siguientes condiciones de corrida:

***Condiciones de corrida de las muestras***

<i>Tiempo de inyección</i>	20 segundos
<i>Tiempo de corrida</i>	70 minutos

- Para el análisis de los alelos y la genotipificación se empleó el programa GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## 6.5 Análisis estadístico

El comportamiento de las distintas variables consideradas en el estudio se evaluaron utilizando estadígrafos generales de tendencia central y de dispersión (media, moda, mínimo, máximo, desviación estándar, etc). Se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de las diferentes variables, para estos fines fue utilizado Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmon, WA).

## 6.6 Consideraciones éticas

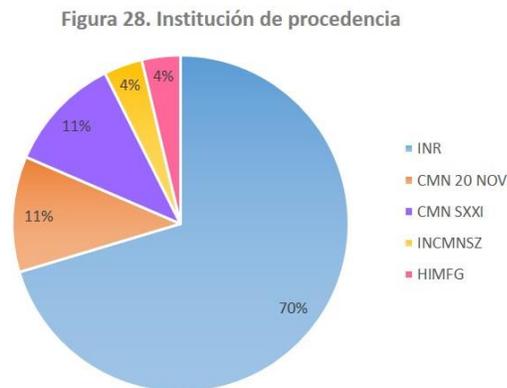
La participación de los pacientes fue voluntaria, bajo consentimiento informado, y previo asesoramiento genético, en caso de haber sido menores de edad el estudio contó con la autorización de ambos padres o tutores. El resultado fue informado a los padres y pacientes para re-direccionar el manejo del paciente hacia el diagnóstico según haya sido el caso (Anexo 4 y 6).

Para el caso de los estudios familiares, los individuos asintomáticos fueron voluntarios y sometidos a asesoramiento genético previo a la toma de muestra y durante su participación en el protocolo, se les entregó el resultado de manera confidencial y directo en el caso de ser mayores de edad y con la capacidad intelectual de entender el resultado, en caso contrario se entregaba el resultado al padre o tutor (Anexo 4, 5 y 6). Las muestras procedentes de pacientes menores de edad fueron obtenidas única y exclusivamente con fines de investigación, y se manejó los resultados con la mayor discreción posible, previa autorización por escrito de ambos padres.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Características generales de la muestra

Los pacientes de este estudio fueron reclutados de la consulta del servicio de genética del Instituto Nacional de Rehabilitación (19/26), Centro Médico Nacional Siglo XXI (2/26), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (4/26), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (1/26) y Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez” (1/26) [ver Fig. 28].



El total de pacientes estudiados fue de 26, de los cuales 25 son hombres y solo se analizó una mujer (ver Fig. 29); el rango de edad de los pacientes analizados mostró un intervalo de 5 a 73 años, con un promedio de 16 años.

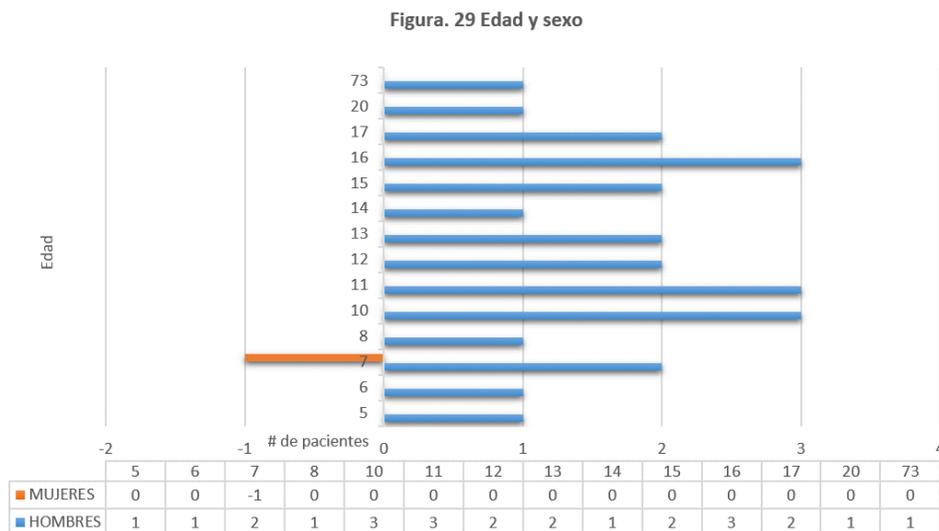
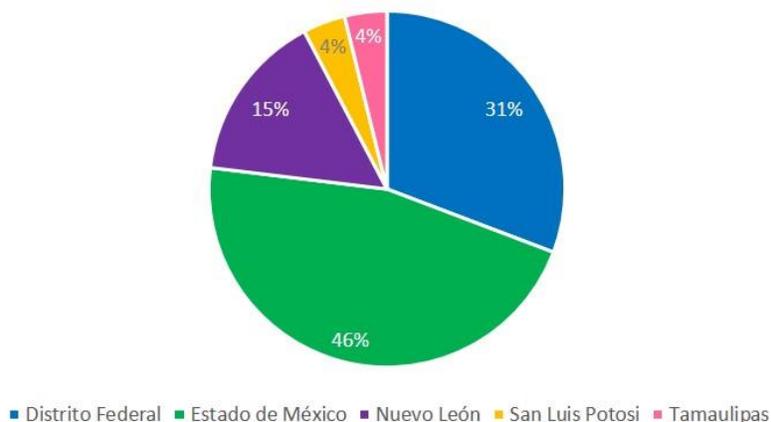


Tabla 17. Datos clínicos de pacientes en estudio por probable Síndrome de X - Frágil																										
Datos clínicos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Sexo	M	M	F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Edad	10	17	7	13	7	16	16	14	16	6	12	13	7	11	73	5	8	10	13	15	12	17	20	11	15	11
Consanguinidad	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Endogamia	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Historia familiar DI	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Talla alta	TN	TN	TA	TB	TN	TA	TA	TA	-	TN	-	-	-	TB	TA	-	TN	TB	TN	TA	TN	-	TN	TN	TN	TN
Macrocefalia relativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cara alargada	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Frente prominente	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pabellones auriculares grandes	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Paladar alto y arqueado	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	PH	+	+	+	+	+
Malposición o apiñamiento dental	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Macroorquidismo	D	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	+	-	-	-	D	D	+
Cardiopatía	-	-	CIA	SC	-	-	-	-	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotonía generalizada	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pliegue palmar único	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipermovilidad pequeñas articulaciones	-	+	+	D	+	+	+	+	-	-	-	D	+	-	D	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Escoliosis	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Crisis convulsivas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Obesidad	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Déficit intelectual (DI)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Retraso en el desarrollo psicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ansiedad	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiperactividad	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Poco contacto visual	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Retraso o ausencia de lenguaje	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lenguaje preservado	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Movimientos estereotipados	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
Autismo	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-

M: Masculino; F: Femenino; (-): Negativo; (+): Positivo; (D): Dudoso; TN: Talla Normal; TA: Talla alta; TB: Talla baja; CIA: Comunicación interauricular; SC: Soplo cardiaco; PH: Paladar hendido

Los pacientes en estudio refirieron ser originarios de diferentes regiones del país, a pesar de que todos los hospitales sedes pertenecen al Distrito Federal, no obstante cada uno de los centros son considerados como unidades médicas de tercer nivel, conformados por Institutos Nacionales y Hospitales de Alta especialidad por lo tanto son centros de referencia a nivel Nacional. Se analizaron 8 pacientes del Distrito Federal, 12 del estado de México, 4 de Nuevo León, 1 de San Luis Potosí y 1 de Tamaulipas (ver Fig. 30). La mayoría de los pacientes son originarios del Estado de México de diversos municipios, principalmente en la zona conurbada con un 46% de todos los casos, seguido del Distrito Federal con un 31% y en tercer lugar el estado de Nuevo León con 15% de los pacientes.

Figura 30. Entidad federativa de origen



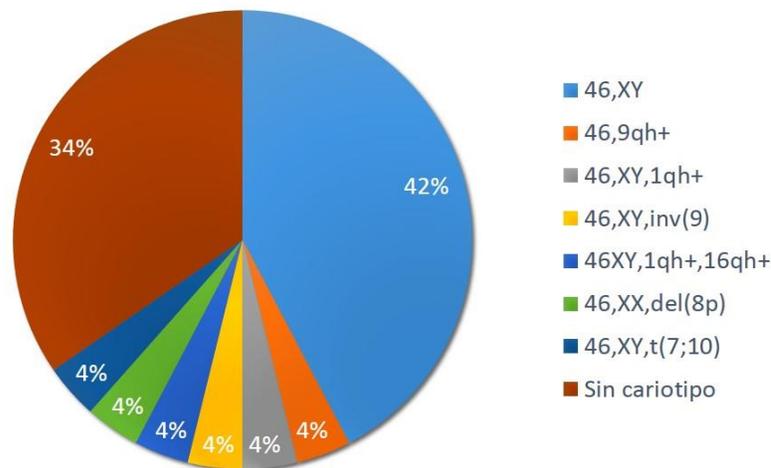
En la tabla 17 se especifican los datos clínicos de los pacientes con diagnóstico sugestivo de FXS analizados. A partir del interrogatorio dirigido a consanguinidad y endogamia se determinó que para los casos 6 y 7 sus padres presentaron consanguinidad (primos en 2° grado), así mismo para el caso 19 también los padres del probando refirieron ser primos en 2° grado.

De todos los datos clínicos estudiados los más frecuentemente presentadas en nuestra serie de pacientes fue el antecedente de retraso en el desarrollo psicomotor (RDPM) el cual presentaron todos los pacientes, seguido del retraso o ausencia de lenguaje en el cual presentaron 24/25 pacientes; la cara alargada, frente prominente y malposición dental se

presentó en 22/26 pacientes, el paladar alto y arqueado fue en 18/26 y uno presentó paladar hendido que fue corregido quirúrgicamente, el antecedente de hipotonía generalizada se presentó en 9 pacientes; la obesidad, macroorquidismo y la cardiopatía solo se presentaron en 3 pacientes respectivamente, por lo que se puede observar corroboramos que el cuadro clínico para FXS es muy amplio y variable y no necesariamente todos los pacientes que pueden ser sugestivos de este diagnóstico se puede corroborar, existen características que se presentaron en el 100% de los pacientes como se puede observar más adelante en la tabla 20.

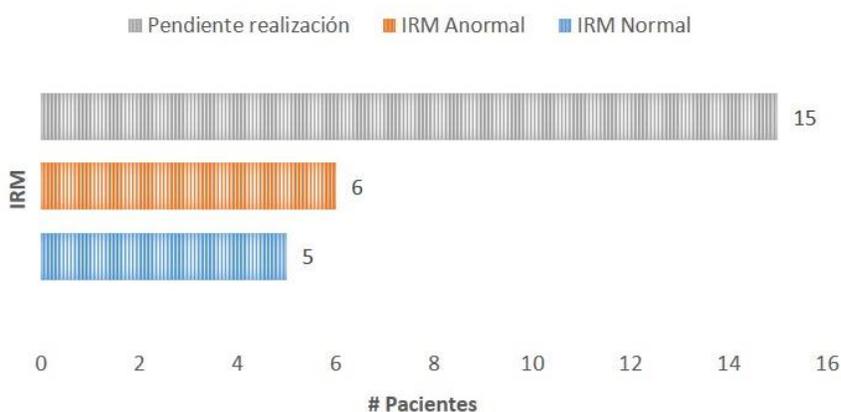
Dentro de los estudios clínicos y paraclínicos, el cariotipo en sangre periférica con bandas G se realizó en 16 pacientes, mientras que en 12 individuos el estudio se encuentra pendiente. En los 16 pacientes con cariotipo, 13/16 casos presentaron un resultado normal con presencia de diversos polimorfismos en algunos individuos; 3 paciente presentaron un cariotipo anormal, uno presentó una inversión en el cromosoma 9, un paciente con una translocación balanceada t(7;10) donde también se puede observar una constricción en Xq27.3 (ver figura 48) y la paciente femenina que presenta una deleción en el brazo corto del cromosoma 8 (ver Fig. 47).

**Figura 31. Cariotipo Sangre Periférica (Bandas G)**



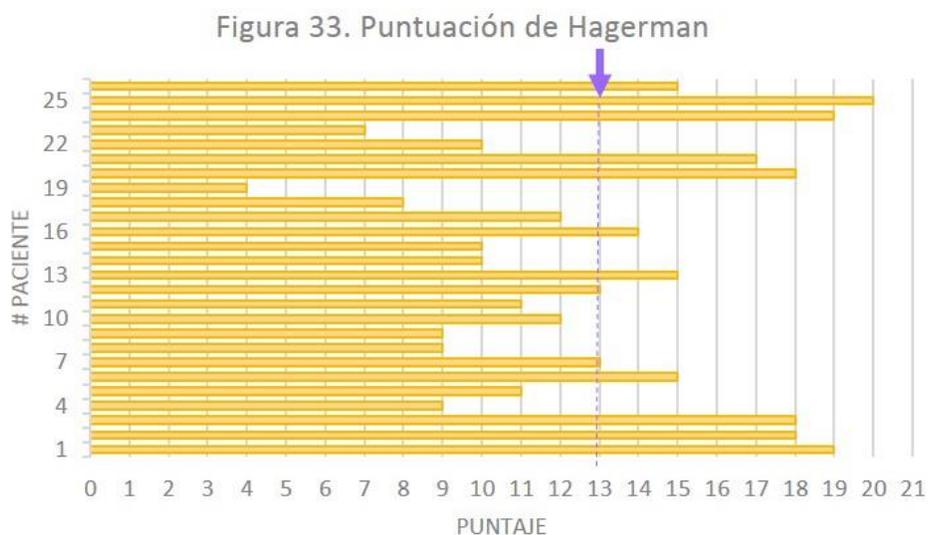
Para descartar que el retraso en su desarrollo está causado por una malformación a nivel de sistema nervioso central, o si presentan alguna alteración que pudiera asociarse algún síndrome genético ya conocido, es importante la realización de resonancia magnética de encéfalo (ver Fig. 32). A partir de nuestra serie de 26 pacientes, 11 individuos cuentan con dicho estudio, de los cuales 5 tienen un estudio normal y 6 presentaron alteraciones. De estos 6 pacientes con IRM anormal, el caso 5 presentó un quiste aracnoideo temporal izquierdo, mientras que el caso 10 presentó paquigiria y atrofia cortical, para el caso 13 se pudo identificar un quiste aracnoideo cerebeloso izquierdo y de cisterna peribulbar derecha, así como para el caso 16 se identificó leucomalacia periventricular de predominio occipital con discreta atrofia cortical, para el caso 17 se presentó un reporte que indica probable silla turca vacía y finalmente para el caso 18 presentó gliosis inespecífica subcortical bifrontal.

**Figura 32. Estudio de imagen por resonancia magnética**



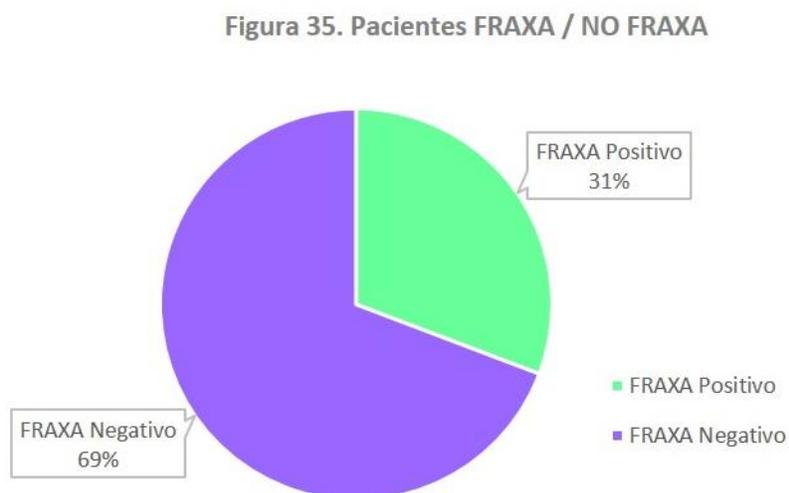
A partir de la evaluación clínica, se analizó las características de los pacientes evaluando a través de una escala más objetiva, la afectación de cada uno de los pacientes mediante la “Puntuación de Hagerman”, conforme a lo reportado en la literatura por Milá et al, una puntuación >13 es muy sugestiva de síndrome de X Frágil (Milá M., et al, 1996) y en base a lo reportado por Hagerman et al., pacientes que presentan una puntuación >16 es muy indicativo de FXS (Hagerman et al., 1991), de los 26 pacientes estudiados 13 presentaron

una puntuación  $\geq 13$  como se puede observar en la figura 33, lo cual se tomó como muy sugestivo para estudio molecular de FRAXA.

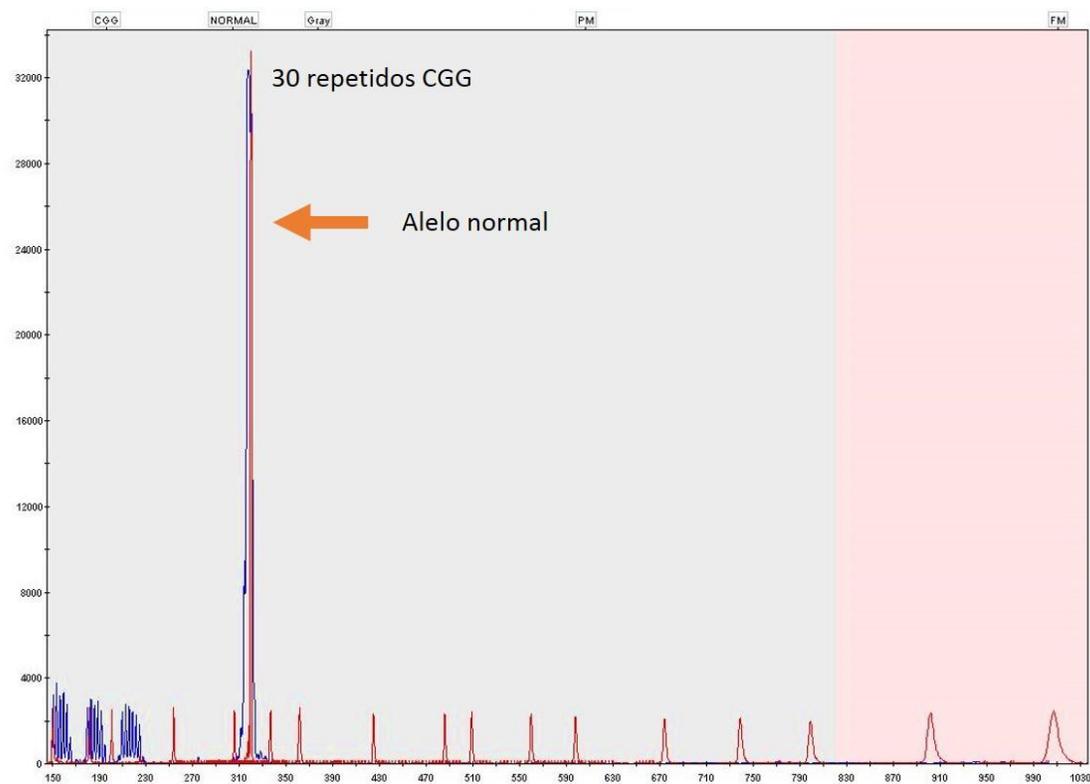


## 7.2 Estudio molecular de pacientes con diagnóstico sugestivo de FXS

A los 26 pacientes se les realizó el estudio molecular basado en la técnica PCR acoplada con una TP-PCR (ver sección 6.4.2; de material y métodos), con el cual se pudo identificar y clasificar a los pacientes en FRAXA positivos y FRAXA negativos como se puede ver en la figura 35. De nuestro grupo de pacientes el 31% (8/26) tuvieron un diagnóstico positivo, mientras que el 69% (18/26) pacientes a pesar de tener características fenotípicas sugerentes de FXS fueron negativos a la prueba.

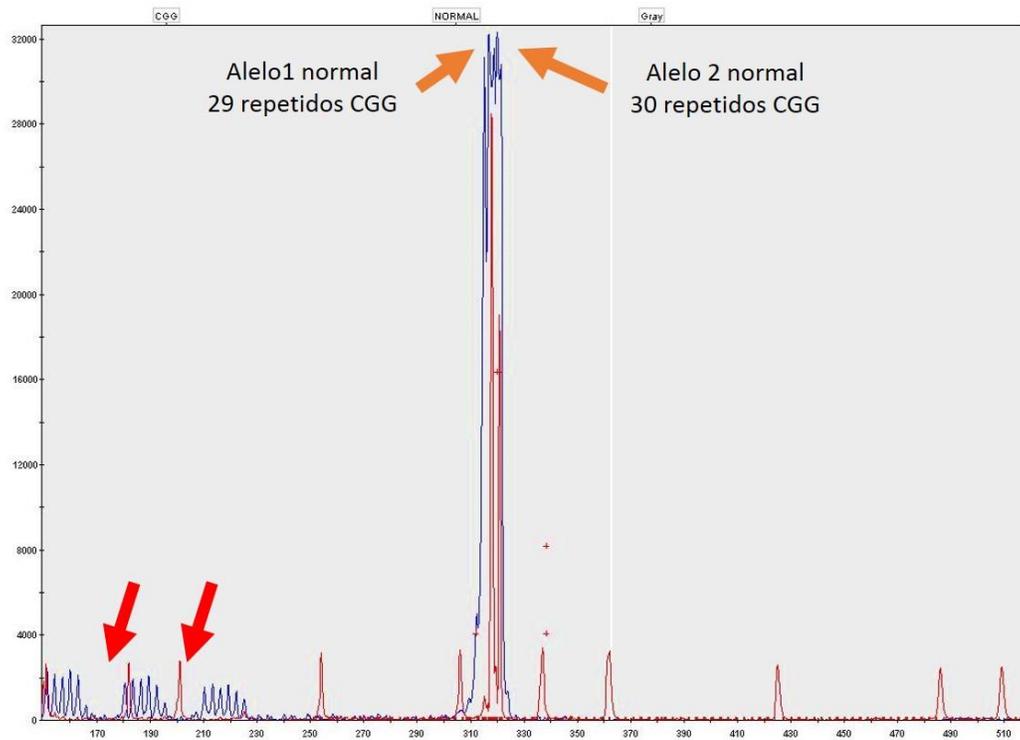


Como parte complementaria de este estudio se decidió analizar a las madres de los probandos a participar en este estudio con la finalidad de identificar portadoras y número de repetidos presentes en población sana, como se verá mas adelante.



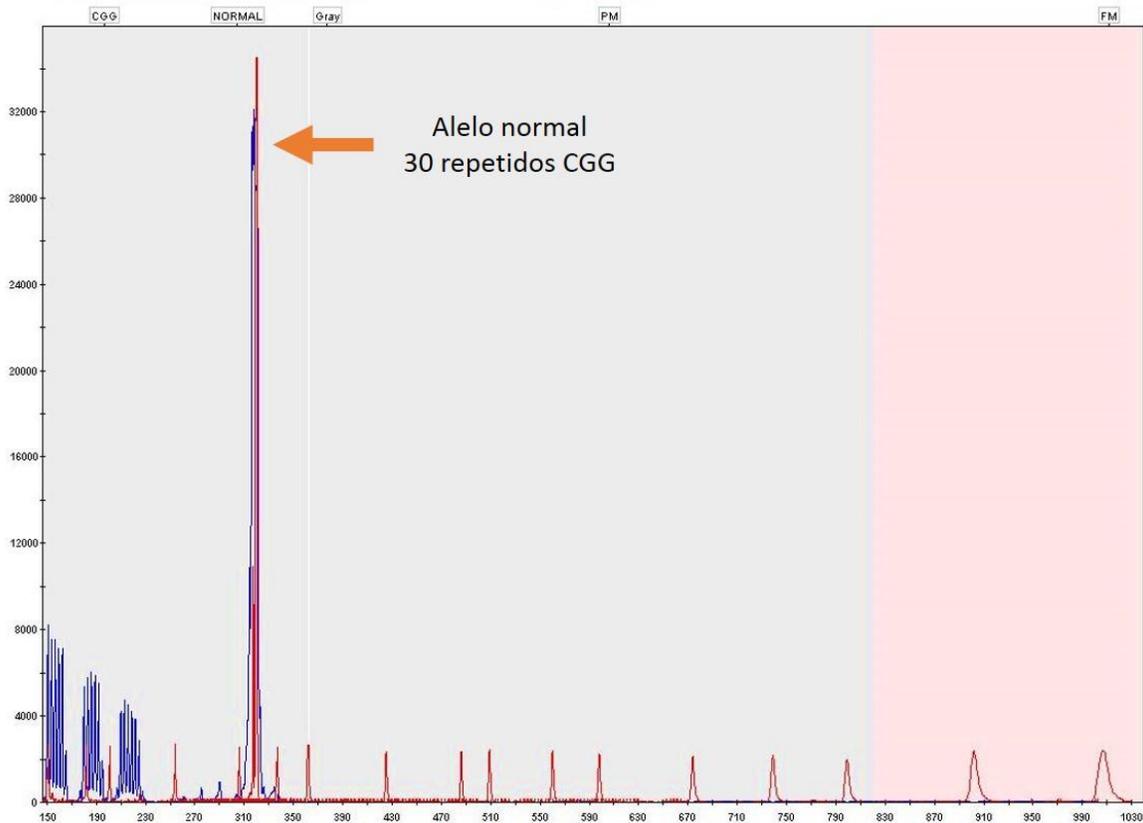
**Figura 36 .** Electroferograma de un hombre sin la mutación de FRAXA (caso 18), donde se puede observar la presencia de un solo alelo normal. (Flecha naranja)

En la figura 36 se puede observar un electroferograma típico para un estudio molecular negativo. El caso 18 a pesar de presentar datos de déficit intelectual (Tabla 17), presentó un solo alelo con 30 repetidos CGG, por lo que al ser un defecto ligado al cromosoma X, nos determina que éste alelo se encuentra presente en el umbral de normalidad.



**Figura 37.** Electroferograma de mujer sana heterocigota (Flechas naranja). Se puede observar las regiones donde se presentan las interrupciones AGG intercalados entre los repetidos CGG (Flechas rojas).

De manera similar, en la figura 37 se observa un electroferograma de una mujer heterocigota sana (tía del caso 26), donde se puede apreciar dos alelos de 29 y 30 repetidos respectivamente, que presentan una diferencia en su tamaño de aproximadamente tres pares de bases. De manera relevante, es evidente la región de interrupción de los repetidos AGG intercalados en los repetidos CGG, lo que le da estabilidad al tracto de repetidos CGG. Aunado a estos resultados, en la figura 38 se muestra un electroferograma de una mujer homocigota, lo que significa que presentan el mismo número de repetidos en ambos alelos, y el análisis de TP-PCR no muestra el patrón característico de una expansión de repetidos.



**Figura 38.** Electroferograma de mujer sana (madre caso 18) homocigota para el alelo normal (Flecha naranja), donde se observa la presencia de una sola señal de fluorescencia que es compatible con un estado de homocigidad.

Por el contrario, en la figura 39 se observa un electroferograma de una mujer portadora de la premutación para la expansión del repetidos CGG en el gen *FMR1*, se pueden apreciar dos alelos, uno que presenta un número de repetidos dentro los rangos de normalidad (29 repetidos CGG) y el otro alelo que se encuentra en el rango de premutación (113 repetidos CGG), mostrando el patrón de escalera característico.

En la figura 40 se observa el electroferograma de un hombre con mutación completa (caso 2), donde se observa el patrón de escalera característico de la presencia de repetidos de trinucleótidos.

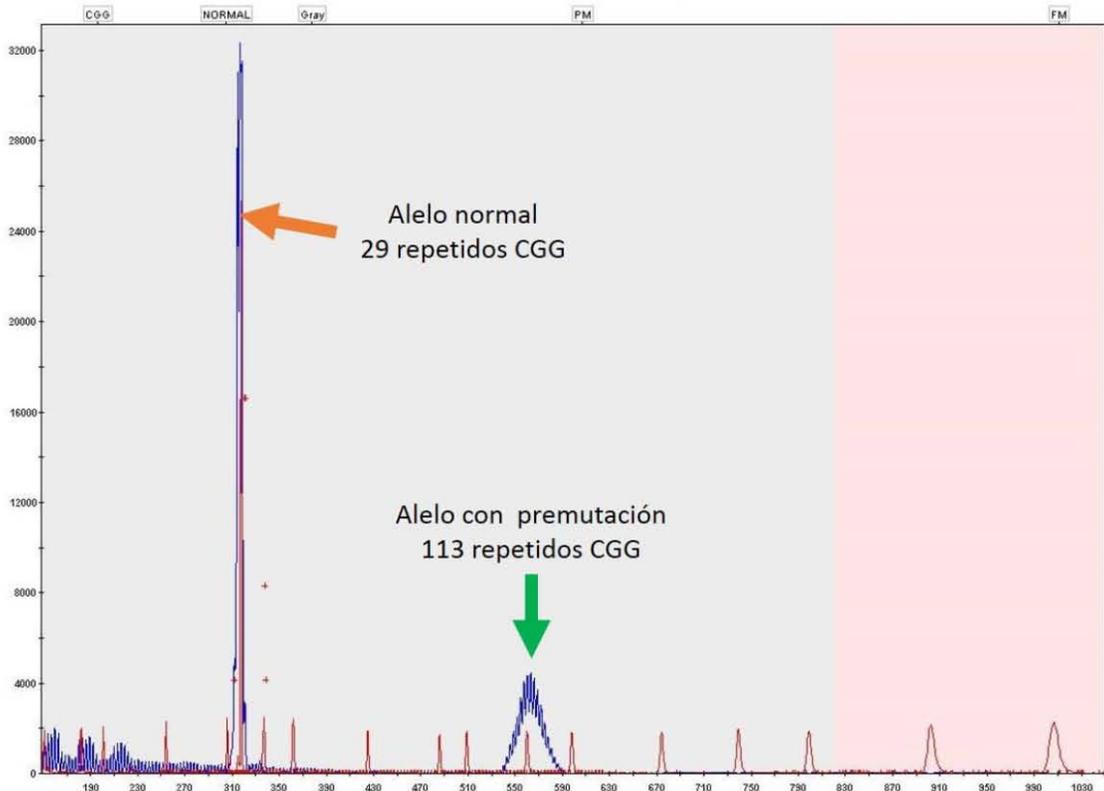


Figura 39. Electroferograma de mujer heterocigota (madre del caso 2 y 3) para los alelos *FMR1*, en donde se observa un alelo normal y el otro alelo con premutación.

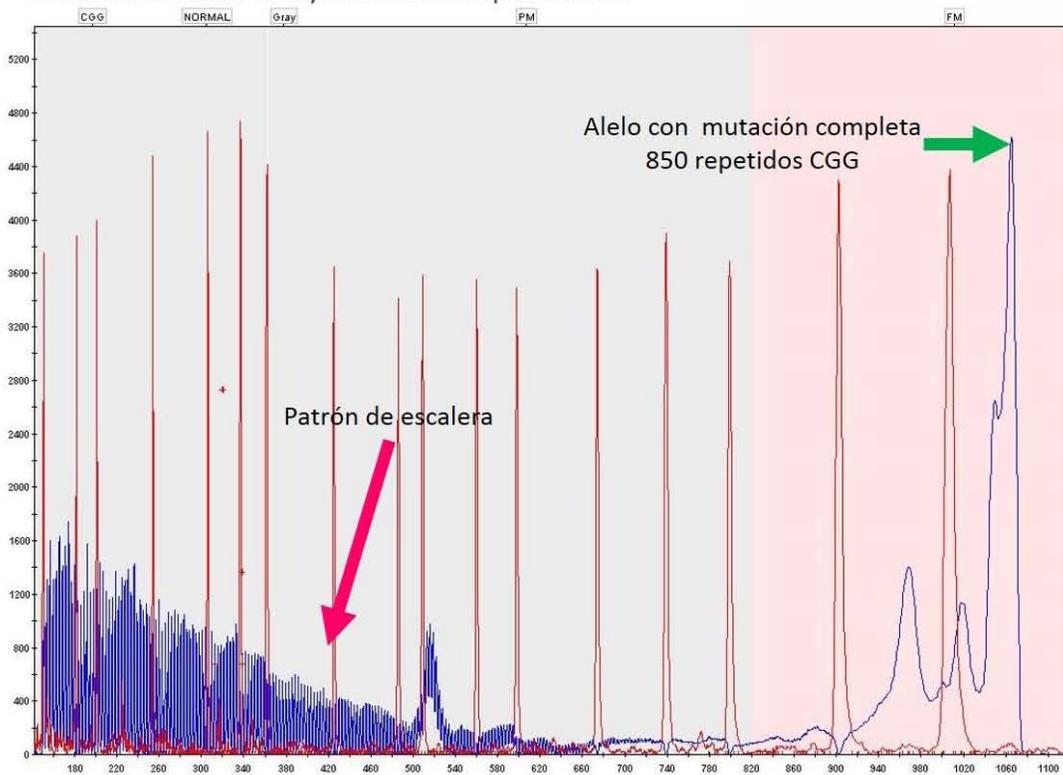
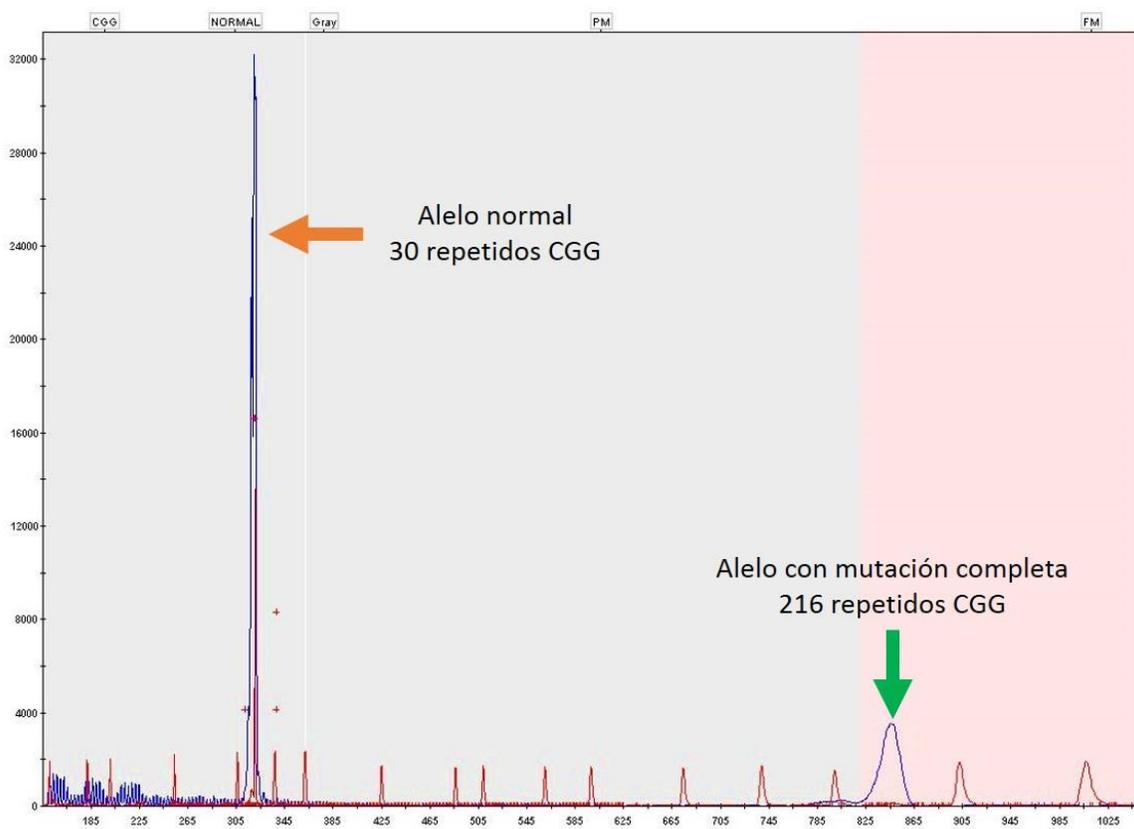
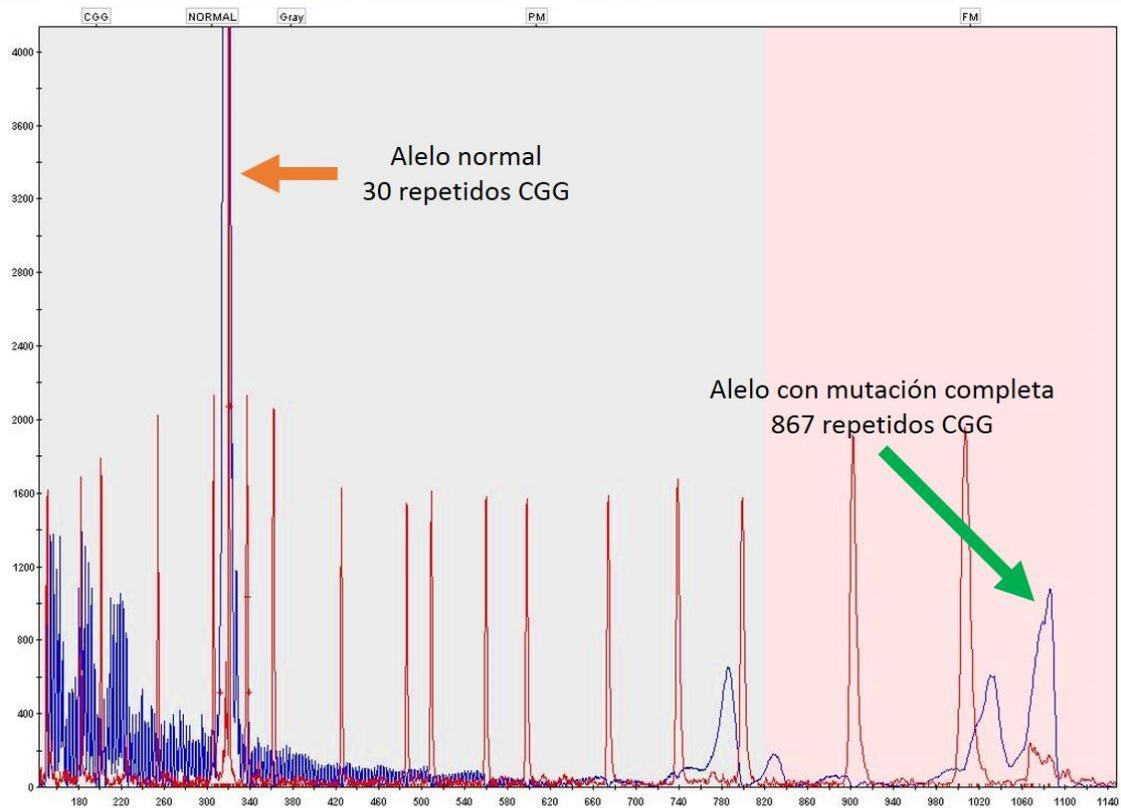


Figura 40. Electroferograma del caso 2 que muestra una mutación completa (Flecha verde). Se puede apreciar la escalera típica de la presencia de repetidos CCG.

En la figura 41 se puede observar un electroferograma de una mujer heterocigota que en el alelo 1 presenta un número de 33 repetidos CGG y en el alelo 2 una expansión  $\geq 200$  repetidos CGG, es importante mencionar que esta paciente no presenta ningún dato clínico sugestivo de FXS hasta el momento, sin embargo es la madre del caso 26. En la figura 41 se observa un electroferograma de una mujer heterocigota con el alelo 1 normal de 30 repetidos y un segundo alelo con una mutación completa con  $\geq 200$  repetidos CGG. Si se comparan las figura 41 y 42, donde ambas pertenecen a mujeres con un alelo con mutación completa, se observa una diferencia entre los patrones de fluorescencia, lo que parece corresponder con el hecho de que la paciente de la figura 41 tiene una expansión mayor de 200 repetidos CGG y que por peso molecular también resulta mucho más grande que la paciente de la figura 41.



**Figura 41.** Electroferograma de mujer heterocigota (madre del caso 26) con un alelo normal y un alelo con mutación completa.

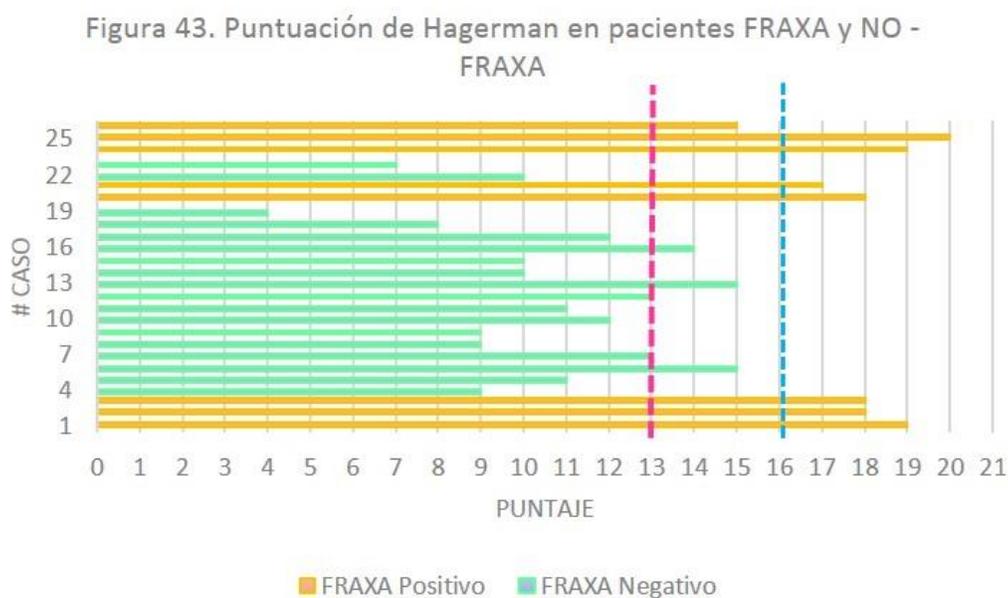


**Figura 42.** Electroferograma de mujer heterocigota (caso 3) con un alelo normal y un alelo con mutación completa, en la cual la paciente se encuentra con datos clínicos de FXS.

### 7.3 Características de pacientes FXS

A partir de los estudios moleculares se decidió identificar las características clínicas correspondientes al grupo de pacientes con FRAXA y comparar con el grupo de pacientes negativos para FRAXA, con la finalidad de describir características clínicas específicas para nuestra cohorte de sujetos con FRAXA. Al analizar la puntuación de Hagerman, se observó que los pacientes que presentaron una puntuación  $>16$  (ver Fig. 43, línea azul) todos mostraron ser positivos para la expansión del repetido CGG. Se puede observar que 7 de 8 pacientes con resultado molecular positivo, cumplen con los criterios de Hagerman et al, y solo 1 no alcanzó el puntaje sugerido. Por otro lado, si se compara con el punto de corte reportado por Milá M., et al, en donde 13 puntos se establece como valor significativo para un resultado positivo (ver Fig. 43 línea rosa), todos los pacientes con FRAXA cumplen este

criterio, sin embargo existen algunos casos peculiares negativos que alcanzan esta puntuación (Hagerman et al., 1991; Milá et al., 1996).

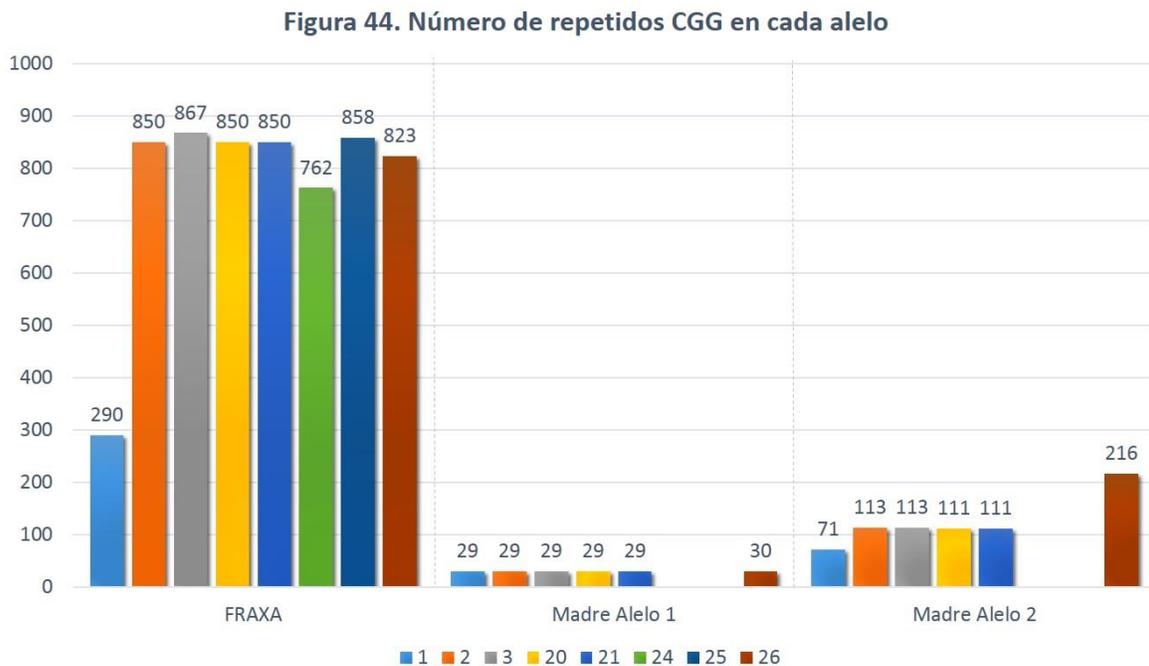


En la tabla 18 se puede observar la distribución promedio por edad de la puntuación de Hagerman divididos en pacientes FRAXA (estudio positivo) y No-FRAXA (estudio negativo), y por sexo. Como se puede observar tanto en la tabla 18 como en la figura 42 los pacientes FRAXA tienen una puntuación mayor que los pacientes No-FRAXA, siendo el puntaje más bajo en los FRAXA de 15 puntos y el mayor de 20 puntos; los pacientes No-FRAXA tiene una puntuación máxima de 15 y mínima de 4 puntos; también en la división por edad y sexo se puede ver la diferencia entre el promedio obtenido entre estos pacientes.

Intervalo de edad	No. Pacientes no-FRAXA	Puntuación media $\pm$ DE	No. Pacientes FRAXA	Puntuación media $\pm$ DE
<b>Hombres</b>				
4 - 8 años	6	12.8 $\pm$ 1.64	0	0
9 - 12 años	3	9 $\pm$ 1.83	4	18.25 $\pm$ 2.22
13 - 16 años	6	10.2 $\pm$ 4.21	2	16 $\pm$ 1.41
$\geq$ 17 años	3	9.6 $\pm$ 2.19	1	18
<b>Mujeres</b>				
4 - 8 años	0	12.8 $\pm$ 1.64	1	18

## 7.4 Estudio de probables portadoras con la premutación

Como se mencionó anteriormente se analizaron a las madres de todos los casos índices. Se realizó el estudio para analizar el estado de portadoras de la madres donde como se puede observar en la Figura 44, se corroboró el estado de portadoras de todas las madres con lo cual se confirma lo estipulado en la paradoja de Sherman donde se menciona que no existen casos de *novo* y que todas las madres de pacientes con la mutación son portadoras.



También se realizó la identificación de número de repetidos del gen *FMR1* en 11 madres de pacientes con déficit intelectual, para un estudio en total de 15 mujeres las cuales se clasificaron como: homocigotas sanas, heterocigotas sanas y heterocigotas portadoras de la premutación (ver tabla 19). A cada uno de estos grupos se calculó el promedio y la desviaciones estándar como se puede observar en la tabla 19, con base a esto se puede confirmar que el promedio de repetidos en nuestra población sana es de 30 CGGs, esto es compatible con lo publicado por Barros-Núñez et al en 2008, donde ellos reportan que en la población mexicana el número de repetidos CGG se encuentra entre 31 y 35 repetidos, con un promedio de 32 repetidos (Barros-Núñez et al., 2008).

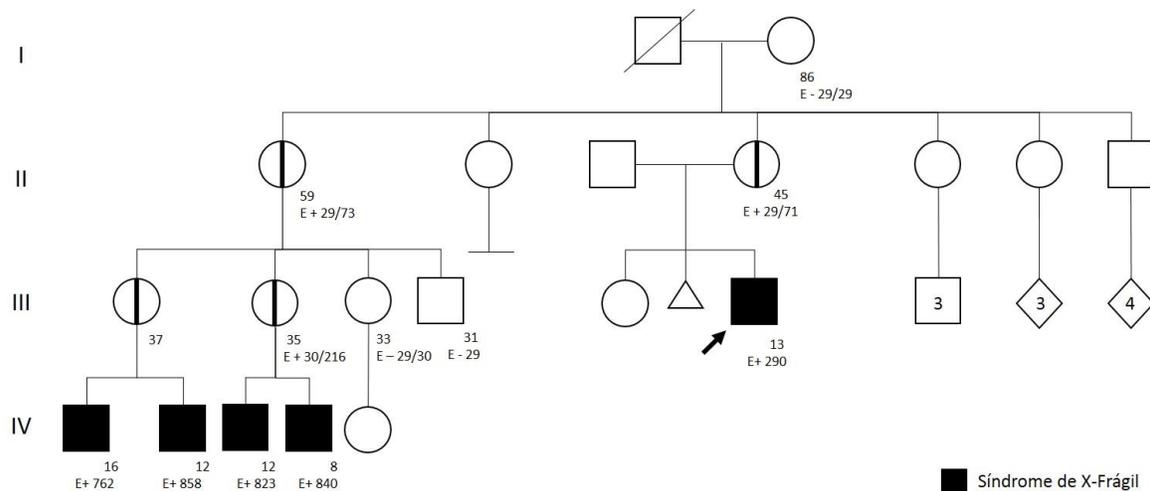
<b>Tabla 20. Distribución media de repetidos CGG en madres de pacientes FRAXA y No-FRAXA</b>			
	<b>No. Pacientes</b>	<b># Repetidos promedio</b>	<b>DE</b>
<b>Homocigotas</b>	6	30	0.39
<b>Heterocigotas</b>	6	30	0.65
<b>Heterocigotas Portadoras FRAXA</b>	3	29 / 140	1 / 50.89

## 7.5 Estudios Familiares

Los pacientes positivos se conjuntaron en tres familias diferentes, denominadas A, B y C respectivamente; a estas familias se les ofreció la realización del estudio genético familiar para la identificación de algún desorden asociado a la mutación en *FMR1*, a continuación se describen los hallazgos clínicos y moleculares encontrados en cada una de estas familias.

### 7.5.1 Familia A

La familia A es originaria de Monterrey, Nuevo León, en la figura 45 se puede observar el árbol genealógico de esta familia. Se analizó al caso índice (III.3) y posterior a la realización de la historia clínica y al conocer que el paciente tiene historia familiar con características compatibles con FXS, se tomó muestra a los sujetos IV.1, IV.2 y IV.3. Conforme a la tabla 16, los pacientes presentaron características clínicas particulares de la patología, las cuales pueden identificarse con el número de caso 1, 24, 25 y 26 respectivamente, en dicha tabla. La puntuación de Hagerman se puede analizar en la figura 43, en donde se observa que todos los valores en la familia presentan cierto grado de similitud entre los valores obtenidos.

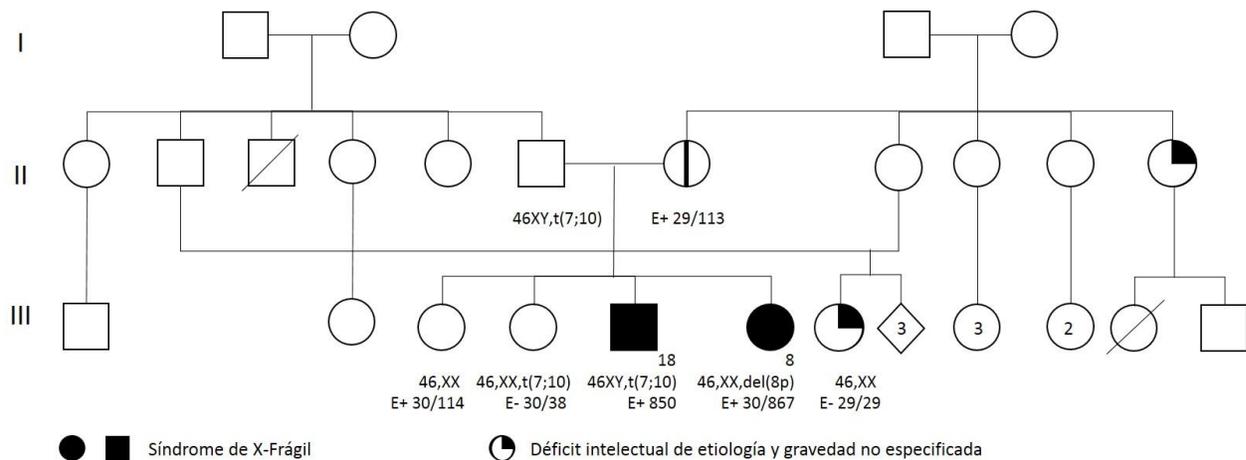


**Figura 45.** Árbol genealógico de la Familia A. Se pueden observar a los individuos III.7, IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4 como portadores de la mutación completa. Los individuos II.1, II.4, III.1, III.2 son portadoras de la premutación. El individuo III.3 se le realizó el estudio molecular y fue negativo. E+: Estudio molecular positivo para FRAXA. E-: Estudio molecular negativo para FRAXA.

Aunado a estos datos se analizaron 2 familiares asintomáticos (III.5 y III.6), como se puede observar en la figura 45, III.6 resultó ser negativo (29/30 repetidos), mientras que III.5 es portadora de la premutación en uno de los alelos en el cual tiene >200 repetidos y en otro alelo tiene 30 repetidos CGG. En el árbol genealógico se sugiere la presencia de más mujeres portadoras, que conforme a lo estipulado por Sherman, se consideran como portadoras obligadas. Así mismo se observa que en la generación II, el número de repetidos es de 70-73 CGG, estos alelos tienen un riesgo de expandir a mutación completa del 65% (Hersh et al., 2011), se desconoce el número de repetidos en el individuo II.4 pero se puede ver que su descendencia cae dentro del riesgo antes mencionado.

### 7.5.2 Familia B

La familia B es originaria de Ciudad Nezahualcoyotl, estado de México, sin embargo la madre proviene de Salvatierra, Guanajuato. El caso índice en esta familia es el individuo III.6 y posteriormente se identificó a su hermano (III.5) como probable portador de la mutación, ambos presentan déficit intelectual y sus datos clínicos se describen en la tabla 16 como casos 2 y 3. El individuo II.7 es la madre de ambos casos, se interroga sobre datos de FXPOI y FXTAS los cuales niega.



**Figura 46.** Árbol genealógico de la Familia B. Se puede observar a los individuos III.5 y III.6 como portadores de la mutación completa. II.7 portadora de la premutación. E+: Estudio molecular positivo para FRAAXA. E-: Estudio molecular negativo para FRAAXA.

Al ser el individuo III.6 portadora de la mutación completa y presentar datos clínicos compatibles con FXS, se toma muestra para estudio de cariotipo en SP (ver FIG 47) para descartar una alteración en el cromosoma X que pudiera sugerir una inactivación preferencial del alelo sano y expresión del alterado y que por eso se manifestara el cuadro clínico tan severo, ya que como se puede ver en la figura 43 tanto el caso 2 como 3 tienen la misma puntuación, y generalmente se espera que las mujeres presenten menos afectación.

Como se observa en la figura 46 el individuo III.6 tiene un cariotipo con una fórmula cromosómica 46,XX,del(8)(p23.1), sin alteraciones estructurales en el cromosoma X. Al revisar la literatura las deleciones en 8p23.1 se asocian con alteraciones del desarrollo, retraso mental leve a moderado, microcefalia, cardiopatía congénita (defectos atrioventriculares, defectos septo atrial y en ocasiones estenosis pulmonar), hernia diafragmática, hipospadias, pobre lenguaje y comportamiento particular con hiperactividad e impulsividad, dismorfias faciales menores como frente amplia y estrecha, puente nasal ancho, pliegue epicántico, paladar alto y arqueado y pabellones auriculares de baja implantación con forma inusual (Ballarati et al., 2011), estas características clínicas son compatibles con las que presenta nuestra paciente como se puede observar en la tabla 17

(caso 3) y en la Figura 48 así que esto podría explicar lo severo del cuadro, ya que se pueden estar sobrelapando ambos casos.

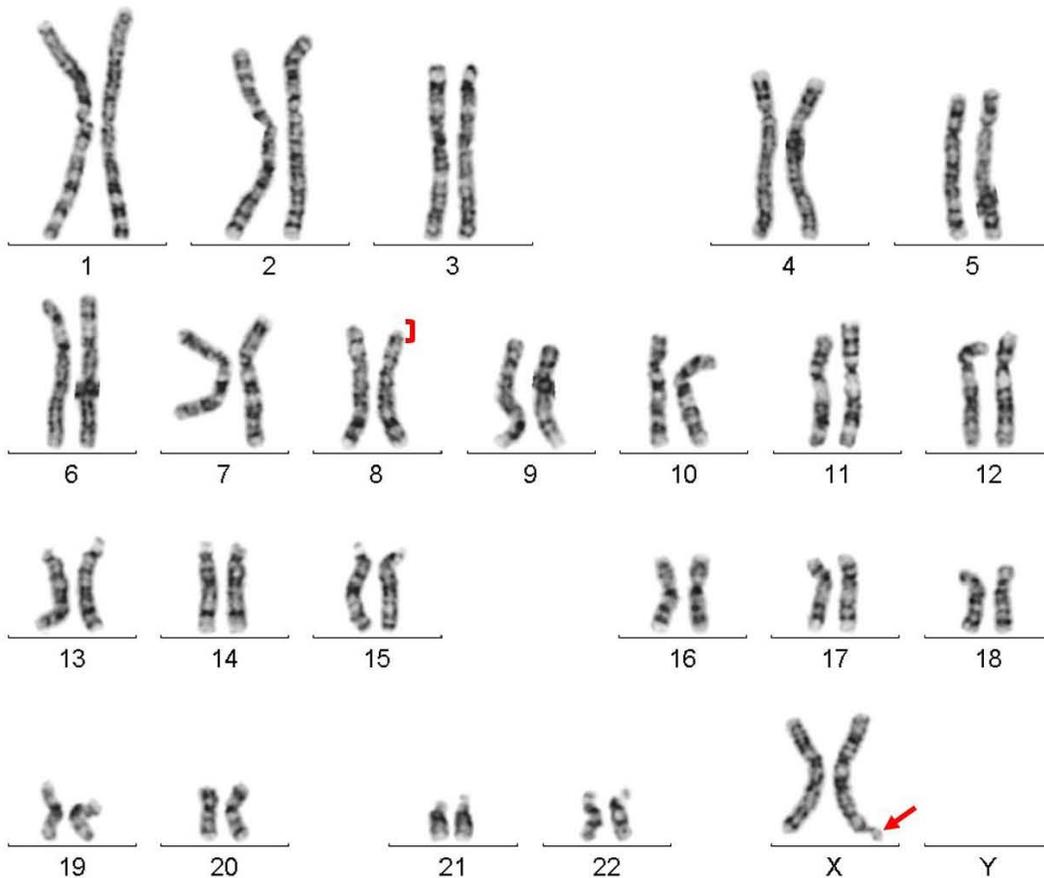


Figura 47. Cariotipo en sangre periférica con bandas G. Formula cromosómica del individuo III.6  $46,X, fra(X), del(8)(p23.1)$ . Se puede observar la fragilidad cromosómica aun en un cariotipo convencional (flecha), y la deleción en el cromosoma 8p (corchete)

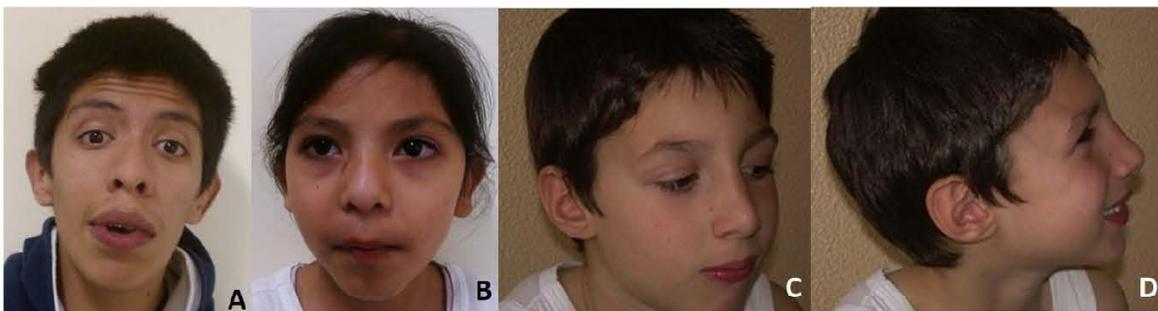
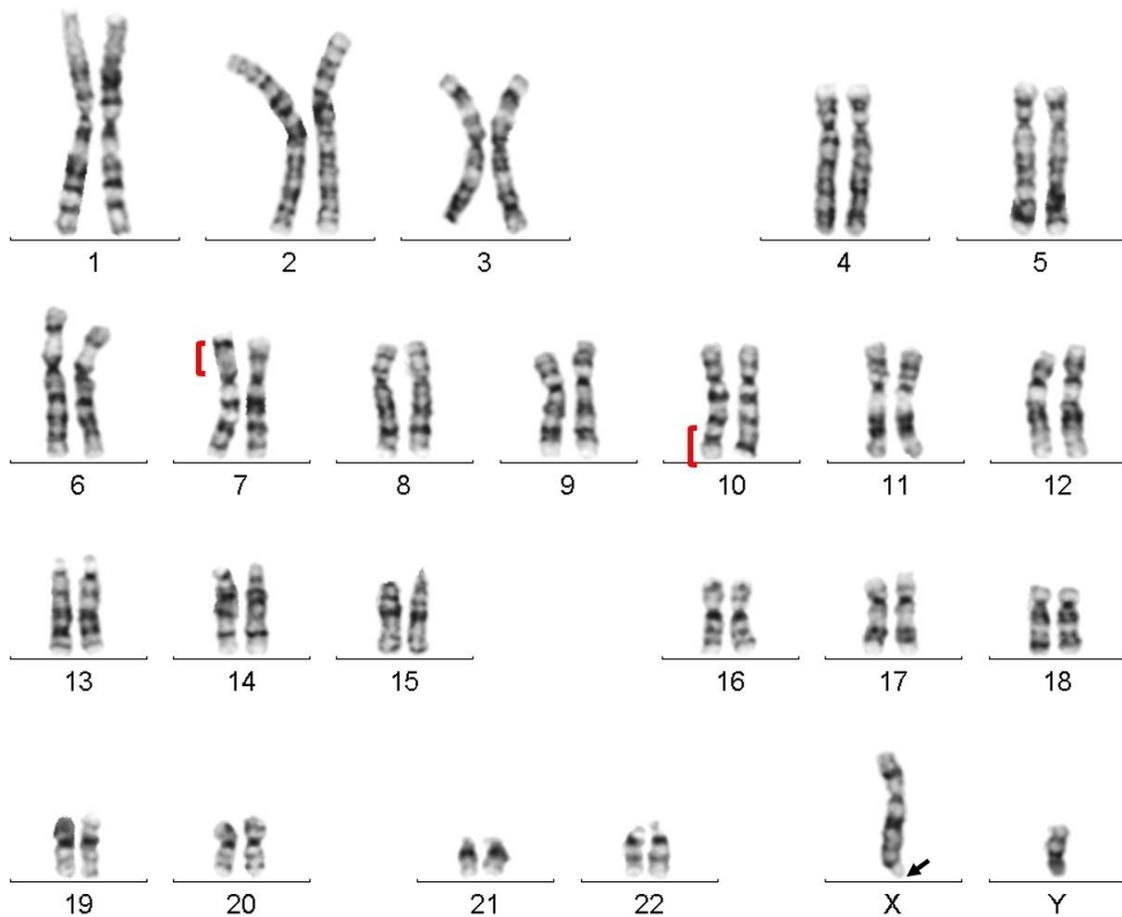


Figura 48. A. Masculino de 18 años con facies alargada con mentón prominente, pabellones auriculares grandes, con estudio molecular positivo para FXS. B. Femenino de 8 años con cara ovalada con mentón prominente, pabellones auriculares grandes de baja implantación, frente amplia y puente nasal alto con estudio molecular positivo para FXS y cariotipo con  $46,XX, del(8)(p23.1)$ . C y D Vista frontal y lateral de masculino de 6 años 2 meses donde se observa la frente amplia, los ojos hundidos, puente nasal alto y pabellones auriculares de implantación baja con hipoplasia de anti-hélix con deleción 8p.

*Imágenes C y D modificadas de European Journal of Medical Genetics 54 (2011) 55-59*

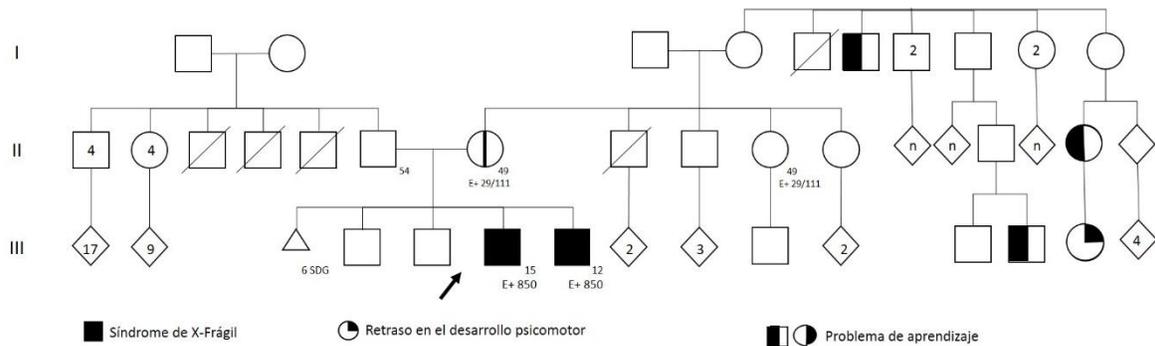
Al individuo III.5 se le realizó el cariotipo bajo técnica convencional en el cual se encontró una translocación balanceada entre el cromosoma 7 y el 10, con puntos de ruptura en  $t(7;10)(p10;q24)$ , en este se puede observar la fragilidad cromosómica X aun en una cariotipo con técnica convencional y no con el cultivo pobre en folatos (ver figura 49), con este antecedente se realizó el cariotipo a ambos padres para determinar si esta es una translocación heredada o de novo, y se encontro que el padre es portador de la misma  $t(7;10)(p10;q24)$ , que al ser balanceada no tiene ninguna implicación en el fenotipo del paciente.



**Figura 49. Cariotipo en sangre periférica con bandas G del individuo III.5: Formula cromosómica**  $46,Y, fra(X)(q27.3), t(7;10)(p13;q24)$ . Se puede observar la fragilidad cromosómica aun en un cariotipo convencional (flecha)

### 7.5.3 Familia C

Es originaria y residente de Ecatepec de Morelos, Estado de México, como se puede observar en el árbol genealógico de esta familia (ver Fig. 49) el caso índice fue el individuo III.30 (caso 20) y posterior a la realización de la historia clínica completa se decidió incluir al individuo III.31 (caso 21) que es hermano de nuestro probando, ya que ambos presenta características que son compatibles con FXS (ver tabla 17), como se puede ver el individuo II.13 madre es portadora del premutación con 111 repetidos CGG, el cual tiene un riesgo de 100% de expandir a mutación completa en la siguiente generación (Hersh et al., 2012), como se ve en el árbol genealógico.



**Figura 50.** Árbol genealógico de la familia C. Individuos III.30 y III.31 portadores de la mutación completa para FXS. Individuos III.39, II.22 y I.6 con problemas de aprendizaje. Individuos III.40 con retraso en el desarrollo psicomotor; II.13 portadora de la premutación. E+: Estudio molecular positivo para FRAXA. E-: Estudio molecular negativo para FRAXA.

Es importante mencionar que la madre de estos pacientes no presenta datos de FXPOI o FXTAS.

## 8 DISCUSIÓN

El síndrome de X – Frágil es considerada como la principal causa de retraso mental de etiología hereditaria (Guillén-Navarro et al., 2008; Hagerman PJ, 2008; García et al., 2008; Pretto et al., 2014; Puig et al. 2014), sin embargo hasta la fecha existen diversos aspectos clínicos y genéticos de la enfermedad que no han sido explorados, por lo que su estudio y caracterización es de gran relevancia. FXS es una enfermedad genética que presenta un patrón de herencia ligada al cromosoma X dominante con una penetrancia reducida, por lo que afecta de manera general a individuos de sexo masculino, sin embargo existen diversos reportes de casos de mujeres afectadas (Willemsen et al, 2011), por lo tanto a nivel mundial se ha reportado que la prevalencia para la mutación completa en los hombres es de 1:4000 hombres, mientras que para las mujeres es de 1:8000.

El conocimiento de la sintomatología y pronóstico de la enfermedad va de la mano con el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, a pesar de que no se conoce de manera completa los mecanismos que llevan al desarrollo de la patología, a finales del siglo pasado y principios del presente, se ha iniciado a dilucidar los principales mecanismos involucrados en FXS. El FXS está causado por un deficiencia o ausencia de la proteína FMRP, que en el 99% de los casos esta ocasionada por una expansión anormal de los repetidos CGG en la región 5' UTR del gen *FMR1*, que se localiza en el locus Xq27.3 (Willemsen et al., 2014; Hunter et al, 2014). Existe un rango de repetidos normales que contienen de 5 a 45 repetidos CGG que generalmente se presenta en la población general, mientras tanto la presencia de alelos entre 45 y 200 repetidos CGG pueden presentar inestabilidad, lo que produce expansiones en futuras generaciones. Dentro de este espectro de repetidos se han definido como alelos intermedios (zona gris) a los alelos que contienen de 45-55 repetidos CGG, ya que a pesar de presentar inestabilidad, nunca se han asociado con la aparición de algún síntoma, mientras que los alelos denominados como “premutación” contienen de 55-200 repetidos CGG y a pesar de no presentar el cuadro clínico clásico de FXS, se relacionan con la presencia fenotípica de FXPOI, que con el paso de una generación a otra puede

expandirse a niveles de una mutación completa, principalmente por transmisión materna. Finalmente, los alelos con mutación completa presentan más de 200 repetidos CGG y se asocian con la hipermetilación del gen *FMR1*, que ocasiona la pérdida de la expresión de la proteína FMRP, que es la causa de este síndrome (Hersh et al., 2011; Hunter et al., 2014). Por lo tanto es importante realizar el diagnóstico molecular con técnicas sensibles y específicas para determinar el número de repetidos y con ello ayudar a identificar tanto a pacientes afectados como a portadores asintomáticos, ya que de esta forma se puede inferir el pronóstico y el riesgo de cada individuo de transmitir la enfermedad a la descendencia, y esto puede favorecer la disminución de la aparición de nuevos casos.

Hasta la fecha se sabe que son pocas las instituciones de salud que cuentan con un diagnóstico certero para esta patología, principalmente debido a que los procesos diagnósticos son costosos. Esto es muy relevante para nuestra población, ya que como se describió anteriormente es la causa más importante de retraso mental, no obstante existen algunos reportes en la literatura donde se describen muy pocos casos de FXS en nuestro país (González-del Ángel et al., 2000), por lo que también es importante obtener una mejor estrategia de selección de pacientes a través de un estudio clínico detallado. Ante este escenario, se ha planteado caracterizar a la patología desde el punto de vista genético y clínico, con la finalidad de dirigir el diagnóstico tanto en pacientes como a familiares, y lograr tener un alcance para la mayor población posible, y con ello tratar de reducir su impacto en la salud pública que esto causa, así como aplicar acciones tanto preventivas como de seguimiento en base a lo que se conoce de la patología.

### 8.1 Sensibilidad de la técnica diagnóstica

Por mucho tiempo el diagnóstico molecular certero de la patología se realizó mediante la implementación de la técnica southern blot, sin embargo se sabe que puede presentar algunas limitaciones para determinar el número exacto de repetidos en rangos de normalidad y premutación, y en ciertos casos tener un bajo poder de discriminación debido

a la presencia de alelos conformados por más de 1000 repetidos, ya que se corre el riesgo de obtener un resultado falso negativo debido a la baja eficiencia de amplificación de un alelo tan grande conformado por repetidos CGG.

Por lo tanto, como primera fortaleza de nuestro estudio fue la confirmación del diagnóstico molecular basado en la técnica de PCR y TP-PCR acopladas a electroforesis capilar, el uso de un estuche diagnóstico que contemple la fusión de ambas técnicas proporciona una alta sensibilidad para determinar el número exacto de repetidos con un límite de detección de alrededor de 200 repeticiones CGG (Monaghan et al., 2013). Pero aún en el caso de alelos mayores de 200 repetidos, dicha técnica no es un inconveniente ya que determina la presencia de un alelo mutado y estima un número aproximado de repetidos, esto gracias a que se han implementado coadyuvantes de la reacción que hacen más eficiente la amplificación por PCR (Monaghan et al., 2013). Por lo tanto se puede determinar la presencia de FXS, ya que el número de repeticiones por encima de 200 repetidos no modifica fundamentalmente el cuadro clínico del paciente, en sentido contrario, en los portadores con <200 repetidos el fenotipo si se puede ver modificado dependiendo el número de expandidos, por este motivo es más valioso que sea sensible en este rango, ya que de esta manera se puede brindar un mejor asesoramiento genético. Aunado a estos aspectos la eficiencia y su rapidez de implementación hacen que éste método pueda ser utilizado como un método de diagnóstico rutinario a diferencia del Southern blot.

## 8.2 Selección de pacientes con probable FXS

En este trabajo caracterizamos un grupo de 26 pacientes con déficit intelectual y características fenotípicas que se pueden asociar con el FXS, interesantemente en la mayoría de los casos se observó una historia familiar que sugería un patrón de herencia ligado a X; por lo que se decidió realizar un estudio clínico para definir de forma más detallada los signos y síntomas asociados directamente a la patología en pacientes de origen Mexicano. Anteriormente, en nuestra población solo se cuenta con un reporte en el cual se analizó clínica y molecularmente a pacientes con DI (González-del Ángel et al., 2000), en

dicho estudio se reportó una muy baja frecuencia de FXS, muy por debajo a lo reportado en la literatura. Por lo que la primera incógnita es “¿si la presencia de FXS en nuestra población es diferencial a lo reportado a lo largo del mundo?”. Sin embargo, al realizar un análisis detallado de lo reportado, una de las posibles causas de este resultado podría estar cimentada en la selección de pacientes, ya que su análisis clínico solo se basó de manera general en la puntuación de Hagerman, refiriendo un rango de puntuación de sus pacientes por debajo de los 16 puntos. Por ello, en nuestro estudio se analizó clínicamente a los pacientes mediante la escala de Hagerman, además de la escala modificada de Milá para definir de mejor manera como seleccionar a los pacientes y discriminar pacientes que no cumplen con ciertos parámetros para ser incluídos en un estudio molecular. Aunado a esto, todos los pacientes con DI seleccionados se exploraron físicamente y se interrogaron intencionadamente en busca de características clínicas como son macrocefalia relativa, frente ancha, nistagmos, estrabismo, paladar alto o arqueado, malposición dental, defectos en la refracción, talla alta, pie plano, piel delgada, pliegue palmar único, escoliosis, alteraciones cardiacas, obesidad, retraso en el desarrollo psicomotor, ansiedad, rabietas, desorden del espectro autista entre otras manifestaciones, en base a las principales características clínicas reportadas por Gallagher et al., 2012; Pirozzi et al., 2011; Hersh et al., 2011; McLennan et al., 2011; Hagerman & Hagerman 2013; Leehey, 2009. Todo ello con la finalidad de establecer una mejor selección de los pacientes.

<b>Tabla 20. Estudios de FXS en pacientes con DI en México</b>		
	<b>González-del Ángel et al., 2000</b>	<b>Nuestro estudio</b>
<b>Total</b>	62	26
<b>FRAXA</b>	3%	31%
<b>No FRAXA</b>	97%	69%

Tomando en cuenta estos aspectos, en nuestro estudio los casos positivos para FXS mostraron un valores hasta de 20 puntos en la escala de Hagerman muy por encima de los reportado por González et al., lo que refleja una mayor identificación de casos de FXS (tabla

20), por lo tanto es de gran relevancia tener un estudio clínico mucho más detallado para poder filtrar un mayor de casos negativos.

Para mostrar esta hipótesis seleccionamos diversos trabajos reportados en la literatura (Tabla 21), en los cuales no existen criterios estrictos en la selección de pacientes y solo se basa en que los pacientes deben presentar como signo característico el déficit intelectual. Además en los estudios realizados por Butler et al., y Turner et al., en 1991 y 1996 respectivamente el diagnóstico no fue mediante técnicas de biología molecular, sino por la realización de un diagnóstico citogenético, y esto último puede favorecer la presencia de falsos negativos. Como se puede observar en la tabla 21, los resultados muestran que en esos trabajos el porcentaje de pacientes positivos es muy bajo.

**Tabla 21. Diagnóstico de FXS en pacientes con DI**

	Butler et al., 1991*	Morton et al., 1997	De Vries et al., 1997	Crawford et al., 1999	Iqbal et al., 2000	Guruju et al., 2009	González – del Ángel et al., 2000*
<b>Total</b>	188	163	1519	1979	305	327	62
<b>FRAXA</b>	10%	7%	3%	0.25%	9%	8%	3%
<b>No FRAXA</b>	90%	93%	97%	99.75%	91%	92%	97%
	Turner et al., 1996	Arvio et al., 1997	Elbaz et al., 1998	Patsalis et al., 1999	Al Husain et al., 2000	Nuestro estudio*	
<b>Total</b>	472	344	219	611	94	26	
<b>FRAXA</b>	2%	11%	3%	1%	6%	31%	
<b>No FRAXA</b>	98%	97%	97%	99%	94%	69%	

\*Utilización de la puntuación de Hagerman para caracterizar a los pacientes.

Por lo que los resultados del presente trabajo sugieren que a partir de una mayor sensibilidad de la técnica diagnóstica y/o una caracterización detallada de los pacientes se puede dirigir de manera más adecuada el diagnóstico de FXS. Sin embargo, también es importante considerar que el tamaño de muestra de nuestro estudio aún es limitado, y que 4 casos también resultaron surgir de un caso familiar, por lo que es importante aumentar el número de individuos analizados para tener conclusiones finales.

### 8.3 ¿Cómo caracterizar finamente a los pacientes con probable FXS?

Ante los datos sugestivos que nos llevan a realizar un diagnóstico clínico detallado para dirigir de manera más adecuada al diagnóstico de FXS, decidimos analizar diferencias entre los pacientes confirmados con FXS y los pacientes confirmados como negativos para la mutación en el gen FMR1.

Tabla 20. Datos clínicos en pacientes con Síndrome de X - Frágil								
Datos clínicos	1	2	3	20	21	24	25	26
Sexo	M	M	F	M	M	M	M	M
Edad	10	17	7	15	12	11	15	11
Consanguinidad	-	-	-	-	-	-	-	-
Endogamia	-	-	-	-	-	-	-	-
Historia familiar DI	+	+	+	+	+	+	+	+
Talla alta	TN	TN	TA	TA	TN	TN	TN	TN
Macrocefalia relativa	-	-	-	-	-	-	-	-
Cara alargada	+	+	+	+	+	+	+	+
Frente prominente	+	+	+	+	+	+	+	+
Pabellones auriculares grandes	+	+	+	+	+	+	+	+
Estrabismo	-	-	-	+	-	-	-	-
Paladar alto y arqueado	+	+	+	+	PH	+	+	+
Malposición o apiñamiento dental	+	+	+	+	+	+	+	+
Macroorquidismo	D	+	-	+	-	D	D	+
Cardiopatía	-	-	CIA	-	-	-	-	-
Hipotonía generalizada	-	+	+	-	-	-	-	-
Pliegue palmar único	-	-	-	-	-	-	-	-
Hiper movilidad pequeñas articulaciones	-	+	+	+	+	-	-	-
Escoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Crisis convulsivas	-	-	-	-	-	+	-	+
Obesidad	-	-	-	-	-	-	-	-
Déficit intelectual (DI)	+	+	+	+	+	+	+	+
Retraso en el desarrollo psicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+
Ansiedad	-	-	+	-	-	-	-	-
Hiperactividad	+	+	+	+	+	+	+	+
Poco contacto visual	+	-	-	-	-	+	+	+
Retraso o ausencia de lenguaje	+	+	+	+	+	+	+	+
Lenguaje preservado	+	-	+	+	+	+	-	+
Movimientos estereotipados	+	+	+	-	-	-	+	+
Autismo	-	-	+	-	+	-	-	-

M: Masculino; F: Femenino; (-): Negativo; (+): Positivo; (D): Dudoso; TN: Talla Normal; TA: Talla alta; TB: Talla baja; CIA: Comunicación interauricular; PH: Paladar hendido

Como se puede observar en la Tabla 20 hay datos clínicos que se pudieron observar en el 100% de los pacientes con FXS como es el caso del déficit intelectual, el antecedente de retraso en el desarrollo psicomotor e historia familiar de déficit intelectual, la cara alargada, frente prominente, pabellones auriculares grandes, inadecuada posición dental e hiperactividad, finalmente otras características importantes que el 100% de los pacientes no presentaron fue la ausencia de consanguinidad, macrocefalia relativa, pliegue palmar único y escoliosis, que a pesar de ser características reportadas en pacientes con FXS en

nuestros pacientes no se presentaron. Aunado a esto, se han tratado de establecer parámetros para definir a pacientes candidatos para el diagnóstico molecular de FXS.

Debido a esto Hagerman et al en 1991 desarrollaron una lista con 13 elementos (anexo 3) que fueron las características más representativas en una cohorte de 15 pacientes con FXS en comparación con 91 controles (Lachiewicz et al., 2000). En base a este estudio decidimos buscar estos rasgos en nuestros pacientes para identificar si nuestra población comparte las características clínicas y psicológicas reportadas como más frecuentes en la literatura, de igual forma hicimos una revisión exhaustiva de todos los datos reportados que pueden presentarse en un paciente con FXS (tabla 2 y tabla 16), para identificar si había alguna característica aparte de las 13 principales, como se puede observar en la figura 42. A los pacientes se les aplicó la puntuación de Hagerman y se encontró que 7/8 pacientes presentaron un puntaje igual o mayor a 16 puntos, lo cual es altamente sugestivo de FXS según lo reportado por Hagerman et al., 1991; para reforzar estos parámetros también se utilizó el punto de cohorte reportado por Milá et al, en el cual con una puntuación de 13 o más considera que el cuadro clínico es muy sugestivo de FXS, ya que de los pacientes totales estudiados 12 quedaron dentro del rango establecido por Milá et al., de estos 12, 8 tuvieron un diagnóstico molecular positivo para FXS. Los pacientes negativos tuvieron un puntaje promedio de 11 puntos (rango de 7 a 15).

En base a esto podemos decir que si se utiliza la puntuación de Hagerman et al., es muy probable que al realizar el estudio molecular este sea positivo, sin embargo se pueden presentar pacientes que no alcancen el puntaje requerido debido a la edad o que como el cuadro clínico de esta enfermedad es variable no presenten todos los datos clínicos esperados. Por lo cual es importante considerar la modificación establecida por Milá et al, para abarcar con mayor seguridad a un número mayor de pacientes positivos para la patología (ver Fig 43). El uso de ambas escalas nos lleva a tener un mayor control en la selección de pacientes para referirlo a un estudio molecular.

Nuestros resultados sugieren utilizar conjuntamente la escala definida por Hagerman, así como la escala modificada por Milá (Milá et al., 1996). En base a los resultados de ambos investigadores y conforme a lo analizado en nuestra cohorte de pacientes, los pacientes que presenten valores por encima de 13 puntos son candidatos a diagnóstico molecular. Esta práctica debe ser importante en los servicios de salud, ya que generalmente en nuestro entorno no son tomados en consideración. La realización de un análisis clínico detallado es fundamental para no exceder el número de estudios moleculares específicos para FXS, lo cual repercute directamente en la economía del paciente y del sector público de salud, además esta práctica puede garantizar agilizar el diagnóstico de patologías relacionadas y no entorpecer la búsqueda de otras posibles causas asociadas al DI. Será responsabilidad del médico especialista determinar a través de las características clínicas de los pacientes que se encuentren en el umbral cercano a 13 puntos, si es posible que se les pueda realizar dicho estudio. Por otro lado, en pacientes con valores por debajo de 11 puntos no serían candidatos al diagnóstico molecular, por lo cual el diagnóstico se debe enfocar alguno de los diagnósticos diferenciales. Los resultados de este trabajo nos pueden sugerir una mejor manera de dirigir el diagnóstico de pacientes con probable FXS.

La edad promedio de diagnóstico de nuestros pacientes fue de 13 años para los hombres y 7 años para la mujer, lo que en el caso de los hombres es mayor a lo reportado en la literatura donde se establece que la edad promedio de diagnóstico del FXS es de 5 a 7 años para los hombres y 9 años para las mujeres, el retraso en el diagnóstico puede estar atribuido a la falta del diagnóstico molecular disponible para todos los paciente, ya que la mayoría de los pacientes tenían el diagnóstico probable de FXS desde tres años antes de su confirmación molecular. En el caso de las mujeres su diagnóstico estuvo ligeramente por debajo de lo esperado, este último puede estar atribuido a que al ser una enfermedad ligada al X no es común encontrar mujeres afectadas, en el caso de nuestra paciente algo que ayudo para su diagnóstico fue el antecedente de un hermano con datos clínicos de FXS (Mandel et al., 2004; Bailey et al., 2009); el retraso en el diagnóstico es un punto importante a tener en cuenta, ya que al no existir estudios disponibles para todos los pacientes que

presente datos clínicos compatibles no es fácil comprobar el diagnóstico clínico y al suceder esto no se puede brindar un adecuado asesoramiento genético, lo que puede favorecer que pueda existir varios afectados en una sola familia. Todo lo anterior ilustra la importancia de este estudio ya que se pudo demostrar que la técnica de biología molecular utilizada por nosotros es de fácil aplicación, y puede ayudar a un diagnóstico tanto de pacientes con FM como de las madres portadoras.

#### 8.4 Premutación y portadoras

Según lo reportado por Wittenberg et al., 2007; Willemsen et al., 2011; Pirozzi et al., 2011; Hersh et al., 2011; Abrams et al., 2012; Gallagher et al., 2012, aproximadamente el 20% de las mujeres portadoras de la premutación presentan FXPOI, en comparación con el 1% de la población general, sin embargo en nuestro estudio de las mujeres en las familias con resultado positivo para FXS, se investigó el antecedente de FXPIO, y se ofreció el estudio molecular, el cual se realizó a 6 mujeres de las cuales 5 fueron positivas para la premutación, de estas 6 mujeres, 4 son madres de niños con FSX, y 2 son hermanas de dos de estas mujeres. Entre las 5 mujeres con premutación encontramos que solamente una presentó FXPIO, lo que equivale 20% de nuestra población, lo que es congruente con lo reportado en la literatura.

Se realizó el estudio molecular para búsqueda de la premutación a todas las madres de los pacientes que sometimos al estudio (ver Fig. 44), de los 8 pacientes con estudio molecular positivo se corroboró que las madres son portadoras de la premutación, lo que es correspondiente con lo reportado por diversos autores (Hagerman et al., etc), así mismo por lo postulado por Sherman en lo que se denominó como “Paradoja de Sherman” (ver Tabla 1) donde dice que todas las madres de los pacientes con FM son portadoras de la premutación y que no existen casos de novo (Sherman et al., 1984; Sherman et al., 1985; Abrams et al., 2012).

En las mujeres estudiadas que no presentaron la premutación el rango de repetidos fue de 29 a 31 repetidos CGG, con un promedio de 30 repetidos CGG, lo que concuerda con lo reportado por Núñez et al. en 2008 donde publica que en la población mexicana el rango de repetidos CGG es de 31 a 35 con un promedio de 32 repetidos CGG, ya que nuestro resultado cae en este rango, sin embargo es importante tener en cuenta que la mayoría de nuestra población es del centro del país, y el promedio de repetidos puede cambiar dependiendo de la región del país de donde provenga.

Es importante que a los pacientes que se encuentran en el rango de premutación se les dé un asesoramiento genético adecuado y para esto es importante conocer el número exacto de repetidos CGG, cuestión que el tipo de técnica molecular utilizada en este estudio permite. El asesoramiento genético debe ser personalizado ya que esto se puede ver modificado dependiendo de cuál de los padres sea el portador de la premutación, siendo más común que la mujer sea la que herede la enfermedad, así como del número de repetidos CGG que tenga el portador. Para proporcionar un riesgo de recurrencia más adecuado durante el asesoramiento genético podemos basarnos en las tablas publicadas por Yrigollen et al., 2014 (ver sección de asesoramiento genético) donde por estudios realizados en varias mujeres portadoras nos permite dar un porcentaje de riesgo de la expansión de la premutación dependiendo del número de repetidos, la edad materna y en caso de conocer el número de interrupciones AGG, ya que todos estos factores pueden modificar el riesgo de expansión, al conocer este riesgo es importante conocer que opciones reproductivas se le pueden ofrecer a nuestra paciente. Además la adecuada intervención de estos pacientes nos lleva a fortalecer el apoyo psicológico de los pacientes y familiares e implementar técnicas de tratamiento vía diferentes especialidades para dar un tratamiento integral del paciente y mejorar su calidad de vida.

## 8.5 Síndrome de X – Frágil vs Síndrome de Delección 8p-

Finalmente, dentro de los hallazgos que se obtuvieron de éste trabajo fue la descripción de un caso familiar de FXS peculiar, donde encontramos un paciente que aparte presentar la mutación

completa para FXS presentó un cariotipo en sangre periférica donde se observa una deleción en el brazo corto del cromosoma 8, donde las características clínicas que presenta nuestra paciente se pueden confundir el diagnóstico, ya que las principales características clínicas reportadas en el síndrome por deleción 8p- son microcefalia, la presencia de cardiopatía congénita, hernia diafragmática, hipospadias en varones, déficit intelectual de leve a moderado, alteraciones en el comportamiento como TDAH, hiperactividad e impulsividad y problemas de atención (Ballarati et al., 2011). Sin embargo mostró tener una expansión de >200 repetidos CGG en el gen *FMR1* en uno de sus cromosomas X, de manera similar a su hermano quien muestra también la expansión de >200 repetidos CGG presentando un fenotipo más franco para FXS. Considerando las características clínicas y facies de la paciente y de los reportados en la literatura (FIG 48), parecerían que son sugestivos de FXS. Este caso nos sugiere que ambos datos clínicos se sobrelapan por lo que se sugiere probablemente exista un efecto sinérgico entre ambas entidades o que al presentar características similares y tan frecuentes ambas entidades no se pueda diferenciar entre ambas. De acuerdo a nuestro conocimiento éste sería el primer caso en la literatura que presente estas características en una misma familia analizada.

*En resumen, el presente estudio nos ayudó a lograr una mejor manera de como dirigir el diagnóstico de pacientes con FXS, ya que se observó que con las escalas utilizadas y los datos clínicos que se buscaron en los pacientes, se logró obtener y definir mejor los datos clínicos que son mas importantes buscar en los pacientes que se consideran como candidatos para el estudio molecular.*

## 9 CONCLUSIONES

- a. Se demostró que un adecuado análisis clínico, considerando las características específicas de la patología a través de una exploración física detallada y el uso de las

escalas clínicas de manera adecuada considerando el puntaje obtenido con la escala de Hagerman y la escala modificada por Milá, ayuda a dirigir de manera más adecuada hacia el diagnóstico de FXS, incrementando la posibilidad de obtener un resultado positivo a través del diagnóstico molecular, lo cual hace más eficiente y menos costoso su implementación en los sistemas de salud a nivel nacional.

- b. Los pacientes con FXS presentan una puntuación en la escala de Hagerman  $\geq 15$  puntos, mientras que los casos negativos en promedio tienen un puntaje de 11. Además el uso complementario de la escala de Milá provee una mayor eficiencia para descartar pacientes negativos para FXS considerando como un valor de corte adecuado de 13 puntos.
- c. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestra cohorte de trabajo la frecuencia de FXS fue de 30.7% con respecto a pacientes que presentan DI con características clínicas compatibles con los pacientes de FXS. Por lo tanto no debe considerarse exclusivamente la presencia de DI para realizar descartar diagnóstico de FXS.
- d. La única estrategia para determinar si un paciente es positivo para FXS es el diagnóstico molecular. En este sentido el diagnóstico molecular basado en PCR y TP-PCR acoplado a electroforesis capilar es muy confiable y permite obtener eficientemente el número exacto de repetidos en el rango de premutación, por lo cual se puede utilizar como un diagnóstico de uso rutinario.
- e. La implementación del estudio molecular sustentado en un detallado análisis clínico favorece el asesoramiento genético adecuado y específico para cada caso. Y por ende se optimiza el tratamiento en cada uno de los pacientes, eliminando costos innecesarios en su seguimiento.

- f. La identificación de mujeres portadoras puede contribuir a la planificación familiar, gracias a un asesoramiento genético apropiado y sugiriendo programas de diagnóstico pre-natal y pre-implantación.

- a. Realizar el estudio a mayor escala para conocer la prevalencia de la patología en nuestro entorno.
- b. Formular una guía para el diagnóstico de FXS más detallada y que pueda ser utilizada e implementada en diversos sistemas de salud a lo largo de la república
- c. Realizar estudios familiares, para identificar transmisión de la enfermedad
- d. Reportar los cambios fenotípicos en los pacientes, para caracterizar más finamente la patología, desde un punto de vista clínico y molecular
- e. Analizar a la población general representativa del país para determinar promedio de repetidos y prevalencia de portadores.

# 11 ANEXOS

## 11.1 Anexo 1. Carta de consentimiento informado



Instituto Nacional  
de Rehabilitación  
Servicio Genética y  
Medicina Genómica

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

#### A Quién Corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el proyecto de investigación **"Desarrollo de nuevos métodos diagnósticos para enfermedades neurodegenerativas producidas por expansiones de tripletes repetidos"** a cargo del D. EN C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE con n° de registro PICSA 12-162, que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación.

He sido informado que el estudio consiste en la implementación de un mejor método diagnóstico del Síndrome de X Frágil analizando los factores hereditarios que provocan mi enfermedad. Esto se realiza tomando una muestra de sangre de la vena del brazo para obtener una muestra de mi material hereditario (DNA), existiendo una mínima posibilidad de que se forme un moretón.

Estoy en el entendimiento que de este estudio se obtendrán como beneficios el desarrollo de mejores formas de diagnosticar la enfermedad, un mejor entendimiento, así como establecer de manera más adecuada el riesgo de transmisión a la descendencia y distinguir entre esta enfermedad y otros padecimientos hereditarios.

Es de mi conocimiento que este estudio no tiene ningún costo para mí. También se me explicó que es posible que se guarde una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, ya que posteriormente se podría estudiar otros factores que en este momento es imposible analizar y que la información obtenida será confidencial. Así mismo, se me ha explicado que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación y que estoy en libertad de negarme a participar en el estudio, sin que esto modifique la calidad de atención médica que reciba en el Instituto. Finalmente autorizo que se tomen fotografías clínicas que podrán ser utilizadas con fines de publicación en revistas científicas de difusión, para conocimiento de mi enfermedad.

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ N° exp: \_\_\_\_\_

FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR: \_\_\_\_\_

**JEFE DEL SERVICIO:**

**RESPONSABLE DEL PROYECTO:**

**DR. NORBERTO LEYVA GARCÍA**

**D. EN C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE**



Hospital Certificado  
Consejo de Salubridad General  
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica  
Centro Colaborador de la OPS/OMS para  
la Investigación y Rehabilitación Médica  
2011-2015



Certificado ECMX-0540/09  
ISO 9001:2008  
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.  
Tel.: (55) 5999 1000 [www.inr.gob.mx](http://www.inr.gob.mx)

## 11.2 Anexo 2. Hoja de recolección de datos

### Síndrome de X-Frágil

Nombre: \_\_\_\_\_  
Edad: \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_  
Toma de muestra: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Tutores: \_\_\_\_\_



#### ÁRBOL GENEALÓGICO

#### ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES:

- Falla ovárica prematura     Ataxia     Déficit intelectual     Hipotensión

#### Madre:

- Pabellones auriculares grandes     Depresión     FOP  
 Hiper movilidad de pequeñas articulaciones     Toxicomanías     FXTAS  
 Ansiedad     Mialgias     Enfermedad tiroidea  
 Obsesiva     Fibromialgia     CI: \_\_\_\_\_  
 Hipertensión

#### ANTECEDENTES DEL PACIENTE:

##### Menores de 3 años:

- Retraso/ausencia del lenguaje     RDPM     Poco contacto visual  
 Hipotonía     Aleteo en manos     Emesis constante

##### Desarrollo psicomotor:

Succión: \_\_\_\_\_ Sostén cefálico: \_\_\_\_\_ Dentición: \_\_\_\_\_ Ablactación: \_\_\_\_\_  
Sedestación: \_\_\_\_\_ Bipedestación: \_\_\_\_\_ Gateo: \_\_\_\_\_ Marcha asistida: \_\_\_\_\_  
Marcha independiente: \_\_\_\_\_ Control de esfínteres: \_\_\_\_\_ Balbuceo: \_\_\_\_\_ Monosílabos: \_\_\_\_\_  
Palabras: \_\_\_\_\_ Frases: \_\_\_\_\_

#### CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y PSICOLÓGICAS DEL PACIENTE:

##### Características faciales

- Macrocefalia relativa     Ptosis palpebral     Paladar alto / arqueado     Malposición / apiñamiento dental  
 Frente ancha     Nistagmus     Hiperopia  
 Cara larga y estrecha     Estrabismo     Astigmatismo  
 Orejas prominentes     Paladar hendido

**Características físicas**

- |   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Talla alta       | <input type="checkbox"/> PEV                  | <input type="checkbox"/> Hiperlaxitud            | <input type="checkbox"/> ERGE                    |
| <input type="checkbox"/> Macro-orquidismo | <input type="checkbox"/> Pliegue palmar único | <input type="checkbox"/> Crisis convulsivas      | <input type="checkbox"/> Otitis media repetición |
| <input type="checkbox"/> Piel delgada     | <input type="checkbox"/> DDC                  | <input type="checkbox"/> Prolapso válvula mitral | <input type="checkbox"/> Hipertensión            |
| <input type="checkbox"/> Pie plano        | <input type="checkbox"/> Escoliosis           |  |  |

**Características psicológicas**

- |  |   |  |   |
|--|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Déficit intelectual | <input type="checkbox"/> Ansiedad               | <input type="checkbox"/> Labilidad emocional | <input type="checkbox"/> Déficit funciones ejecutivas |
| <input type="checkbox"/> Obsesividad         | <input type="checkbox"/> Retraso en el lenguaje | <input type="checkbox"/> TDAH                |   |

**Trastorno del espectro autista**

- |                                       |  |  |   |
|---------------------------------------|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Autolesión   | <input type="checkbox"/> Irritabilidad | <input type="checkbox"/> Poca atención                 | <input type="checkbox"/> Hipersensibilidad a estímulos sensitivos |
| <input type="checkbox"/> Agresividad  | <input type="checkbox"/> Distraído     | <input type="checkbox"/> Movimientos estereotipados    |   |
| <input type="checkbox"/> Impulsividad | <input type="checkbox"/> Apáticos      | <input type="checkbox"/> Resistente al contacto físico |   |
| <input type="checkbox"/> Rabietas     | <input type="checkbox"/> Aislamiento   | <input type="checkbox"/> Poco cooperador               |   |



---

---

---

**ESTUDIOS:**

Coficiente intelectual: \_\_\_\_\_

Cariotipo: \_\_\_\_\_

E. Mol: \_\_\_\_\_

EEG: \_\_\_\_\_

IRM: \_\_\_\_\_

USG Testicular: \_\_\_\_\_

### 11.3 Anexo 3. Puntuación de Hagerman

<b>Puntuación de Hagerman (Hagerman et al., 1991)</b>			
	0 puntos	1 punto	2 puntos
Retraso mental	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperactividad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dificultad de atención	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Defensa táctil	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aleteo de manos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mordida de manos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Difícil contacto visual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Habla repetitiva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hiperextensibilidad de la articulación metacarpo-falángica (doble articulación)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Orejas grande y/o prominentes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Macroorquidismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pliegue palmar único o línea de Sydney	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Historia familiar de retraso mental	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

0: No presente; 1: Cuestionable, dudoso o borderline; 2: Presente

## 11.4 Anexo 4. Formato de entrega de resultados (Negativo)



Instituto Nacional  
de Rehabilitación  
Servicio Genética y  
Medicina Genómica

### RESULTADO.

México D.F. a 12 de Diciembre de 2014

Se realizó la detección del número de repeticiones del trinucleótido Citosina-Guanina-Guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen asociado al Síndrome de X frágil (FMR1) al paciente **BERNARDINO MARTINEZ COSME RODRIGO** con fecha de nacimiento 1/01/08.

La prueba consta de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico purificado de sangre completa, analizada a través de electroforesis capilar en un analizador genético.

NÚMERO DE CGG	TIPO DE ALELO	FENOTIPO
< 45	Normal	Normal
46 - 54	Intermedio	
55 - 200	Premutación	FX-TAS / FX-POI
> 200	Mutación Completa	FXS

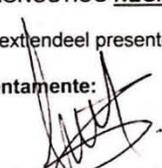
(FX-TAS: Síndrome de Temblor/Ataxia, FX-POI: Insuficiencia Ovarica Primaria, FXS: Síndrome del X frágil)

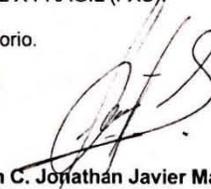
Resultado: El número de repeticiones CGG en el gen FMR1 se encontró por debajo de los 45 tripletes.

DIAGNOSTICO **NEGATIVO** PARA EL SINDROME DEL X FRÁGIL (FXS).

Se extiende el presente como documento clínico probatorio.

Atentamente:

  
Dr. Norberto Leyva García  
Especialista en Genética Médica  
REG.ESP. 3815378 CMG : n° 146

  
Dr. en C. Jorjathan Javier Magaña Aguirre  
Genética y Biología Molecular  
Ced Prof: 5357811



Hospital Certificado  
Consejo de Salubridad General  
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica  
Centro Colaborador de la OPS/OMS para  
la Investigación y Rehabilitación Médica  
2011-2015



Certificado ECMX-0540/09  
ISO 9001:2008  
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.  
Tel.: (55) 5999 1000. [www.inr.gob.mx](http://www.inr.gob.mx)

## 11.5 Anexo 5. Formato de entrega de resultados (Positivo Premutación)



Instituto Nacional  
de Rehabilitación  
Servicio Genética y  
Medicina Genómica

### RESULTADO.

México D.F. a 4 de Diembre de 2014

Se realizó la detección del número de repeticiones del trinucleótido Citosina-Guanina-Guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen asociado al Síndrome de X frágil (FMR1) al paciente **SANCHEZ GONZALEZ MARICELA** con fecha de nacimiento 13/11/1968.

La prueba consta de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico purificado de sangre completa, analizada a través de electroforesis capilar en un analizador genético.

NÚMERO DE CGG	TIPO DE ALELO	FENOTIPO
< 45	Normal	Normal
46 - 54	Intermedio	
55 - 200	Premutación	FX-TAS / FX-POI
> 200	Mutación Completa	FXS

(FX-TAS: Síndrome de Temblor/Ataxia, FX-POI: Insuficiencia Ovárica Primaria, FXS: Síndrome del X frágil)

Resultado: El número de repeticiones CGG en el gen FMR1 se encontró por encima de los 55 tripletes, alelo premutado.

DIAGNOSTICO **PREMUTACION** EN EL GEN ASOCIADO AL SINDROME DE X FRÁGIL (FXS).

Se extiende el presente como documento clínico probatorio.

Atentamente:

  
**Dr. Norberto Leyva García**  
Especialista en Genética Médica  
REG.ESP. 3815378 CMG : n° 146

P. A.

  
**Dr. en C. Jonathan Javier Magaña Aguirre**  
Genética y Biología Molecular  
Ced Prof: 5357811

 Hospital Certificado:  
Consejo de Salubridad General  
2012-2015

 División de Rehabilitación Ortopédica  
Centro Colaborador de la OPS/OMS para  
la Investigación y Rehabilitación Médica  
2011-2015

 Certificado ECMX-0540/09  
ISO 9001:2008  
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.

11.6 Anexo 6. Formato de entrega de resultados (Positivo Mutación completa)



Instituto Nacional  
de Rehabilitación  
Servicio Genética y  
Medicina Genómica

**RESULTADO.**

**México D.F. a 9 de Enero de 2015**

Se realizó la detección del número de repeticiones del trinucleótido Citosina-Guanina-Guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen asociado al Síndrome de X frágil (FMR1) al paciente **ERICK DANIEL HERNADEZ LEDEZMA** con fecha de nacimiento 01/08/2003.

La prueba consta de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico purificado de sangre completa, analizada a través de electroforesis capilar en un analizador genético.

NÚMERO DE CGG	TIPO DE ALELO	FENOTIPO
< 45	Normal	Normal
46 - 54	Intermedio	
55 - 200	Premutación	FX-TAS / FX-POI
> 200	Mutación Completa	FXS

(FX-TAS: Síndrome de Temblor/Ataxia, FX-POI: Insuficiencia Ovarica Primaria, FXS: Síndrome del X frágil)

Resultado: El número de repeticiones CGG en el gen FMR1 se encontró por encima de los 200 tripletes CGG.

**DIAGNOSTICO POSITIVO PARA EL SINDROME DEL X FRÁGIL (FXS).**

Se extiende el presente como documento clínico probatorio.

Atentamente

**Dr. Norberto Leyva García**  
Especialista en Genética Médica  
REG.ESP. 3815378 CMG : n° 146

**Dr. en C. Jonathan Javier Magaña Aguirre**  
Genética y Biología Molecular  
Ced Prof: 5357811



Hospital Certificado  
Consejo de Salubridad General  
2012-2015



División de Rehabilitación Ortopédica  
Centro Colaborador de la OPS/OMS para  
la Investigación y Rehabilitación Médica  
2011-2015



Certificado ECMX-0540/09  
ISO 9001-2008  
2012-2015

Calz. México Xochimilco No. 289, Col. Arrenal de Guadalupe, C.P. 14389, Delegación Tlalpan, México, D.F.  
Tel.: (55) 5999 1000 [www.inr.gob.mx](http://www.inr.gob.mx)

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Abrams L., Cronister A., Brown W., Tassone F., Sherman S., Finucane B., McConkie-Rosell A., Hagerman R., Kaufmann W., Picker J., Coffey S., Skinner D., Johnson V., Miller R., Berry-Kravis E., Newborn, Carrier, and Early Childhood Screening Recommendations for Fragil X., *Pediatrics* 2012; 130:1126-1135.
- Al Husain M., Salih MA, Zaki OK, Al Othman L, Al Nasser MN., A clinical study of mentally retarded children with fragile X syndrome in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med.* 2000 Jan; 20(1)16-9.
- Bagni C, Tassone F, Giovanni N, Hagerman R. Fragil X síndrome: causas, diagnosis, mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest* 2012; 122(12):4314-4322.
- Bagni C., Ostra BA., Fragil X syndrome: From protein function to therapy. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2013.
- Bailey DB., Raspa M., Bishop E., Holiday D., No change in the age of diagnosis for fragile X syndrome: findings from a national parent survey. *Pediatrics* 2009, Aug; 124(2):527-33
- Bardoni B, Schenck A, Mandel J. The fragil X mental retardation protein. *Brain Research Bulletin,* 2001 Vol. 56, Nos 3-4, pp. 375-382.
- Barros Núñez P., Rosales – Reynoso M., Sandoval L., Romero Espinoza P., Troyo Sanromán R., Ibarra B., Genetic variation of the FMR1 gene among four mexican populations: Mestizos, Huichol, Purepecha and Tarahumara. *Am J Hum Biol* 2008; 20: 259-263.
- Basehore M., Friez M., Molecular Analysis of Fragile X Syndrome. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2014, 80:9.5
- Bhakar A, Dölen G, Bear M., The Pathophysiology of Fragil X (and What It Teaches Us about Synapses). *Ann Rev Neurosci* 2012 35: 417-43.
- Biancalana V., Steinbach P., Stenhouse S., Draft Best Practice Guidelines for Molecular Analysis in Fragil X Syndrome. *European Molecular Genetics Quality Network,* 2006.
- Busquets – Garcia A., Maldonado R., Ozaita A., New insights into the molecular pathophysiology of fragile X syndrome and therapeutic perspectives from the animal model. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 53 (2014) 121–126

- Butler MG1, Mangrum T, Gupta R, Singh DN., A 15-item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. *Clin Genet.* 1991 May;39(5):347-54.
- Chaudhary A., Hussein I., Abuzenadah A., Gari M., Bassiouni R., Sogaty S., Lary S., Al-Quaiti M., Al Balwi M., Al Qahtini M., Molecular Diagnosis of Fragil X Syndrome Using Methylation Sensitive Techniques in a Cohort of Patients With Intellectual Disability. *Pediatric Neurology* 50 (2014) 368-376
- Consejo Nacional para Prevenir la Discriminación, Estudio sobre discriminación y discapacidad mental e intelectual, 2009. [http://www.conapred.org.mx/documentos\\_cedoc/E06-2009.pdf](http://www.conapred.org.mx/documentos_cedoc/E06-2009.pdf) [Consulta: lunes 12 de enero de 2015]
- Cortés-Velarde M., Martínez-Rivera M., Menéndez-González M., Otros parkinsonismos de base genética: ataxias espino-cerebelosas, síndrome temblor-ataxia asociado a premutación X frágil y xantomatosis cerebrotendinosa. *Rev Neurol* 2012; 54 (Supl 4); S83-92
- Debacker K., Kooy R. F., Fragile Sites and Human Disease. *Hum. Mol. Genet.* 2007, 16 (Spec No. 2), R150-R158.
- Díaz Gallardo M. Y., Barros Núñez P., Díaz C., Hernández A, Gómez Espinel I, Leal C., Fragoso R., Figuera L, García Cruz D., Ramírez Dueñas M., Cantú J., Molecular characterization of the Fragil – X síndrome in the mexican population. *Arch. Med. Res.* 1995: 26 Suppl: S77-S83.
- Drombrowski C., Lévesque S., Morel M., Rouillard P., Morgan K., Rousseau F., Premutation and intermediate - size FMR1 alleles in 10 572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragil X syndrome alleles. *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol 11, No. 4
- Escalante, J. A., Grunspun, H., and Frotarpassoa, O. Severe sex-linked mental retardation. *Journal de Genetique Humaine*, (1971), 19, 137.
- Fernández E., Rajan N., Bagni C., The FMRP regulon: From targets to disease convergence. *Frontiers in Neuroscience: Neurogenomics*, October 2013: Vol. 7; Article 191
- Gallagher A., Hallahan B., Fragil X – associated disorders: a clinical overview. *J Neurol* 2012, 259; 401-413

- García M., Rodríguez I., Rodríguez J. C., Viguria F., da Silva A., Arnáiz J., Berezo S., Estudio sobre la prevalencia del síndrome de X – Frágil en la población de varones adultos atendidos en los centros de discapacitados intelectuales de Burgos. De la Conducta a la Genética. International Journal of Developmental and Educational Psychology, Nº 1, 2008. pp: 107-116. ISSN: 0214-9877
- Gatta V., Gennaro E., Franchi S., Cecconi M., Antonucci I., Tomasi M., Palka G., Coviello D., Stuppia L., Grasso M., MS-MLPA analysis for FMR1 gene: evaluation in routine diagnostic setting. BMC Medical Genetics 2013, 14:79
- González del Angel A., Vidal S., Saldaña Y, del Castillo V., Alcántara M., Macías M., Luna J., Orozco L., Molecular diagnosis of the fragil X and FRAXE syndromes in patients with mental retardation of unknown cause in Mexico. Ann. Genet. 2000: 43; 39-34.
- Grupo de Investigación en Retraso Mental de Origen Genético (GIRMOGEN), Libro de consulta para familias y profesionales, 2006; Federación Española de Síndrome de X – Frágil.
- Guillén-Navarro E., Glóver-López G., Causas monogénicas del retraso mental ligado a X. REV NEUROL 2006; 42 (Supl 1): S45-9
- Guruju M., Lavanya K., Thelma B., Sujatha M., OmSai V., Naharathna V., Amarjyothi P., Jyothi A., Anandaraj M., Assessment of a clinical checklist in the diagnosis of fragil X syndrome in India. Journal of Clinical Neuroscience 16 (2009) 1305–1310
- Hagerman Paul, Fragil X – associated tremor / ataxia syndrome (FXTAS): pathology and mechanisms. Acta Neuropathol (2013) 126:1–19)
- Hagerman PJ. 2008. The fragile X prevalence paradox. J Med Genet 45:498–499
- Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A. Fragile X checklist. Am J Med Genet 1991; 38:283–7
- Hagerman RJ, Hagerman P. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and frágil X-associated tremor/ataxia síndrome. Lancet Neurol 2013 12:76-98
- Hall DA, O’Keefe JA. Fragile X-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. Other Hyperkinet Mov 2012;2: <http://tremorjournal.org/article/view/56>
- Hampson DR, Adusei DC, Pacey LK. 2011. The neurochemical basis for the treatment of autism spectrum disorders and Fragile X syndrome. Biochem Pharmacol 81:1078–1086.

- Hersh Joseph H., Saul Robert A. and Committee on Genetics. Health Supervision for Children With Fragile X Syndrome. *Pediatrics* 2011 127; 994-1006.
- Hunter J., Rivero – Arias O., Angelov A., Kim E., Fotheringham I., Leal J., 2014. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet Part A* 9999:1–11.
- INEGI, Censo de Población y Vivienda 2010.
- INEGI. Las personas con discapacidad en México, una visión al 2010. 2013. [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010/discapacidad/702825051785.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010/discapacidad/702825051785.pdf) [Consulta: lunes 12 de enero de 2015]
- Iqbal MA., Sakati N., Nester M., Ozand P., Cytogenetic diagnosis of fragil X syndrome: study of 305 suspected cases in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med.* 2000;20:214-217
- Irwing S., Galvez R., Greenough W., Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragil – X Mental Retardation Syndrome. *Cerebral Cortex* Oct 2000; 10; 1038-1044.
- Lachiewicz AM., Dawson DV., Spiridigliozzi GA., Physical Characteristics of Young Boys With Fragile X Syndrome: Reasons for Difficulties in Making a Diagnosis in Young Males. *Am. J. Med. Genet.* 92:229-236, 2000.
- Leehey M., Fragil X-Associated Tremor / Ataxia Syndrome: Clinical Phenotype, Diagnosis, and Treatment. *J Investig Med* 2009; 57: 830-836
- Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet.* 1969; 21(3):231–244
- Magaña JJ1, Leyva-García N, Cisneros B., Pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. *Gac Med Mex.* 2009 Jul-Aug; 145(4):331-7.
- Mandel JL, Biancalana V (2004) Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res* 14(Suppl A):S158–S165
- Martin Purdon J., Bell J., A pedigree of mental defect showing sex-linkage, *Neurol Psychiatry.* 1943 Jul; 6(3-4):154-7.
- Maulik P. K., Mascarenhas M. N., Mathers C. D., Dua T., Saxena S., Prevalence of intelectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities* 32 (2011) 419–436

- Maurin T., Zongaro S., Bardoni B., Fragile X Syndrome: From molecular pathology to therapy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Jan 22.
- McConkie – Rossel A, Finucane B, Cronister A, Abrams L, Bennett R, Pettersen B. Genetic counseling for Fragil X Syndrome: Updated recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counselin*, 2005, 4: 249-270.
- McLennan Y., Polussa J., Tassone F., Hagerman R., Fragil X Syndrome, *Current Genomics*, 2011, 12, 216-224.
- Mila Recasens M., Sánchez Díaz A., Glover López G., Castellví Bel., Carbonell Meseguer P, Kruyer H., Ballesta Martínez F., Estivill Palleja X., Estudio genético y molecular de 85 familias afectas del síndrome del cromosoma X frágil. *An Esp Pediatr* 1996; 44: 250-256.
- Monaghan K, Lyon E, Spector E. ACMG Standars and Guideliness for fragil X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guideliness for Clinical Genetics Laboratories of the American Collage of Medical Genetics and Genomics. *Gen Med* 2013: 15(7):575-586
- Nowicki S., Tassone F., Ono M., Ferranti M, Francoise M., Goodlin-Jones B., Hagerman R., The Prader Willi Phenotype of Fragil X Syndrome, *J Dev Behav Pediatr* 28: 133-138, 2007.
- Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*<sup>®</sup>[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; FMR1-Related Disorders. Saul RA, Tarleton JC 1993-2014. 1998 Jun 16 [updated 2012 Apr 26].
- Pandey U. B., Phadake S. R., Mittal B., Molecular diagnosis and genetic counseling for fragil X mental retardation. *Neurology India* March 2004 Vol 52 Issue 1
- Patsalis PC., Sismani C, Hettinger JA, Boumba I, Georgiou I, Stylianidou G, Anastasiadou V, Koukoulli R, Pagoulatos G, Syrrou M., Molecular screening of fragile X (FRAXA) and FRAXE mental retardation syndromes in the Hellenic population of Greece and Cyprus: incidence, genetic variation, and stability. *Am J Med Genet.* 1999 May 28;84(3):184-90.
- Pearson CE., Edanyra KN., Cleary JD., Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet.* 2005 Oct;6(10):729-42.

- Pereira RR, Pinto IP, Minasi LB, de Melo AV, da Cruz e Cunha DM, et al. (2014) Screening for Intellectual Disability Using High-Resolution CMA Technology in a Retrospective Cohort from Central Brazil. PLoS ONE 9(7)
- Pirozzi F, Tabolacci E, Neri G. The FRAxopathies: Definition, overview, and update. Am J Med Genet Part A 2011, 155:1803-1816
- Pretto D., Yrigollen CM., Tang H-T., Williamson J., Espinal G., Iwahashi CK., Durbin-Johnson B., Hagerman RJ., Hagerman PJ., Tassone F., Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. Front Genet 2014 5:318.
- Pugin A., Faundes V., Santa María L., Curotto B., Aliaga S., Salas I., Soto P., Bravo P., Peña M.I., Alliende M.A., Aspectos clínicos, moleculares y farmacológicos en los trastornos asociados a gen 1 del retraso mental del X frágil. Neurología. 2014 Dec 16.
- Ramos – Fuentes F. J., Nuevos métodos de diagnóstico del síndrome X Frágil: estudio de la FMRP en sangre y pelo. REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S9 –S13.
- Ramos F. J., Willemsen R., Diagnosis of the Fragile X Syndrome by the analysis of FMRP expression in blood and hair roots. Archives de pédiatric 10 (2003) 401 – 402
- Romero Espinoza P., Rosales-Reynoso M, Willemsen R., Barros-Núñez P., FMR1 Protein expresión in blood smears for Fragile X Syndrome Diagnosis in a Mexican Population Sample. Genetic Testin and Molecular Biomarkers, Volume 14, Number 4, 2010.
- Ropers H., Hamel B., X-Linked Mental Retardation. Nature Reviews Genetics Vol. 6, January 2005
- Rosales – Reynoso M., Mendoza Carrera F., Troyo Sanromán R., Medina C., Barros Núñez P., Genetic diversity at the FMR1 locus in Mexican population. Arch. Med. Res. 2005; 36; 412-417.
- Saldarriga W., Tassone F., González-Teshima L., Forero-Forero J., Ayala-Zapata S., Hagerman R., Fragil X Syndrome. Colomb Med. 2014; 45(4): 190-8
- Schneider A., Ligsay A., Hagerman R., Fragil X Syndrome: An Aging Perspective. Developmental Disabilities Research Reviews 28:68-74(2013).
- Sethna F., Moon C., Wang H., From FMRP Funtion to Potential Therapies for Fragile X Syndrome. Neurochem Res. 2014 Jun; 39(6):1016-31

- Sherman, S. L., Jacobs, P. A., Morton, N. E., Froster-Iskenius, U., Howard-Peebles, P. N., Nielsen, K. B., Partington, N. W., Sutherland, G. R., Turner, G., and Watson, M. (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 69, 3289-3299.
- Sherman, S. L., Morton, N. E., Jacobs, P. A., and Turner, G. (1984). The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann. Hum. Genet.* 48, 2137.
- Srivastava A. K., Schwartz C. E., Intellectual disability and autism spectrum disorders: Causal genes and molecular mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (2014), April 4.
- Sutherland GR., Fragile Sites On Human Chromosomes: Demonstration Of Their Dependence On The Type Of Tissue Culture Medium. *Science* 15 July 1977: Vol. 197 no. 4300 pp. 265-266
- Taboada Lugo Noel, Lardoeyt Ferrer Roberto, Criterios para el diagnóstico clínico de algunos síndromes genéticos. *Rev Cubana Pediatr* [online]. 2003, vol.75, n.1 [citado 2014-12-08]. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-5312003000100007&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-5312003000100007&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1561-3119.
- Terracciano A., Chiurazzi P., Neri G., Fragil X Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)* 137C:32-37 (2005).
- Turner G, Eastman C., Casey J., McLeay A., Procopis P., Turner B., X-liked mental retardation associated with macro-orchidism, *Journal of Medical Genetics* (1975), 12, 367.
- Vindas – Smith R., Cuenca – Berger P., Brenes – Pino F., Castro – Volio I., Tamizaje mediante Inmunohistoquímica del síndrome del cromosoma X frágil en una población de niños y adolescentes costarricenses. *Acta méd costarric.* Vol 53 (2), abril – junio 2011.
- Wakeling E., Nahhas, F. Feldman G., Extra Alles in FMR1 Triple – Primed PCR. *Artifac, Aneuploidy, or Somatic Mosaicism? J Mol Diagn* 2014, 16: 689-696
- Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet* 2011 80:214-225.
- Winarni TI., Utari A., Mundhofir FEP., Hagerman RJ., Faradz SMH., Fragil X syndrome: clinical, cytogenetic and molecular screening among autism spectrum disorder children in Indonesia. *Clin Genet* 2013: 84: 577-580

- Wittenberger M., Hagerman R., Sherman S., McConkie-Rossel A., Welt C., Rebar R., Corrigan E., Simpson J., Nelson L., The FMR1 premutation and reproduction, *Fertil Steril* 2007; 87:456 – 65
- Yrigollen CM, Tassone F, Durbin-Johnson B, Tassone F (2011) The Role of AGG Interruptions in the Transcription of FMR1 Premutation Alleles. *PLoS ONE* 6(7)
- Yrigollen CM., Durbin-Johnson B., Gane L., Nelson D.L. Hagerman R., Hagerman PJ., Tassone F., AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med* 2012;14(8):729–736
- Yrigollen CM., Martorell L., Durbin-Johnson B., Naudo M., Genoves J., Murgia A., Polli R., Zhou L., Barbouth D., Rupchock A., Finucane B., Latham GJ., Hadd A., Berry-Kravis E., Tassone F., AGG interruptions and maternal age effect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission., *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2014, 6:24
- Zabalza Estévez R., Síndrome de temblor y ataxia asociados a premutación X-frágil (FXTAS). *Neurología* 2007; 22(4):251-252