



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**Determinación del expandido CGG de FMR1; correlación clínica y  
radiológica en pacientes mexicanos con temblor/ataxia.**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA**

**M. en C. David José Dávila Ortiz de Montellano**

**TUTOR: Dr. Julio E. Sotelo Morales.**

**Programa De Maestría Y Doctorado En Ciencias Médicas,  
Odontológicas Y De La Salud.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**Dra. Alessandra Carnevale Cantoni.**

**Dra. Beatriz Camarena Medellín.**

**Dra. Ana Fresán Orellana.**

**Programa De Maestría Y Doctorado En Ciencias Médicas, Odontológicas Y De La Salud.**

**Ciudad de México, Octubre 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatoria

## **Agradecimientos.**

Se agradece el apoyo prestado por el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” así como a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado a través del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, así como el apoyo económico otorgado por CONACyT (FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE-SALUD 2015-2 Expediente 261271) para la realización del presente estudio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Gen de Retraso Mental Ligado al Cromosoma X: FMR1	10
Proteína de Retraso Mental Ligado al Cromosoma X: FMRP	15
Fisiopatología asociada a FMR1	18
Síndrome de X Frágil.	23
Falla Ovárica Prematura (POF1).	25
Temblor / Ataxia asociada a X Frágil.	26
Temblor y Ataxia.	31
Justificación.	34
Pregunta de investigación.	34
Hipótesis.	34
Objetivos.	35
Objetivo Principal.	35
Objetivos secundarios.	35
Metodología	36
Diseño.	36
Población y Muestra.	38
Criterios de Inclusión.	39
Criterios de exclusión.	39
Criterios de eliminación.	39
Definición de Variables.	40
Métodos Moleculares.	46
Extracción de DNA.	46
Cuantificación de DNA.	46
Genotipificación y discriminación alélica.	47
PCR con primer de tripletes (TP-PCR).	47
Metodología de la TP-PCR.	49
Reacción de PCR sensible a metilación (mPCR).	53
Determinación del Porcentaje de metilación de FMR1 por mPCR.	56
Análisis estadístico	60
Resultados	61
Características socio-demográficas de la muestra.	61
Características Moleculares de la muestra.	63
Comparación de las características clínicas entre los grupos.	68
a) Antecedentes familiares.	68
b) Antecedentes personales no patológicos.	69
c) Cuadro clínico.	72
Descripción de la muestra bajo los Criterios Diagnósticos de FXTAS.	80
Criterios Diagnósticos de FXTAS en pacientes con expansión en FMR1.	82
Evaluación de los Criterios Diagnósticos de FXTAS.	84
Discusión	87
Conclusiones	91
Bibliografía	92

ANEXOS	97
ANEXO I: APROBACIÓN POR COMITÉS INSTITUCIONALES	98
ANEXO II: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	101
ANEXO III: FORMATO DE CAPTURA DE DATOS CLÍNICOS	106
ANEXO IV: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	109
A: Tutoría en tesis de licenciatura.	110
B. Artículos científicos.	115
C. Participación en foros de divulgación	163

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características fenotípicas del Sx de retraso mental ligado al cromosoma X.	24
<b>Cuadro 2.</b> Criterios Diagnósticos de FXTAS.	28
<b>Cuadro 3.</b> Volúmenes específicos para reacción de TP-PCR.	49
<b>Cuadro 4.</b> Volúmenes específicos para realizar la EC.	50
<b>Cuadro 5.</b> Volúmenes específicos para el DNA Control Mix.	56
<b>Cuadro 6.</b> Volúmenes específicos para el Control FAM y Digestión HEX.	57
<b>Cuadro 7.</b> Volúmenes específicos para la mPCR.	58
<b>Cuadro 8.</b> Volúmenes específicos para la Electroforesis Capilar.	59
<b>Cuadro 9.</b> Características de longitud de alelos de FMR1 y metilación por sexo.	67
<b>Cuadro 10.</b> Frecuencia de toxicomanías entre grupos.	70
<b>Cuadro 11.</b> Comparación de las características ginecobstétricas entre grupos.	71
<b>Cuadro 12.</b> Frecuencia de alteraciones oftalmológicas entre grupos.	72
<b>Cuadro 13.</b> Frecuencia de alteraciones cerebelosas entre grupos.	73
<b>Cuadro 14.</b> Frecuencia de signos de parkinsonismo entre grupos.	74
<b>Cuadro 15.</b> Frecuencia de datos piramidales o de neurona motora superior entre grupos.	75
<b>Cuadro 16.</b> Frecuencia de datos de neurona motora inferior entre grupos.	76
<b>Cuadro 17.</b> Frecuencia de tipos de temblor entre grupos.	76
<b>Cuadro 18.</b> Frecuencia de alteraciones psiquiátricas entre grupos.	77
<b>Cuadro 19.</b> Frecuencia de alteraciones electrofisiológicas entre grupos.	78
<b>Cuadro 20.</b> Frecuencia de hallazgos por IRM entre grupos.	79
<b>Cuadro 21.</b> Hallazgos respecto a los Criterios Diagnósticos de FXTAS.	81
<b>Cuadro 22.</b> Hallazgos en la muestra de pacientes con alteración en <i>FMR1</i> .respecto a los Criterios Diagnósticos de FXTAS.	83
<b>Cuadro 23.</b> Evaluación de los Criterios Diagnósticos de FXTAS como indicación para prueba de tamizaje molecular de <i>FMR1</i> .	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ideograma del Cromosoma Xq27.3 y Gen <i>FMR1</i> , RNAm y Proteína FMRP.	11
<b>Figura 2.</b> Esquematización del gen <i>FMR1</i> .	12
<b>Figura 3.</b> Esquematización de la replicación de un alelo inestable de <i>FMR1</i> .	14
<b>Figura 4.</b> Modelo de función de la FMRP en la neurona.	17
<b>Figura 5.</b> Expresión de FMRP de acuerdo a la longitud del repetido CGG de <i>FMR1</i> .	20
<b>Figura 6.</b> Esquematización del tracto repetido CGG en <i>FMR1</i>	21
<b>Figura 7.</b> Facies característica observada en el síndrome de X Frágil.	24
<b>Figura 8.</b> Diagrama de flujo de metodología general.	37
<b>Figura 9.</b> Representación de los primers para la PCR-gen específico de <i>FMR1</i> . Modificado de Seneca, et al, (2012).	48
<b>Figura 10.</b> Representación de la TP-PCR Modificado de Seneca, et al, (2012).	48
<b>Figura 11.</b> Ciclos para la TP-PCR.	50
<b>Figura 12.</b> Asignación de valores y zonas para los electroferogramas.	51
<b>Figura 13.</b> Ejemplos de electroferogramas obtenidos después de la EC.	51
<b>Figura 14.</b> Obtención de número de repetidos a través del Macro de Excel, Azuragen® (2017).	52
<b>Figura 15.</b> Diagrama de restricción de HpaII. Modificado de KEGG .	53
<b>Figura 16.</b> Representación de la región del amplicón y resultados de digestión Modificado de Grasso, et al, (2014).	54
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de los dos fluorocromos para un control de múltiples alelos.	54
<b>Figura 18.</b> Diagrama general para la mPCR. Modificado de Chen, et al, (2010).	56
<b>Figura 19.</b> Ciclos para la digestión enzimática en mPCR.	57
<b>Figura 20.</b> Ciclos para mPCR.	58
<b>Figura 21.</b> Interfase de AmplideX© mPCR <i>FMR1</i> (Asuragen®).	59
<b>Figura 22.</b> Gráficos de sensibilidad y especificidad de los Criterios diagnósticos de FXTAS	86
<b>Figura 23.</b> Curva ROC de Criterios Diagnósticos de FXTAS aplicados como criterio para tamizaje molecular y hallazgos por estudio molecular de <i>FMR1</i> .	86

## Resumen

INTRODUCCION: El gen *FMR1* se localiza en el sitio FRAXA en el brazo largo del cromosoma X, en el *locus* Xq27.3. La región 5'UTR de *FMR1* presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población, que pueden encontrarse interrumpidos por tripletes AGG. Los alelos de *FMR1* son normales cuando presentan hasta 40 repetidos, de 41 a 54 alelos intermedios, premutación entre 55-199 repetidos y mutación cuando se encuentran 200 o más. La relación entre la mutación y el Síndrome de X Frágil está bien establecida, el estado de PM puede asociarse a otras enfermedades (Insuficiencia Ovárica Prematura tipo 1 y el Síndrome de temblor/ataxia asociado a X Frágil; FXTAS). Los hallazgos clínicos y de neuroimagen han permitido crear criterios diagnósticos para FXTAS, aunque Las manifestaciones de FXTAS comprende un amplio espectro.

OBJETIVO: (1) Describir las manifestaciones clínicas y radiológicas en pacientes mexicanos con temblor/ataxia con expandido CGG de *FMR1* en zona gris y de permutación. (2) Comparar los hallazgos clínicos y radiológicos en los pacientes mexicanos diagnosticados con FXTAS con los Criterios Diagnósticos de FXTAS.

METODOLOGÍA: En una población de 106 pacientes con Temblor/Ataxia se realizó estudio molecular de *FMR1* y se compararon sus características clínicas y de imagen con los Criterios Diagnósticos de FXTAS.

CONCLUSIONES: En la muestra analizada se demuestra la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de FXTAS y la similitud que presenta con otros cuadros de temblor/ataxia, apoyando el postulado que señala que posiblemente se trate de un amplio espectro de manifestaciones y no de una patología única bien definida.

Palabras clave:

*FMR1*; *FMPR*; Síndrome de X Frágil; Síndrome de temblor / ataxia asociado a X Frágil; Falla ovárica prematura tipo 1; Temblor / Ataxia; Mutación por expansión de trinucleótidos

## Abstract

INTRODUCTION: The *FMR1* gene is located in the FRAXA site in the long section of the X chromosome, in the Xq27.3 locus. The 5'UTR region of FMR1 has a CGG repeated triplet zone whose number is variable in the population, which may be interrupted by AGG triplets. The FMR1 alleles are normal when they appear up to 40 repeated, from 41 to 54 are intermediate alleles, premutation is between 55-199 repeated and full mutation when 200 or more are found. The relationship between the mutation and the Fragile X Syndrome is well established, the state of PM can be associated with other diseases (Premature Ovarian Insufficiency type 1 and Fragile X-associated tremor / ataxia syndrome, FXTAS). The clinical and neuroimaging findings have allowed the creation of diagnostic criteria for FXTAS, although the manifestations of FXTAS comprise a broad spectrum.

OBJECTIVE: (1) Describing the clinical and radiological manifestations in Mexican patients with tremor / ataxia with CGG expansion of FMR1 in gray zone and permutation. (2) To compare the clinical and radiological findings in Mexican patients diagnosed with FXTAS with the Diagnostic Criteria.

METHODOLOGY: In a population of 106 patients with Tremor / Ataxia, a molecular study of FMR1 was performed and compared with its clinical and imaging characteristics with the Diagnostic Criteria.

CONCLUSIONS: The sample analyzed shows the heterogeneity of the clinical manifestations of FXTAS and the similarity it presents with other tremor / ataxia charts, supporting the postulate that indicates that it may be a broad spectrum of manifestations and not a single, well-defined pathology.

Keywords:

*FMR1*; FMPR; Fragile X syndrome; Tremor / ataxia syndrome associated with Fragile X; Premature ovarian failure type 1; Tremor / Ataxia; Mutation by trinucleotide expansion

## Introducción

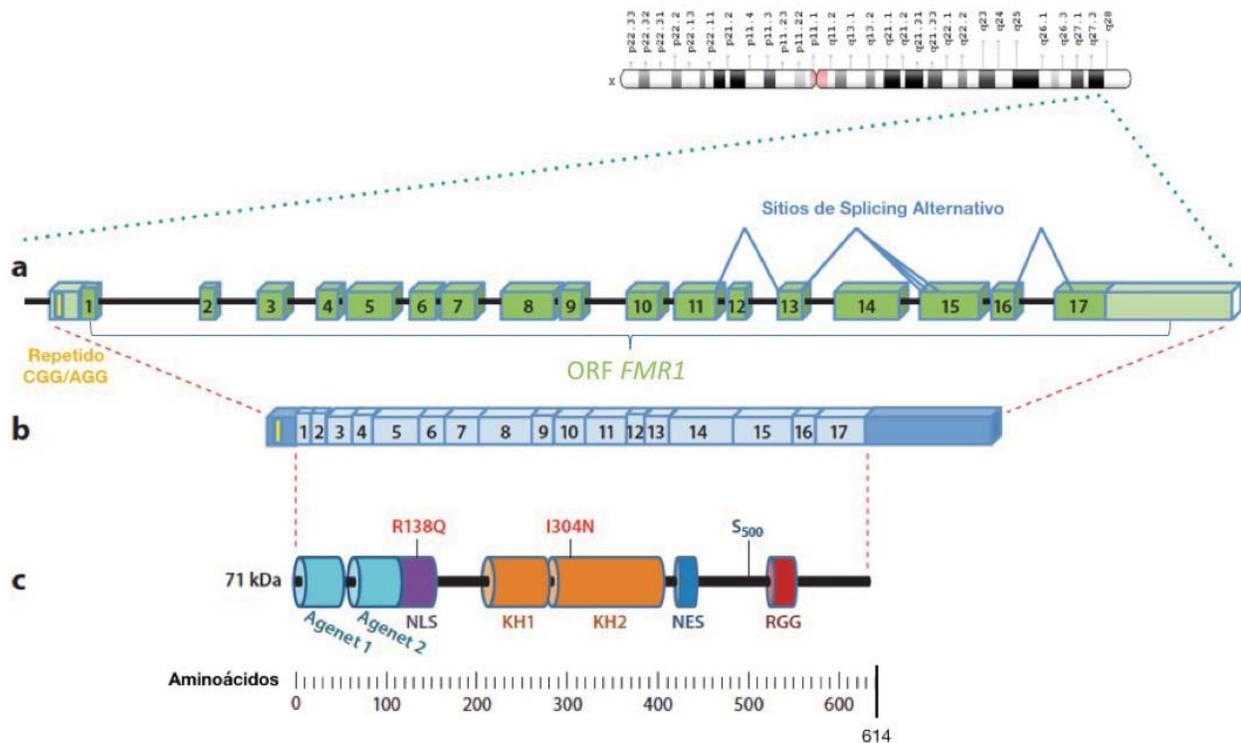
### Gen de Retraso Mental Ligado al Cromosoma X: *FMR1*

El gen *FMR1* se localiza en el sitio FRAXA en el brazo largo del cromosoma X, en el *locus* Xq27.3, está compuesto por 17 exones y abarca aproximadamente 18 kilobases (kb). Su producto transcripcional es un RNAm de 3.9 kb que puede sufrir de splicing alternativo y generar diferentes isoformas. Se ha sugerido que el pre-RNAm transcripcional del gen puede generar hasta 20 isoformas diferentes de RNAm maduro [1, 2]. La isoforma más larga de RNAm en seres humanos codifica para una proteína de 71kDa que contiene una variedad de secuencias y dominios funcionales [3], entre ellos se encuentran dos dominios *Agamet-like* en tándem dentro de las regiones N-terminales de la misma, dos dominios de ribonucleoproteína K homologa (KH) y el conjunto de residuos de arginina y glicina que constituyen la caja de RGG [4, 5] (Figura 1).

La región 5'UTR de *FMR1* presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población, que pueden encontrarse interrumpidos por tripletes AGG. En la población normal esta variación oscila entre 6 y 55 repeticiones, siendo la media de 29-30 repeticiones con dos a tres interrupciones AGG [6].

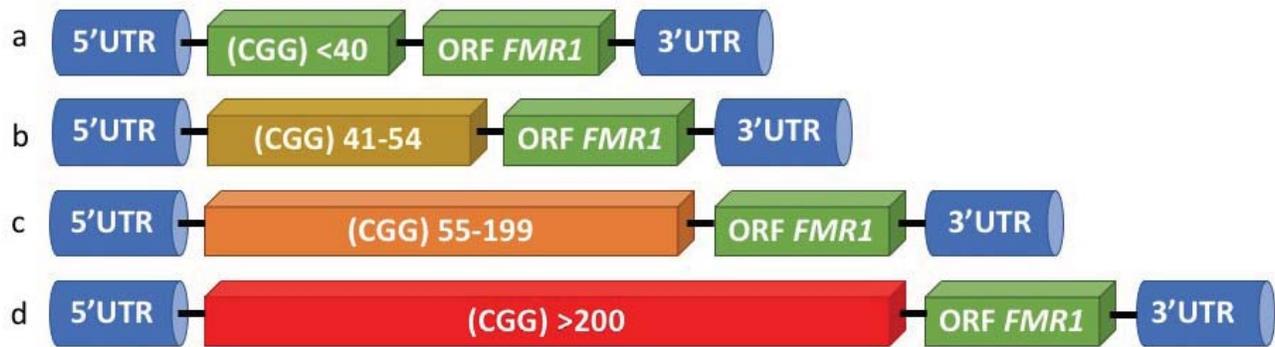
Al respecto, las Guías Prácticas del Colegio Americano de Genética Médica, definen a los alelos de *FMR1* normales cuando presentan hasta 40 repeticiones CGG, de 41 - 54 repetidos considerándolos en zona gris o alelos intermedios (GZ), la premutación se considera entre 55 y 199 repetidos (PM), mientras que la mutación (FM) es considerada cuando se encuentran 200 o más repetidos [7] (Figura 2).

Cuando se sobrepasan los 40 repetidos CGG y se pierde el repetido interrumpido AGG, el expandido se torna inestable durante la replicación del DNA, llevando generalmente a expansiones del mismo, que pueden repercutir en el fenotipo de la persona o de su descendencia [8].



**Figura 1.** Ideograma del Cromosoma Xq27.3 y Gen *FMR1*, RNAm y Proteína FMRP.

(a) Gen *FMR1*. Los exones se muestran en verde y numerados, las regiones no traducidas se muestran sin numeración (ORF de *FMR1*), las líneas azules muestran los sitios de splicing alternativo. (b) RNAm de *FMR1* Los exones se muestran en azul claro y numerado, el repetido CGG se muestra en amarillo en (a) y (b). (c) Proteína FMRP. Abreviaturas: Dominios de repetido tándem 1 y 2 de unión a cromatina (Agent 1 y Agent 2); NLS Señalización de localización nuclear; KH1 y KH2 Dominios de homóloga K 1 y 2; NES Señalización de exportación nuclear; RGG Caja Arginina-Glicina-Glicina de unión a RNA; S500 Residuo de serina de fosforilación primaria; R138Q Mutación puntual encontrada en pacientes con retraso en el desarrollo ligado al X sin metilación en *FMR1*; I304N Mutación que abole la unión a polirribosomas. (Modificado de Michael R. Santoro y colaboradores 2012.)



**Figura 2.** Esquemización del gen *FMR1*. (a) Estructura normal del gen, se muestra la región 5'UTR, la región del repetido CGG en rangos normales (menor a 40 repeticiones), ORF *FMR1* (incluye los 17 exones e intrones del gen) y la región 3'UTR. (b) En amarillo se muestra la región del repetido CGG en rangos intermedios o zona gris (GZ; 41-54 repeticiones). (c) En naranja se muestra la región del repetido CGG en rangos de premutación (PM; 55-191 repeticiones). (d) En rojo se muestra la región del repetido CGG en rangos de mutación completa (FM; >200 repeticiones).

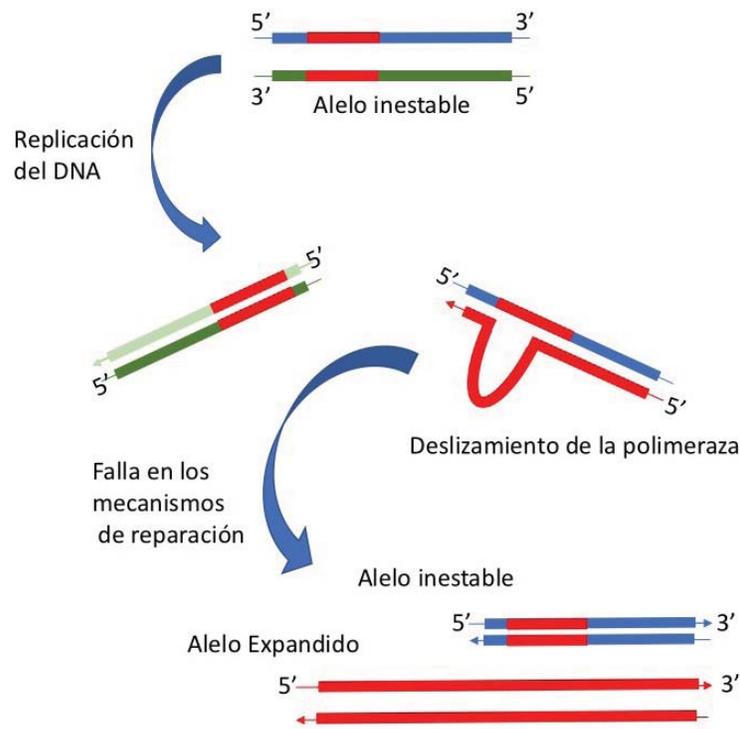
Si bien no se conoce en detalle el mecanismo molecular responsable de la expansión del número de tripletes, se ha sugerido que las expansiones ocurren en su mayoría en los gametos por un proceso que involucra una aberración en el mecanismo de replicación y/o reparación del DNA, debido al deslizamiento de las polimerasas sobre los fragmentos con las repeticiones [9-11]. Tanto la inestabilidad como la transcripción son sensibles a la longitud del fragmento, al número de repetidos y a la metilación de las islas CpG ya que estos factores disminuyen el ensamblaje de los nucleosomas [12] (Figura 3).

Dentro de la región CGG se encuentran interrupciones AGG en los alelos normales, que parecen conferir estabilidad a la secuencia y previenen el deslizamiento de la DNA Pol durante la replicación. Las interrupciones AGG pueden modular la capacidad del fragmento para unirse a la cromatina, ya que favorecen el ensamblaje del nucleosoma cerca de las secuencias *random*, las cuales son genéticamente estables. El efecto de dichas interrupciones depende de la metilación de las islas CpG y del estado de acetilación de histonas [12].

Las secuencias AGG intercaladas y la longitud del triplete CGG, se cree que son factores determinantes para la estabilidad alélica. Diversas observaciones indican que la

perdida de las interrupciones AGG en el extremo 3' desestabilizan la región provocando la expansión del triplete. Así mismo la presencia de estas interrupciones evitan la formación de loops en la horquilla de replicación, provocados por las secuencias largas de los repetidos, lo cual facilita la progresión de la replicación a través de las regiones repetidas brindándole estabilidad [13].

Los alelos normales son muy estables al transmitirse de padres a hijos. Un alelo en GZ (entre 41 y 54 repeticiones) no suele expandirse a mutación completa en una generación, pero potencialmente puede hacerlo en dos o más [14]. Los alelos PM, por su parte, son muy inestables y pueden expandirse a FM en una sola generación. La expansión de un alelo PM al estado de FM ocurre casi exclusivamente cuando es transmitido por rama materna y rara vez por rama paterna. A su vez, se ha documentado en varios estudios que el riesgo de expansión a mutación completa a partir de la PM durante la transmisión materna, es mayor al aumentar el largo de los tripletes [15]. Por otro lado, la región de tripletes CGG puede presentar interrupciones AGG que se asociarían con la estabilidad del alelo y disminución del riesgo de expansión a FM, algunos autores han demostrado que aquellos alelos sin interrupciones AGGs presentan una mayor probabilidad a la inestabilidad y expansión al estado de FM [15].



**Figura 3.** Esquemática de la replicación de un alelo inestable de *FMR1*; Se observa la formación de un alelo inestable, similar al original y por el deslizamiento de la DNA polimerasa la formación de una loop de DNA que, al fallar los mecanismos de reparación, forma un alelo con mayor longitud que el original.

## Proteína de Retraso Mental Ligado al Cromosoma X: FMRP

Como se ha mencionado antes, la proteína codificada por *FMR1*, denominada “Fragile Mental Retardation Protein”, FMRP, tiene un peso molecular de 69 kDa. La existencia de procesos de corte y empalme o *splicing* alternativos entre los exones 11 a 17, da lugar a varias isoformas (Imagen 1) [5, 16]. Su expresión es amplia, pero no necesariamente ubicua, en todos los tejidos fetales y adultos, con la expresión más abundante en el tejido cerebral y testicular [17]. Se localiza primariamente en el citoplasma de células, como las neuronas, pero también ha sido localizada en el núcleo por microscopía óptica y electrónica. En las neuronas tanto FMRP, como su RNAm, se localizan en los axones y en las espinas dendríticas donde se asocia con polirribosomas y se regula de manera positiva en respuesta a la estimulación por receptores de glutamato metabotrópico (mGluRs) [18].

*FMR1* parece estar relacionado evolutivamente con 2 genes autosómicos parálogos con los cuales comparte un alto grado de homología en su secuencia: son los genes denominados *FXR1* y *FRX2*, que codifican las proteínas FXR1P y FXR2P respectivamente [19].

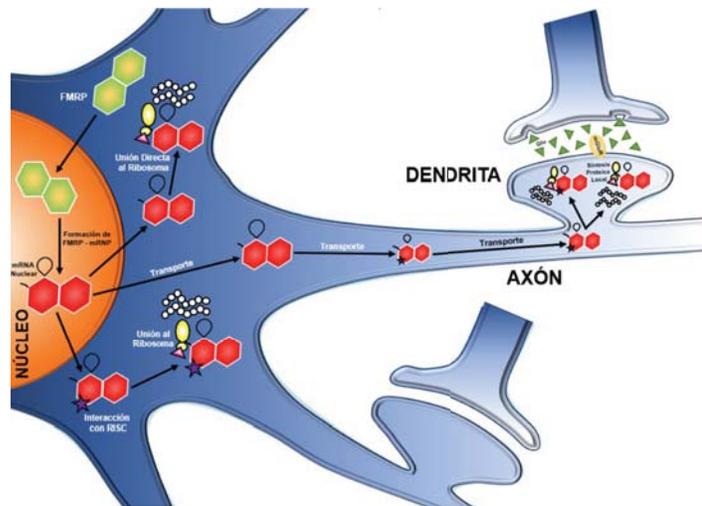
La mayoría de las proteínas funcionan como un complejo macromolecular junto con otras proteínas, cofactores o ácidos nucleicos. La FMRP interactúa con las proteínas homologas FXR1P y FRX2P en el núcleo y el citoplasma [20]. Otras proteínas que interactúan con la FMRP han sido denominadas en función de su localización celular: NUF1P1, 82-FIP, CYFIP1 y 2, etc. [21].

Además de los dominios descritos, que implican la unión entre la FMRP y diversos RNAm, *FMR1* presenta una señal de exportación citoplasmática (NES), lo cual sugiere un transporte desde el núcleo celular al citoplasma. Además, en 1996 se identificó una secuencia de transporte de localización nuclear (NLS), de transporte contrario, por lo que FMRP parece fluir hacia ambos lados del núcleo celular y modificar la traducción de un cierto número de transcritos a los cuales se une [22].

En el modelo funcional propuesto por Eberhart, et al, 1996 [22] (Figura 4), que ha servido como modelo para un mayor entendimiento de su función [17], la FMRP es transportada primero dentro del núcleo, mediante la señal de localización nuclear NLS. Una vez en el núcleo, es dimerizada y se asocia con otras proteínas y varios RNAm para formar el complejo FMRP- mRNP. Este complejo es entonces transportado al citoplasma, vía la señal de exportación NES, donde se asocia con ribosomas, influyendo en la traducción de los RNAm que son ligandos de la FMRP. No está claro si todos los mRNPs son idénticos, exceptuando para los RNAm unidos, o si hay diferencias entre las proteínas asociadas. Si existieran diferentes complejos proteicos, cada uno podría responder de manera distinta a la ausencia de la FMRP [21].

Se ha relacionado la FMRP con el receptor de Glutamato (mGluR), que intentan relacionar la proteína con ciertos parámetros clínicos en el SXF. Según esta hipótesis, la ausencia de FMRP supondría una sobre-amplificación de la respuesta del mGluR y un aumento de la plasticidad sináptica neuronal conocida como LTD (“Long Term depression”), lo que a su vez está implicado en las anomalías morfológicas que tienen lugar en los pacientes con SXF, tales como la existencia de espinas dendríticas anormalmente largas e inmaduras [23]. En resumen, la función de FMRP sería la regulación de un gran número de genes necesarios para la correcta plasticidad sináptica, por lo que su ausencia causaría la pérdida de esa regulación.

Finalmente, sobre el modelo de regulación por parte de la FMRP se ha descrito también un posible papel de la ruta del RNA de interferencia (RNAi), de manera que la FMRP podría regular la traducción de sus RNAm asociados mediante la interacción con los RNAm. Esta función se sustenta en el descubrimiento de pequeños RNAs que se corresponden con los elementos repetidos CGG y que podrían derivar de un gran RNA de doble cadena generado por la transcripción bidireccional de las secuencias repetitivas desde promotores adyacentes [17].



**Figura 4.** Modelo de función de la FMRP en la neurona. FMRP entra en el núcleo de la neurona mediante la señal NLS, donde forma un complejo con RNAm al interactuar con transcritos específicos y proteínas. Este complejo se transporta fuera del núcleo por la señal NES y una vez en el citoplasma puede asociarse directamente a ribosomas o interactuar previamente con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), de ambas maneras regulan la síntesis de proteínas en el cuerpo celular de la neurona. Asimismo, los complejos pueden ser transportados dentro de las dendritas para regular la síntesis de proteínas locales en respuesta a señales de estimulación sináptica, tales como la activación del receptor del glutamato (mGluR). (Modificado de Jin, et al, 2004).

## **Fisiopatología asociada a *FMR1***

Si bien la relación entre el estado de mutación completa y el SFX se conoce desde inicios de la década de los 90's [24], en los últimos años se ha reportado que el estado de PM en *FMR1* está asociado a otros dos desórdenes clínicos: la Insuficiencia Ovárica Primaria asociada a la Fragilidad del X (FXPOI) y el Síndrome de temblor/ataxia asociado a X Frágil (FXTAS) [25, 26].

Durante los años 90 se creyó que la FM ocasionaba una reducción o ausencia de FMRP, como consecuencia directa del silenciamiento causado por la metilación de *FMR1*. Sin embargo se ha reportado que más de la mitad de los hombres con alelos con la FM e hipermetilación producen bajas cantidades de RNAm de *FMR1* y que algunos pacientes con FM incluso presentan niveles cercanos a la normalidad [27].

Se desconoce todavía el por qué algunos hombres con la FM e hipermetilación producen RNAm mientras que otros no. Se ha especulado con la idea de que la hipermetilación de una subregión de elementos CpG sea clave en el silenciamiento del gen al existir 5 lugares de interacción DNA-proteína donde se unen diferentes factores transcripcionales [28, 29].

En el caso de las mujeres con la FM, éstas presentan RNAm y FMRP, lo que es evidente dada la existencia de dos cromosomas X. Sin embargo, los niveles medios de RNAm en ellas presentan una gran variación, mucho mayor que en los hombres [30]. No obstante, considerando la inactivación del cromosoma X, los niveles de RNAm del cromosoma X normal activo se acercan a los parámetros normales esperados. De ahí, que los hallazgos descritos en cuanto a la expresión de *FMR1* en mujeres, se correlacionan con dos observaciones básicas: el porcentaje de inactivación del cromosoma X normal y una mayor variación en la afectación clínica, con una menor severidad.

En algunos pacientes con FXTAS que se han podido estudiar post mortem, se observó un aumento de la expresión del RNAm en cerebro [27], estos niveles aumentados de RNAm con tripletes expandidos en portadores de la PM, junto a la aparición de inclusiones

intranucleares en neuronas y astrocitos de pacientes con FXTAS, llevó a postular un mecanismo de toxicidad de RNA como posible causa subyacente al desarrollo del síndrome [31].

Empíricamente, se podría deducir que la actividad transcripcional de *FMR1* se encuentra disminuida en portadores de PM, sin embargo, se ha comprobado que los niveles de RNAm se encuentran elevados en individuos con PM [32].

También se ha descrito un aumento del RNAm en mujeres portadoras de la PM, pero menos notable que en los hombres y con una mayor variación [29]. Los elevados niveles de RNAm evidenciaron la existencia de una desregulación en la expresión de *FMR1* en el rango de la PM. Por lo tanto, aunque no de manera directa, parece existir una relación entre esta anomalía en los niveles de expresión y la afectación clínica que presentan los individuos [33].

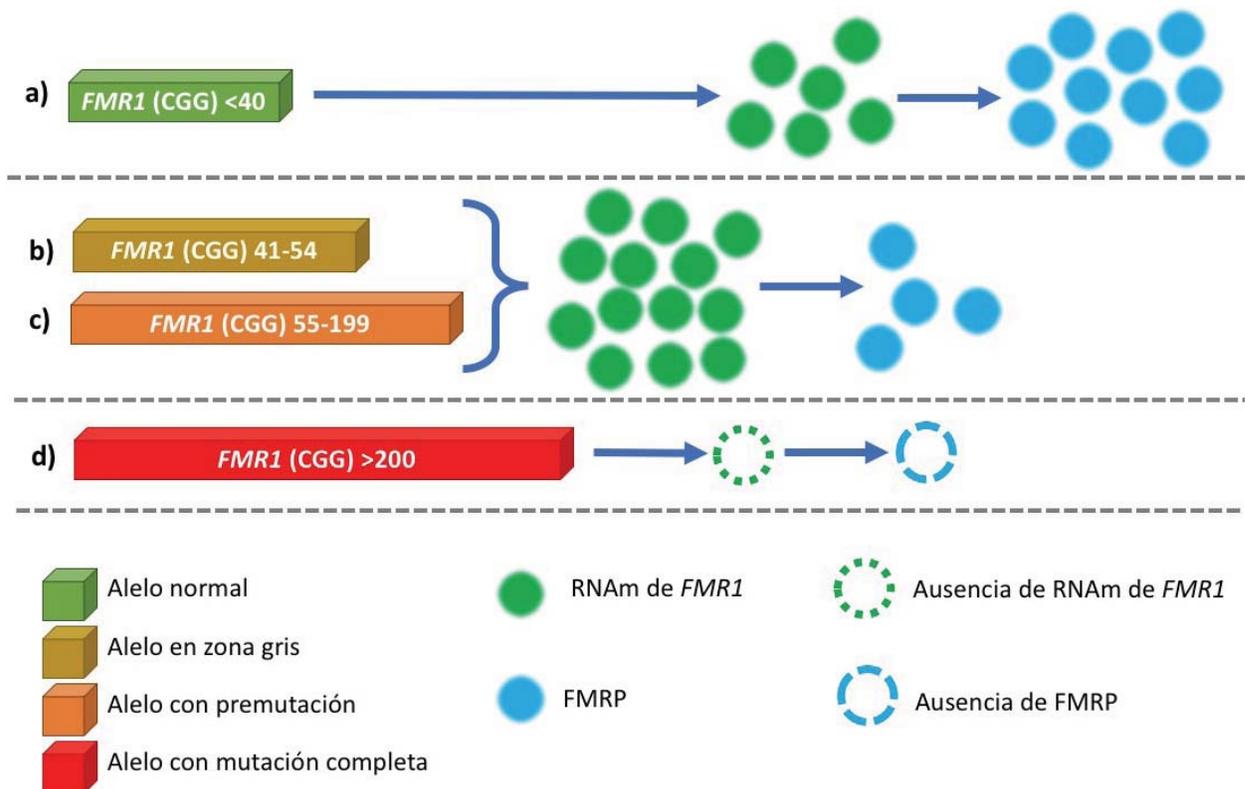
A pesar de los elevados niveles de RNAm, se ha demostrado que existe una reducción moderada de los niveles de FMRP en las personas con la PM, que parece ser gradual según aumenta el número de CGG [34]. Una posible explicación a estos bajos niveles de la proteína se debe a una deficiencia a nivel traduccional en individuos con la FM [35].

Volviendo al por qué de la presencia de esos elevados niveles de RNAm [32], se ha propuesto que podrían ser debidos a un defecto en la traducción, como mecanismo de respuesta al mismo. Es decir, la célula intentaría compensar los reducidos niveles de proteína estimulando la producción de RNAm, por lo que, además, las manifestaciones clínicas en la PM serían menores puesto que los elevados niveles de mensajero podrían parcialmente cubrir el déficit de proteína.

Otro efecto a destacar en el rango de la PM es la influencia de la expansión de los tripletes CGG en la posición del inicio de la transcripción tanto en células neuronales como no neuronales [36]. De hecho, el aumento de repeticiones CGG estaría relacionado con un desplazamiento hacia arriba del codón inicio, por lo que el número de tripletes CGG

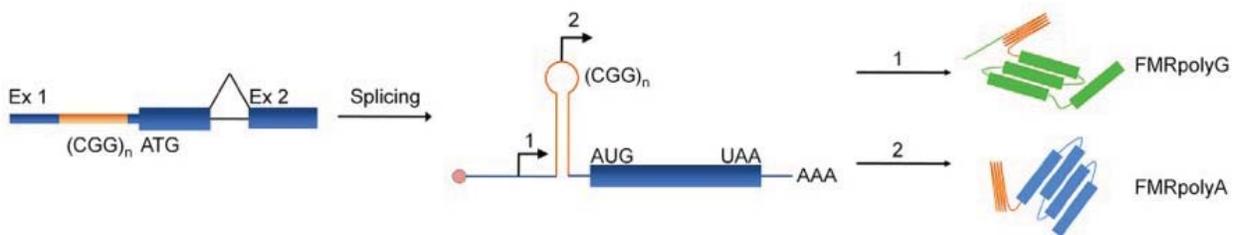
modularía no solo el nivel de actividad de *FMR1* sino también la selección del lugar de inicio de la transcripción. Es decir que el RNAm de los individuos con PM diferiría del rango normal, no únicamente por la extensión del número de tripletes CGG, sino también por una extensión de la secuencia no repetitiva hacia el extremo 5'-UTR.

De esta manera se puede decir que la extensión del repetido CGG guarda una relación directa con los niveles de producción de RNAm de *FMR1* e inversa con la producción de FMRP (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión de FMRP de acuerdo a la longitud del repetido CGG de *FMR1*. a) Alelo normal produce un nivel normal de RNAm y niveles normales de FMRP. b) y c) Los alelos en zona gris y premutación producen niveles elevados de RNAm de *FMR1* que soportan la función tóxica del mismo y llevando a niveles bajos de FMRP. d) Alelo con mutación completa de *FMR1* produce cantidades insuficientes o nulas de RNAm y niveles deficientes o ausentes de FMRP.

Estas observaciones, tanto en el caso de *FMR1* como en *HTT*, *C9orf72* y otros genes con mutaciones patológicas consistente en trectos de trinucleótidos repetitivos, han llevado a la descripción de la transcripción RAN que es explicada por el fenómeno de la traducción iniciada por trectos repetitivos no asociada al codón AUG (RAN, por sus siglas en inglés “Repeat-Associated Non-AUG-initiated translation”) [37], que difumina las líneas que definen qué repeticiones provocan toxicidad a través de la pérdida de una función (silenciamiento genético) y cuales actúan a través de la ganancia de función obtenida por la transcripción anormal de un RNAm tóxico y una proteína con trectos repetitivos (poliglutaminas o polialaninas) no funcional o tóxica, con acumulación de FMRpolyG y FMRpolyA ubiquitinada y secuestro de otras proteínas y RNAm y de interferencia, como parece ocurrir en el caso de los alelos en zona gris o premutación de *FMR1*.(Figura 6).



**Figura 6.** Esquematación del tracto repetido CGG en *FMR1*: Traducción RAN cadena arriba del codón de inicio AUG (ATG) canónico, lo que lleva a la producción de FMRP con trectos de poliglutamina y FMRP con trectos de polialanina tóxicos a nivel celular. (Modificado de Green, et al 2017).

Finalmente, de acuerdo a la longitud del tracto CGG en la región 5'UTR de *FMR* y su estado de metilación, así como los niveles de transcripción y traducción que determinan, pueden distinguirse 3 situaciones; la primera, en el extremo cuando el repetido se encuentra en rangos normales y produce una cantidad de RNAm normal con adecuados niveles de FMRP funcionales, donde no se encuentra un estado patológico; en el extremo cuando se presenta un repetido mayor a 200 repetidos CGG donde *FMR1* se encuentra metilado, y por tanto silenciado, no se produce transcripción y por tanto, la falta de FMRP ocasiona un fenotipo patológico, conocido como Síndrome de Retraso Mental Ligado al Cromosoma X Frágil (FXS MIM #300624) [38] y fenotipos ocasionados por la transcripción aumentada de

RNA<sub>m</sub> de *FMR1* en portadores de alelos en rangos anormales de (41.199 repetidos CAG) vía transcripción RAN y la producción de FMRP deficiente y con tractos de poliglutaminas y polialaninas que ocasionan su agregación y función tóxica, de las cuales se desprenden dos cuadros clínicos reconocidos hasta el momento, el Temblor Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS; MIM #300623) y Falla Ovárica Prematura (POF1 #311360) [38].

Otras observaciones interesantes al respecto de las alteraciones en *FMR1* es que mediante estudios moleculares se ha podido observar que la inestabilidad del expandido también es mitótica y no solo meiótica, ocasionando mosaicismos en los individuos portadores, tanto de la longitud del alelo, como de sus niveles de metilación [39, 40].

## Síndrome de X Frágil.

El síndrome de X frágil es la segunda causa de retraso mental después del síndrome de Down y la principal causa monogénica de trastornos del espectro autista [41]. Fue la primera enfermedad que se demostró que estaba asociada con mutaciones inestables o "dinámicas" causadas por expansiones de trinucleótidos [24], como se ha mencionado antes, con la expansión del trinucleótido CGG en la región 5'UTR de *FMR1* en 200 o más repetidos, lo que ocasiona el silenciamiento del gen ausencia de FMRP y por tanto, pérdida de su función, principalmente la pérdida de regulación de traducción proteica en regiones dendríticas [17].

Típicamente se describe como una entidad de herencia recesiva ligada al cromosoma X, con un cuadro clínico característico que ocurre en hombres y con una muy baja penetrancia en mujeres y un espectro de manifestaciones muy variable [41].

Las características fenotípicas del FXS en hombres se resumen en el cuadro 1 [42, 43] y la figura 7, aunque existe variación de la expresión del FXS durante la vida, no se ha observado diferencias interétnicas.

Antes del año 2000 se afirmaba que los alelos en premutación y zona gris no se asociaban a fenotipos patológicos en las portadoras, sin embargo, si se encontraban en riesgo de presentar expansión durante meiosis y, por tanto, causar XFS en las siguientes generaciones [24]. Actualmente se reconocen otros fenotipos asociados a *FMR1*: POF1 y FXTAS [44]

Cuadro 1. Características fenotípicas del Síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X.

Características prepuberales	Características postpuberales
Crecimiento normal	Pabellones auriculares largos
Macrocefalia (Perímetro cefálico > pc 50)	Quijada prominente
Cara alargada	Macrorquidia
Frente prominente	Comportamiento social anormal (rasgos autistas)
Estrabismo	Hiperextensión articular
Otitis media de repetición	Pie plano
Hipotonía	Prolapso mitral
Reflujo gastroesofágico	Piel delgada



**Figura 7.** Facies característica observada en el síndrome de X Frágil. A paciente caucásico en la infancia y (B) en la etapa adulta; (C) Paciente afroamericano en la infancia y (D) en la etapa adulta (The University of Chicago. <https://pedclerk.bsd.uchicago.edu/page/fragile-x-syndrome>.revisado noviembre 2017).

## Falla Ovárica Prematura (POF1).

Aunque la edad promedio de la menarca disminuyó durante el siglo XX, la edad promedio de la menopausia parece ser invariable con el tiempo y la raza, y ocurre aproximadamente a los 50 años. La falla o insuficiencia ovárica prematura (POF1) se puede definir como una amenorrea secundaria con gonadotropinas elevadas que ocurren antes de los 40 años.

Aunque la POF1 es un cuadro muy heterogéneo, se han identificado mutaciones en los genes *DIAPH2*, *POF1B*, *FOXL2*, *BMP15*, *NOBOX*, *FIGLA*, *NR5A1*, *STAG3*, *HFM1*, *MCM8*, *ERCC6*, *SYCE1* y *MSH5*, sin embargo, por su frecuente patrón de herencia ligado al cromosoma X el primer gen asociado a POF1 fue *FMR1* (POF1 #311360) por Mattison et al, en 1984 [38, 45], otros autores han establecido que aproximadamente entre el 2 y el 3% de las portadoras de alelos en rango de premutación (de 55-199 repetidos CGG) presentan POF1 lo que implica un OR de 5.4 [46, 47]. Aunque típicamente no Temblor Ataxia ligado al Cromosoma X Frágil suelen asociarse a alteraciones neurológicas o neuropsiquiátricas, la importancia de la identificación de las mujeres que padecen POF1 radica en que los fenotipos asociados a la premutación pueden extenderse a las generaciones subsecuentes, aumentando el riesgo de hijos afectados por FXS debido al fenómeno de anticipación [7], aunque no es tema del presente trabajo, no debe dejarse a un lado el antecedente de POF1 en pacientes en quienes se investigan fenotipos asociados a *FMR1*.

## **Temblores / Ataxia asociada a X Frágil.**

En el 2001 el Dr. Randi Hagerman informó sobre fenotipos patológicos motores y cognitivos en familiares masculinos, aparentemente sanos, portadores de premutación en *FMR1* [48] con o sin historia familiar de FXS, lo cual ha llevado a los neurólogos de adultos a considerar la importancia de este gen en la práctica clínica, antes relegado solo a la práctica pediátrica [49]. Estas manifestaciones son conocidas como el síndrome de temblor / ataxia asociado al cromosoma X frágil (FXTAS por sus siglas en inglés OMIM #300623 [38]) y típicamente se manifiesta con temblor cinético y ataxia cerebelosa en varones mayores de 50 años [48]; aunque existen reportes aislados de individuos que muestran alteraciones neuropsiquiátricas y portan una expansión en zona gris, alelos intermedios o una mutación completa no metilada en *FMR1* (como algunas mujeres portadoras de SXF) [7, 50].

La edad de inicio de FXTAS se considera tardía, en la sexta década de la vida, aunque se han documentado adecuadamente casos de inicio temprano, incluso en la tercera o cuarta década de la vida por lo que un inicio temprano no debería distraer sobre la sospecha diagnóstica [51, 52].

La ataxia es casi una constante en las personas con FXTAS. El temblor se presenta hasta en el 86% de los casos, y éste puede ser de intención ó cinético (hasta en el 29% de los casos) de tipo parkinsoniano (en el 12%) y de tipo esencial (en el 35%); de igual forma su severidad varía: el 50% de los casos lo presentan leve y en el 17% [53]. Por otro lado, en el 64% de los casos se hace diagnóstico de parkinsonismo atípico porque se observa que en el 57% de los pacientes presentan bradicinesia leve y en el 71% rigidez en conjunto con otros síntomas cerebelosos [47].

Otras de las manifestaciones clínicas incluyen neuropatía periférica (56-60%), impotencia (80%), disfunción intestinal y vesical (30-55%), disfunción eréctil, debilidad muscular proximal de los miembros pélvicos, pérdida de la audición y disfagia [7]. El deterioro cognitivo progresivo y las alteraciones neuropsicológicas se observan sólo en el 50% de los pacientes [7] y aproximadamente el 42% de ellos cumplen criterios diagnósticos de deterioro cognitivo severo [47].

Al ser un trastorno de herencia ligada al cromosoma X, la penetrancia se estima de 40% en hombres y sólo de 8 al 16.5% en mujeres, probablemente debido al efecto protector de un alelo normal en el cromosoma X homólogo no portador de la mutación [54]; por lo que se habla de una penetrancia incompleta y expresividad variable al incluir fenotipos menos comunes como retraso en el desarrollo, espectro de trastorno autista, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, ansiedad, depresión y diversos problemas neurológicos, psiquiátricos y sistémicos, como migraña, fibromialgia, neuropatía periférica, apnea del sueño, hipertensión, hipotiroidismo, disfonía espasmódica y sintomatología autoinmune, como esclerosis múltiple.

Los hallazgos clínicos y de neuroimagen han permitido crear criterios y categorías diagnósticas para FXTAS propuestos por Jacquemont y cols. en el 2003 [44, 55] posteriormente reformados por Brich y cols en 2017 (Cuadro 2) [50], sin embargo, estos parecen insuficientes mientras se describe un espectro más amplio de fenotipos asociados a la expansión en *FMR1* y se comprende mejor la fisiopatología de la enfermedad [53, 56].

En los estudios de imagen por resonancia magnética (IRM) ponderada a T2, la hiperintensidad del pedúnculo cerebeloso medio, llamado “signo MCP”, es observado en el 60% de los portadores de premutación en *FMR1* en población sajona; el adelgazamiento del esplenio del cuerpo calloso (CCS) [53] son también frecuentes y útiles para identificar pacientes con FXTAS, se han descrito otros hallazgos como hiperintensidades inespecíficas de la sustancia blanca que aparentemente, en conjunto, pueden ser más frecuentes de lo reportado hasta el momento [54]. Otro hallazgo, aparentemente frecuente, son los cambios volumétricos en áreas corticales y del sistema límbico, aunque no son constantes y pueden estar en relación con las alteraciones cognitivas y conductuales que se presentan en la mitad de los pacientes evaluados [44].

Cuadro 2. Criterios Diagnósticos de FXTAS.

Evaluación	Calase	Criterio
Clínica	Mayor	Temblor de intención Ataxia de la marcha
	Menor	Parkinsonismo
		Neuropatía
		Alteraciones en funciones ejecutivas Déficit moderado a severo en memoria a corto plazo
Radiológica	Mayor	Lesiones en pedúnculo cerebelar mediod/ o tallo cerebral Lesiones de la sustancia blanca en el esplenio del cuerpo caloso
	Menor	Lesiones en sustancia blanca cerebral
		Atrofia generalizada moderada a severa
	Categoría diagnóstica	
Definitivo (D)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Un criterio clínico mayor + Un criterio radiológico mayor</li> <li>* Un criterio clínico mayor + presencia de inclusiones neuronales y astrocíticas en estudio postmortem de tejido cerebral</li> </ul>	
Probable (Pr)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Un criterio radiológico mayor + Un criterio clínico menor</li> <li>* Dos criterios clínicos mayores</li> </ul>	
Posible (Po)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Un criterio clínico mayor + un criterio radiológico menor</li> </ul>	
Improbable (Ip)	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Ausencia de los criterios para denominarlo definitivo, probable o posible</li> </ul>	

Aunado a los estudios anatómicos, en los estudios de imagen funcional se han observado defectos en los tractos cerebelosos y el cuerpo caloso, alteraciones en la actividad metabólica del sistema límbico e hipocampo. Estos hallazgos sustentan la evidencia anatómica previa y explican los síntomas neuropsiquiátricos. La evidencia de la activación compensatoria observada en regiones motoras y de memoria, puede explicar el inicio tardío de los síntomas [57], las alteraciones demostradas por estudios de electrofisiología corroboran la neuropatía periférica [7], indicando que la patología en FXTAS se encuentra no solo en el cerebelo, sino también en los ganglios basales y nervios periféricos [47].

Las manifestaciones de FXTAS comprende un amplio espectro clínico y radiológico que debe considerarse en la práctica clínica como diagnóstico diferencial de distintas patologías, incluidas las ataxias espinocerebelosas, diversos tipos de parkinsonismos y varios trastornos psiquiátricos y cognitivos [58]. Aunque se ha señalado al temblor como signo básico para el diagnóstico de FXTAS, este puede variar en su severidad y presentación clínica, estar ausente y tener una intensidad leve o ser severo e incapacitante [59].

En la población general, la premutación en *FMR1* se observa en aproximadamente 1/250 mujeres y 1/800 varones, mientras que la mutación completa es mucho menos frecuente (1 / 2500-4000). En España, la prevalencia estimada de portadores de la premutación es de 1/130 varones y 1/250 mujeres [47].

La mayor parte de los estudios encaminados a determinar la frecuencia de FXTAS en los centros de atención neurológica, excluye a los individuos con fenotipos atípicos o de inicio temprano; y considerando que los trastornos asociados a X-frágil conllevan a una morbilidad significativa, discapacidad intelectual, infertilidad, menopausia temprana, y una variedad de trastornos neurodegenerativos, también en la descendencia, principalmente la posibilidad de discapacidad intelectual; puede anticiparse que la frecuencia de la patología puede estar subestimada [7].

En poblaciones como Brasil, existen reportes anecdóticos de casos familiares donde se encuentran repetidos de entre 91 y 123 CGG causantes de FXTAS, pero sin contribuir a la incidencia o prevalencia en América [60].

En México, el alelo normal de *FMR1* más frecuente es de 32 repetidos CGG (entre 16 y 40 repetidos)[61], sin embargo, no se han realizado estudios para la búsqueda sistemática de alelos en rangos de premutación y zona gris en pacientes adultos mexicanos con enfermedades neurodegenerativas posiblemente asociadas al gen *FMR1* como la ataxia.

## **Temblor y Ataxia.**

Existen múltiples alteraciones del movimiento, y el temblor, junto con la ataxia, se encuentran entre las más frecuentes. Corresponden a múltiples entidades clínicas y suelen presentarse más como un síntoma que como una entidad clínica específica [59, 62].

El temblor se define como un movimiento involuntario y rítmico de una o varias regiones del cuerpo y es uno de los signos neurológico más frecuentes [63]. El temblor más frecuentes es el temblor esencial, una entidad monosintomática, heterogénea y de edad de inicio variable, al ser etiquetado como un padecimiento benigno, poco es conocido de su etiología, su frecuencia y si realmente corresponde a una entidad aislada o bien es un síntoma que esconde una etiología más comprometedor para el paciente [64].

Cuando el temblor se acompaña de otras manifestaciones neurológicas, aunque sean leves o mínimas debe ser estudiado para establecer la etiología; cuando se presenta temblor de reposo, la etiología suele ser parkinsonica y en el caso del temblor de intención su etiología suele ser más diversa, incluyendo varias enfermedades genéticas [65] como las ataxias espinocerebelosas hereditarias autosómicas dominantes (SCA por sus siglas en inglés), principalmente las tipo 2, 3 y 7 en México [66].

El término "ataxia" literalmente significa "ausencia de orden", y médicamente se define como una discapacidad de la coordinación de los movimientos musculares voluntarios [62] es importante señalar que se refiere a un síndrome clínico de falta de coordinación, no a una enfermedad específica, y también es el síndrome pivote un grupo de enfermedades degenerativas específicas del sistema nervioso [67].

La ataxia, como trastorno del movimiento, suele tener un curso crónico e incapacitante, caracterizado por falta de coordinación de la marcha, a menudo asociada con incoordinación de las manos, disartria (alteración del lenguaje) y alteraciones de los movimientos oculares (nistagmos y sacadas lentas). Su patología suele asociarse a

alteración en el cerebelo o las vías propioceptivas y generalmente se acompaña de temblor [62, 68].

En la mayoría de los pacientes adultos con ataxia y/o temblor progresivo, la afección se manifiesta sin antecedentes familiares obvios. La clasificación y el diagnóstico correcto de estos pacientes es difícil, debido a que deben ser consideradas las causas adquiridas y las genéticas [67].

Las causas generalmente consideradas ante un paciente con temblor son el temblor esencial, la enfermedad de Parkinson y el temblor inducido por sustancias, como uso crónico de alcohol, medicamentos anti arrítmicos, antibióticos, antiepilépticos y broncodilatadores entre otros, sin embargo, cuando se presenta de manera insidiosa, crónica y acompañada de otros síntomas o signos neurológicos o sistémicos, es necesario investigar a fondo la etiología, que suele ser degenerativa o genética [63], y la importancia del diagnóstico específico radica en que el temblor esencial, la enfermedad de Parkinson y el temblor adquirido, por ejemplo, tienen un tratamiento y pronóstico específico y distinto al de otras entidades que cursan con este síntoma.

De igual manera las ataxias adquiridas, como el alcoholismo, las deficiencias de vitaminas, la esclerosis múltiple, enfermedad vascular cerebral, neoplasias primarias de sistema nervioso o tumores metastásicos, las enfermedades paraneoplásicas asociados a carcinoma oculto del ovario, mama o pulmón [69], enfermedades infecciosas y la atrofia múltiple de sistemas, entre otros, que pueden requerir tratamientos específicos y distintos a los empleados en las enfermedades neurodegenerativas que presentan este síntoma [68] .

Una vez descartada una causa adquirida, en un paciente con temblor y ataxia, el diagnóstico debe orientarse a las ataxias espinocerebelosas hereditarias autosómicas dominantes (SCA por sus siglas en inglés) como primera opción [67], éstas pueden presentarse con una gran variedad de síntomas no cerebelosos [70] y son un grupo de trastornos con gran heterogeneidad genética, por lo que su diagnóstico molecular es complicado, sin embargo, la mejor estrategia de estudio se basa en la evaluación de las

frecuencias relativas, la frecuencia en la población, y la presencia de características fenotípicas asociadas tales como convulsiones, pérdida de la visión, otros movimientos anormales asociados y la presencia de deterioro cognitivo u otros síntomas psiquiátricos [68].

La prevalencia global de las SCAs es de 4,8 a 13,9/100000 habitantes, aunque la mayoría de los estudios han sido realizados en población europea o asiática, quedando pendiente conocer su prevalencia e incidencia en gran parte del mundo [71]. En México las SCAs más frecuentes son la tipo 2 seguida de la tipo 3 (que a nivel mundial es la más frecuente) y finalmente la tipo 10 y 17, otros tipos de SCA no se han identificado[66], con excepción de la SCA 7 que es frecuente en poblaciones de Veracruz y presenta un efecto fundador en nuestro país [72, 73].

En la población estudiada por temblor/ataxia en las últimas dos décadas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN “MVS”), en cerca del 60% de los casos no se ha logrado establecer una causa etiológica [74].

Diversos autores han observado que en individuos con temblor/ataxia la prevalencia de PM en *FMR1* varía de 0-4% [74], esta proporción aumenta (5%) en los pacientes en que se ha descartado el diagnóstico de las SCAs más frecuentes (la tipo 2 y la tipo 3) y otros tipos de ataxias genéticas frecuentes, como la Ataxia de Friedreich, señalando que FXTAS debería considerarse como la siguiente causa genética de temblor y/o ataxia de etiología genética, ya que su diagnóstico de certeza es importante por sus implicaciones fenotípicas (FXS) y reproductivas (POF1) [47, 75], por lo que se ha recomendado considerarla como parte del abordaje de los pacientes con ataxia y temblor/ataxia.

## **Justificación.**

En el Departamento de Genética del INNN “MVS”, desde 1994 se ha realizado continuamente investigación acerca de la etiología genética de diversos trastornos del movimiento, como ataxias hereditarias, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington, entre otros.

En el caso específico de las ataxias, se han captado más de 1400 pacientes en las últimas dos décadas y en el 60% de los casos (que representa cerca de 560 pacientes) no se ha logrado establecer un diagnóstico específico y hasta un 5% podría corresponderá a FXTAS [76]. Por lo que consideramos importante caracterizar con mayor detalle clínico a la población con sospecha de ser portadora de la premutación en *FMR1*, para poder ofrecerle el diagnóstico oportuno de FXTAS, lo que permitirá dar a conocer a los familiares el riesgo de desarrollar esta enfermedad o los fenotipos asociados; identificar de manera oportuna a quienes requerirán de tratamiento en centros de tercer nivel de atención y brindar asesoramiento genético de certeza que fomente la toma de decisiones informadas del paciente, familiares y personal de salud involucrado, tanto a mediano y como a largo plazo, incluyendo decisiones reproductivas.

## **Pregunta de investigación.**

¿Cuáles son las características clínicas y radiológicas de los pacientes mexicanos con temblor/ataxia asociadas a alelos en zona gris y en premutación de *FMR1*?

## **Hipótesis.**

Dentro de la población atendida por temblor/ataxia en el INNN, por lo menos el 5% corresponderá a casos de FXTAS y las manifestaciones clínicas y hallazgos radiográficos en IRM de encéfalo mostrarán la heterogeneidad clínica de esta patología.

## **Objetivos.**

### **Objetivo Principal.**

Describir las manifestaciones clínicas y radiológicas en pacientes mexicanos con temblor/ataxia con expandido CGG de *FMR1* en zona gris y de permutación.

### **Objetivos secundarios.**

- Describir la frecuencia de alelos normales, en zona gris y en premutación de *FMR1* en pacientes con Temblor/Ataxia.
- Comparar los hallazgos clínicos y radiológicos en los pacientes mexicanos diagnosticados con FXTAS y aquellos con temblor/ataxia de etiología desconocida.
- Comparar los hallazgos clínicos y radiológicos en los pacientes mexicanos diagnosticados con FXTAS con los Criterios Diagnósticos establecidos.

## **Metodología**

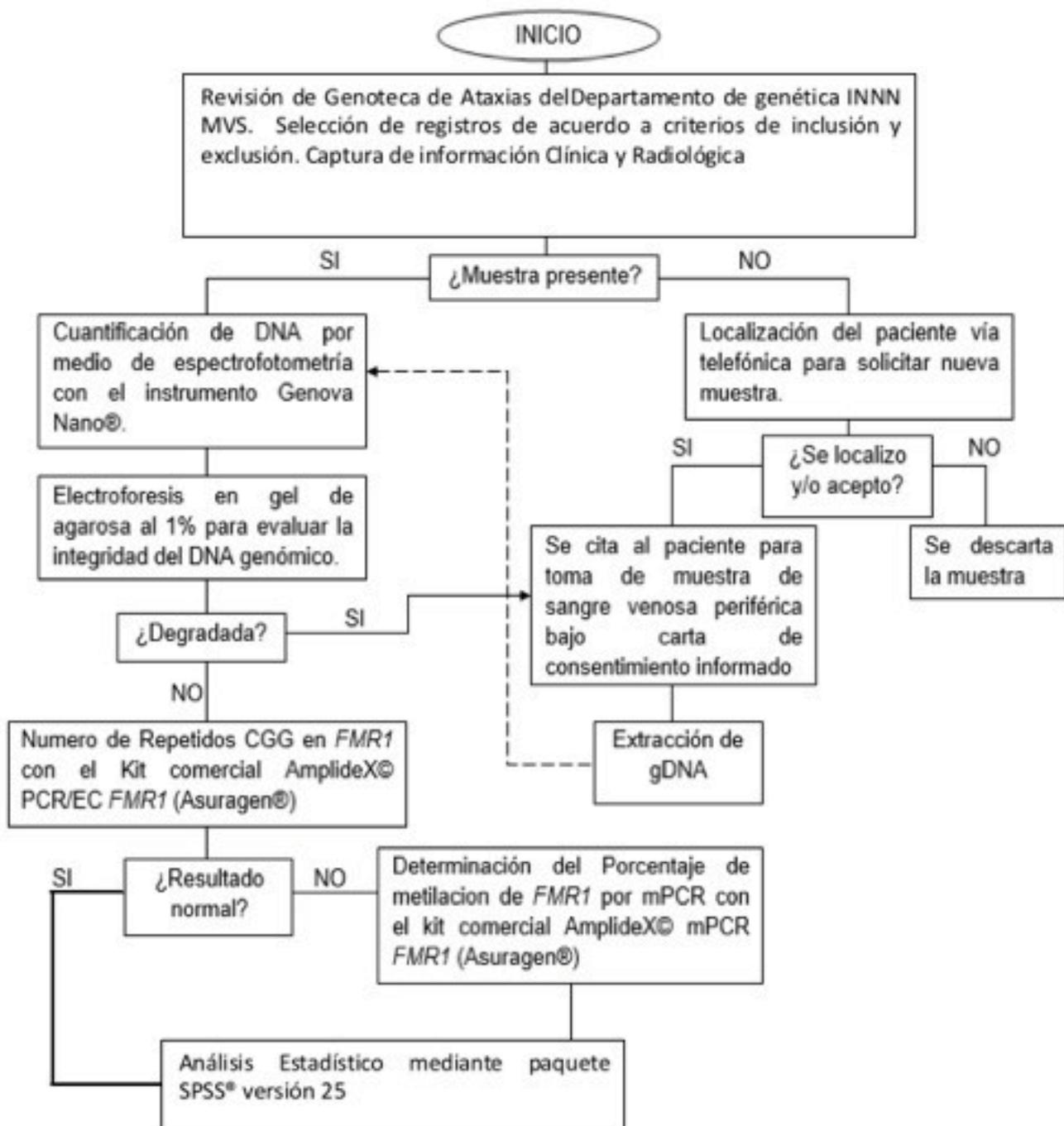
### **Diseño.**

Se realizó un estudio observacional, transversal comparativo empleando los registros y muestras de ADN de pacientes adultos que presentaban temblor/ataxia, en quienes se descartó previamente por el Departamento de Genética del INNN SCA 2, 3 y 7, las causas más frecuentes de ataxia hereditaria en México, cuyo expediente se mantenía en activo, que continuaran seguimiento por un neurólogo especialista en movimientos anormales y un especialista en neurogenética.

Todos los pacientes contaban con IRM de encéfalo, realizada previamente como parte de su protocolo de abordaje y diagnóstico general.

La metodología general empleada se muestra en el siguiente diagrama de flujo (Figura 8).

El presente estudio contó con la aprobación de los Comités Científico y de Bioética del INNN con el número 118/15 (ANEXO 1) [77].



**Figura 8.** Diagrama de flujo de metodología general.

## Población y Muestra.

La población de estudio se integró empleando los registros existentes en la Genoteca de Ataxias del Departamento de Genética del INNN “MVS” de acuerdo a la Declaración de Taipei [78].

Mediante la fórmula de Schaeffer (Fórmula 1), se calculó un tamaño de muestra de 73 pacientes considerando una frecuencia reportada de FXTAS en pacientes con diagnóstico clínico de SCA, negativos para estudio molecular, del 5% y un intervalo de confianza de 95%. De acuerdo a estos resultados se estima un poder mayor a 80%.

$$n = def \left( \frac{N \hat{p} \hat{q}}{\frac{d^2}{Z_\alpha^2} (N-1) + \hat{p} \hat{q}} \right)$$

**Fórmula 1.** Fórmula de Schaeffer para el cálculo de tamaño de la muestra.

### **Criterios de Inclusión.**

- I. Registros clínicos incluidos en la Genoteca de Ataxias del Departamento de Genética del INNN "MVS".
- II. Inicio de la sintomatología a los 30 años de edad o posterior.
- III. Estudio molecular de SCA 2, SCA 3 y SCA 7 negativos.
- IV. Con diagnóstico descartado de enfermedad de Parkinson por neurólogo especialista en movimiento anormales.

### **Criterios de exclusión.**

- I. Diagnóstico de ataxia de etiología adquirida, realizado por un neurólogo especializado en movimientos anormales.
- II. Cuadro clínico sugestivo de SCA 10 (epilepsia agregada), SCA 17 (movimientos coreiformes agregados) o Ataxia de Friedreich (inicio temprano, cardiomiopatía, cerebelo normal y neuropatía sensitiva o de cordones posteriores).
- III. Ausencia de consentimiento informado para estudios de investigación.

### **Criterios de eliminación.**

- I. Registro presente en la Genoteca de Ataxias del Departamento de Genética del INNN "MVS" con muestra que sea de calidad o cantidad insuficiente para su análisis.
- II. Expediente clínico referido en la Genoteca de Ataxias del Departamento de Genética del INNN "MVS" depurado, enviado a archivo muerto o que carezca de la información necesaria
- III. Establecer un diagnóstico etiológico específico y distinto a FXTAS durante la ejecución del presente estudio.
- IV. Retiro voluntario del consentimiento informado.

La información clínica y radiográfica se capturó en un formulario realizado *ad hoc* para su manejo y análisis (ANEXO 3).

### Definición de Variables.

La definición operacional y conceptual de las variables analizadas se estableció de acuerdo a los antecedentes familiares, antecedentes no patológicos, antecedentes patológicos, hallazgos clínicos y paraclínicos asociados al diagnóstico de FXTAS así como los diagnósticos diferenciales de SCA, Parkinsonismo, Sx Piramidal, Sx motoneurona y causas adquiridas, como se muestran a continuación.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
<b>ANTECEDENTES SOCIODEMOGRÁFICOS</b>			
<b>Sexo</b>	Sexo al que pertenece el sujeto.	Masculino (0) Femenino (1)	Categórica Dicotómica
<b>Edad actual</b>	Edad al momento de integrarse al presente estudio.	Edad en años cumplidos al momento de realizar el presente estudio.	Numérica Continua
<b>Estado civil</b>	Estado civil al momento de integrarse al presente estudio.	Soltero (0) Casado / unión libre (1) Divorciado / separado (2) Viudo (3)	Categórica
<b>Nivel de estudios</b>	Años de estudio.	Número de años de educación formal totales.	Numérica Continua
<b>Ocupación actual</b>	Actividad económica que realiza al momento de integrarse al presente estudio.	Estudiante (1) Empleo remunerado (2) Empleo no remunerado / Hogar (3) Desempleado (4)	Categórica
<b>Nivel Socioeconómico</b>	Nivel socioeconómico asignado por el departamento de trabajo social del INNN"MV".	1X-2 Bajo (1) 3-4 Medio (2) 5-6 Alto (3)	Categórica
<b>Tipo de vivienda</b>	Tipo de vivienda del paciente	Urbana con servicios completos (1) Urbana con servicios incompletos (2) Rural con servicios completos (3) Rural con servicios incompletos (4)	Categórica

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>
<b>Entidad federativa de residencia</b>	Entidad federativa de residencia.	Iniciales de la entidad federativa (Estado) de residencia.	Categórica
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES</b>			
<b>Patrón de herencia</b>	Patrón de herencia que muestra el árbol genealógico.	Esporádico (0) Autosómico dominante (1) Autosómico recesivo (2) Ligado al X (3) Agregación familiar (4)	Categórica
<b>Consanguinidad en los padres</b>	Presencia o ausencia de antecedente de consanguinidad en los padres del paciente.	Presente (1) Ausente (2)	Categórica Dicotómica
<b>Ataxia</b>	Presencia de antecedente de ataxia en la familia.	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Discapacidad intelectual</b>	Presencia de antecedente de ataxia en la familia.	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Ceguera</b>	Presencia de antecedente familiar de ceguera primaria (no ocasionada por enfermedades concomitantes, infecciones o trauma).	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Epilepsia</b>	Presencia de antecedentes familiar de epilepsia o crisis convulsivas de repetición.	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Enfermedad psiquiátrica en primer grado</b>	Diagnóstico de enfermedad psiquiátrica realizado por especialista en padre, madre, hermanos o hijos del paciente.	Ausente (0) Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (1) Trastorno obsesivo compulsivo (2) Trastorno depresivo (3) Trastorno esquizoafectivo (4) Trastorno psicótico (5) Esquizofrenia (6)	Categórica
<b>Enfermedad psiquiátrica en segundo grado</b>	Diagnóstico de enfermedad psiquiátrica realizado por especialista en familiares de segundo grado (abuelos, tíos, primos).	Ausente (0) Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (1) Trastorno obsesivo compulsivo (2) Trastorno depresivo (3) Trastorno esquizoafectivo (4) Trastorno psicótico (5) Esquizofrenia (6)	Categórica

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
<b>Déficit de memoria moderado / severo</b>	Alteraciones cognitivas moderadas o severas diagnosticadas por especialista.	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Déficit en funciones ejecutivas</b>	Alteración de funciones ejecutivas diagnosticadas por especialista.	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Neuropatía</b>	Presencia de neuropatía diagnosticada por especialista o mediante estudios de electrofisiología	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Infertilidad / Esterilidad</b>	Incapacidad de procrear después de por lo menos de dos años de tener relaciones sexuales sin métodos de planificación familiar con la misma pareja	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>Falla ovárica prematura</b>	Menopausia antes de los 40 años	Ausente (0) Presente en primer grado (1) Presente en segundo grado (2)	Categórica
<b>ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS</b>			
<b>Zoonosis</b>	Convivencia habitual con animales	Ausente (0) Presente (1)	Categórica
<b>Hacinamiento</b>	Cohabitación con más de personas en el mismo cuarto	Ausente (0) Presente (1)	Categórica
<b>Exposición a pesticidas</b>	Contacto con pesticidas por un año o mas a lo largo de la vida previos a la enfermedad de manera laboral o ambiental	Ausente (0) Presente ambiental (1) Presente laboral (2)	Categórica
<b>Exposición a insecticidas</b>	Contacto con insecticidas por un año o mas a lo largo de la vida previos a la enfermedad de manera laboral o ambiental	Ausente (0) Presente ambiental (1) Presente laboral (2)	Categórica

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
<b>Exposición a solventes orgánicos</b>	Contacto con solventes orgánicos por un año o mas a lo largo de la vida previos a la enfermedad de manera laboral o ambiental	Ausente (0) Presente ambiental (1) Presente laboral (2)	Categórica
<b>Sedentarismo</b>	Ausencia de actividades físicas recreativas o deportivas como hábito por lo menos dos veces por semana	Ausente (0) Presente (1)	Categórica Dicotómica
<b>ANTECEDENTES GINECOBSTÉTRICOS</b>			
<b>Menarca</b>	Edad de menarca	Edad cumplida en años al momento de la menarca	Numérica Continúa
<b>Menopausia</b>	Edad de menopausia	Edad cumplida en años al momento de la menopausia	Numérica Continúa
<b>Número de Gestas</b>	Embarazos	Número de embarazos que presentó la paciente	Numérica Continúa
<b>Número de Partos</b>	Partos	Número de embarazos resueltos por parto que presentó la paciente	Numérica Continúa
<b>Número de Cesáreas</b>	Cesáreas	Número de embarazos resueltos por cesárea que presentó la paciente	Numérica Continúa
<b>Número de abortos</b>	Abortos	Número de embarazos interrumpidos antes de la semana gestacional 22	Numérica Continúa
<b>CONSUMO DE SUSTANCIAS</b>			
<b>Toxicomanías</b>	Historia de consumo de sustancias sin considerar temporalidad o intensidad	Ausentes (0) Tabaco (1) Alcohol (2) Inhalantes (3) Cannabinoides (4) Cocaína (5) Otras sustancias (6)	Categórica
<b>CUADRO CLÍNICO</b>			

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>
<b>Malformaciones</b>	Malformaciones congénitas	Ausentes (0) Cardíacas (1) Vasculares (2) Musculo-esqueléticas (3) Gastrointestinales (4) Craneofaciales (5) Renales (6) Otras (7)	Categórica
<b>Alteraciones oftalmológicas</b>	Presencia de hallazgos oftalmológicos en exploración física	Ceguera (1) Alteración de nervio óptico (2) Retinosis pigmentaria (3) Disminución de campo visual / Escotomas (4)	Categórica
<b>Síndrome Cerebeloso</b>	Hallazgos en la exploración física de alteración cerebelosa realizada por neurólogo experto en movimientos involuntarios.	Dismetría (1) Disdiadococinesia (2) Nistagmo (3) Sacadas lentas (4) Disartria (5) Marcha atáxica (6)	Categórica
<b>Síndrome Parkinsónico</b>	Hallazgos en la exploración física de alteración parkinsónica realizada por neurólogo experto en movimientos involuntarios.	Rigidez muscular (1) Bradicinecia (2) Romberg positivo (3) Alteración de voz (4) Micrografismo (5)	Categórica
<b>Síndrome Piramidal</b>	Presencia de datos de motoneurona superior reportados en exploración física de neurólogo experto en movimientos anormales	Debilidad muscular generalizada (1) Plejía (2) Espasticidad (3) Hiperreflexia (4) Babinski (5)	Categórica
<b>Síndrome Neurona Morota inferior</b>	Presencia de datos de motoneurona inferior reportados en exploración física de neurólogo experto en movimientos anormales	Atrofia muscular marcada (1) Hipotonía (2) Fasciculaciones (3) Hiporreflexia (4)	Categórica
<b>Temblor</b>	Presencia de datos de Temblor reportados en exploración física de neurólogo experto en movimientos anormales	Temblor de acción o cerebeloso (1) Temblor de reposo o parkinsónico (2) Temblor fino distal / Esencial (3)	Categórica

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>
<b>Enfermedades psiquiátricas concomitante</b>	Diagnóstico de enfermedad psiquiátrica realizado por especialista.	Trastorno depresivo (1) Trastorno por ansiedad (2) Trastorno obsesivo compulsivo (3) Trastorno afectivo bipolar (4)	
<b>Alteraciones en estudios de electrofisiología</b>	Presencia de alteraciones en velocidades de conducción nerviosa	Ausente (0) Neuropatía motora (1) Neuropatía sensitiva (2) Neuropatía mixta (3) Alteraciones propioceptivas (4)	Categórica
<b>Hallazgos en IRM</b>	Hallazgos en Imagen por Resonancia Magnética referido por médico especialista.	Normal (0) Atrofia cortical (1) Atrofia subcortical (2) Hiperintensidad aislada en sustancia blanca (3) Múltiples hiperintensidades en sustancia blanca (>4) (4) Atrofia cerebelosa (5) Hiperintensidad en pedúnculo cerebeloso medio (6) Hiperintensidad en sustancia blanca cerebeosa (7)	Categórica

## **Métodos Moleculares.**

### **Extracción de DNA.**

Se tuvieron un total de 106 muestras, de las cuales 99 se encontraban en el banco de DNA del mismo laboratorio y las 7 restantes fueron extraídas a partir de linfocitos sangre periférica mediante la metodología estandarizada en el laboratorio de Genética del INNN estandarizados [79] con el protocolo de purificación de ADN a partir de sangre periférica empleando el kit comercial QIAamb Blood Midi Kit (Spin Protocol)<sup>®</sup> (QUIAGEN<sup>®</sup>) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

- Se añadió a cada columna 200  $\mu$ l sangre periférica, obtenida por punción venosa, y se agregó 200  $\mu$ l de buffer PBS mas 20  $\mu$ l de Proteinasa K, agitando por inversión,
- Se añadió 200  $\mu$ l de buffer AL, agitando con ayuda de vortex e incubando a 56°C por 10 minutos.
- Se colocaron 200  $\mu$ l de etanol absoluto, agitando con ayuda de vortex y centrifugando a 8000 rpm por 1 minuto. Se desechó el filtrado.
- Se adiciono 500  $\mu$ l de buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se desechó el filtrado.
- Se añadió 500  $\mu$ l de buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos. Se desechó el filtrado.
- Se adicionó 200  $\mu$ l de buffer AE, incubando por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando a 8000 rpm por 1 minuto, para la obtención del DNA.

### **Cuantificación de DNA.**

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

## Genotipificación y discriminación alélica.

Para la discriminación alélica se realizó mediante metodología de fragmentos por PCR con el kit comercial AmplideX® PCR/CE *FMR1* Kit y en los pacientes portadores de alelos en zona gris, premutación o mutación completa se realizó estudio de metilación de *FMR1* mediante el kit comercial AmplideX® mPCR *FMR1* Kit de acuerdo a las especificaciones del proveedor (PC-0164ENV6).

## PCR con primer de tripletes (TP-PCR).

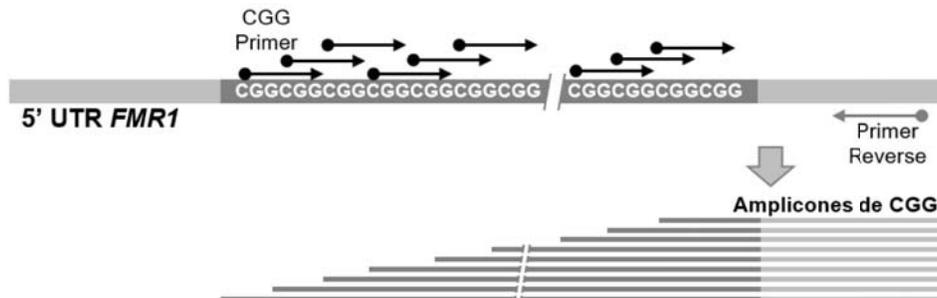
La reacción TP- PCR (por sus siglas en ingles *Triplet-Repeat Primer*) utiliza un par de primers o cebadores específicos de locus, Forward y Reverse, que hibridan al inicio y final de las repeticiones, además posee un primer adicional que amplifica a partir de múltiples sitios ya amplificados dentro de la repetición. La especificidad está dictada por el primer específico de locus marcado fluorescentemente. TP-PCR proporciona una escala característica en el trazado de fluorescencia que permite la identificación rápida de repeticiones patogénicas grandes [80].

El Kit comercial AmplideX® PCR/EC *FMR1* (Asuragen®), describe el proveedor que fue diseñado para identificar todos los posibles repetidos de CGG presentes en *FMR1*, esto incluye los cuatro estados, normal, GZ, PM y FM, mediante el uso de una electroforesis capilar, este mismo ensayo permite dos tipos diferentes de pruebas: una PCR-gen específica (Figura 9)[81], donde los primers Forward y Reverse amplifican la longitud completa acorde al número de repetidos y una TP-PCR (por sus siglas en ingles *Triplet-Repeat Primer*) (Figura 10)[81] en la región 5' no codificante de *FMR1*, la cual contiene un tercer primer quimérico marcado con el fluoróforo FAM, que en combinación con los primers Forward y Reverse específicos para *FMR1* logran una hibridación aleatoria con la región donde se hallan los repetidos CGG, lo que provoca la generación de varios amplicones de diversos tamaños según el número de repetidos CGG presente en la muestra aunado al fragmento del alelo específico del propio gen [82, 83].

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



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



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

## Metodología de la TP-PCR.

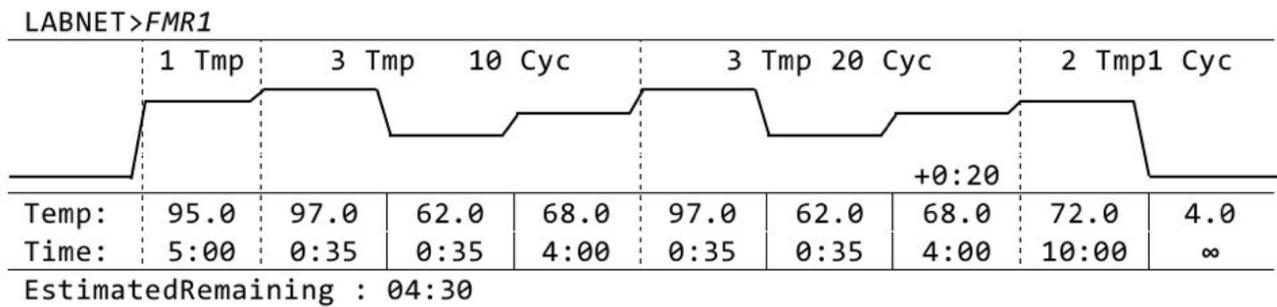
Se utilizó el Kit comercial AmplideX<sup>®</sup> PCR/EC *FMR1* (Asuragen<sup>®</sup>) para la determinación del número de repetidos CGG. La TP-PCR (por sus siglas en inglés *Triplet-Repeat Primer*) y Electroforesis Capilar (EC) se realizaron de acuerdo a los protocolos del fabricante [82] (Cuadro 3). Después de añadir dicho contenido a cada muestra, la reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador marca MultiGene<sup>™</sup> Optimax Thermal Cycle (LabNet<sup>®</sup> USA) con las condiciones indicadas en la Figura 11.

Transcurridas las 4:30 horas de la reacción de PCR se comienza la EC, añadiendo a cada muestra el Master Mix específico (Cuadro 4).

Se prosiguió a montar una placa de 96 pozos para secuenciación, un pozo por cada muestra, se centrifugo y desnaturalizo a 95°C por 2 minutos y se resolvió en el analizador genético Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (capilar de 36 cm). Los electroferogramas generados fueron interpretados con ayuda del programa GeneMapper<sup>®</sup> Versión 4.0 (previamente ajustado para un tamaño de alelo Normal, GZ, PM y FM Figura 12), dando una señal de color azul para FAM, donde pudieron identificarse la longitud de los alelos (en la Figura 13 se muestran los ejemplos correspondientes a los distintos hallazgos posibles).

**Cuadro 3.** Volúmenes específicos para reacción de TP-PCR

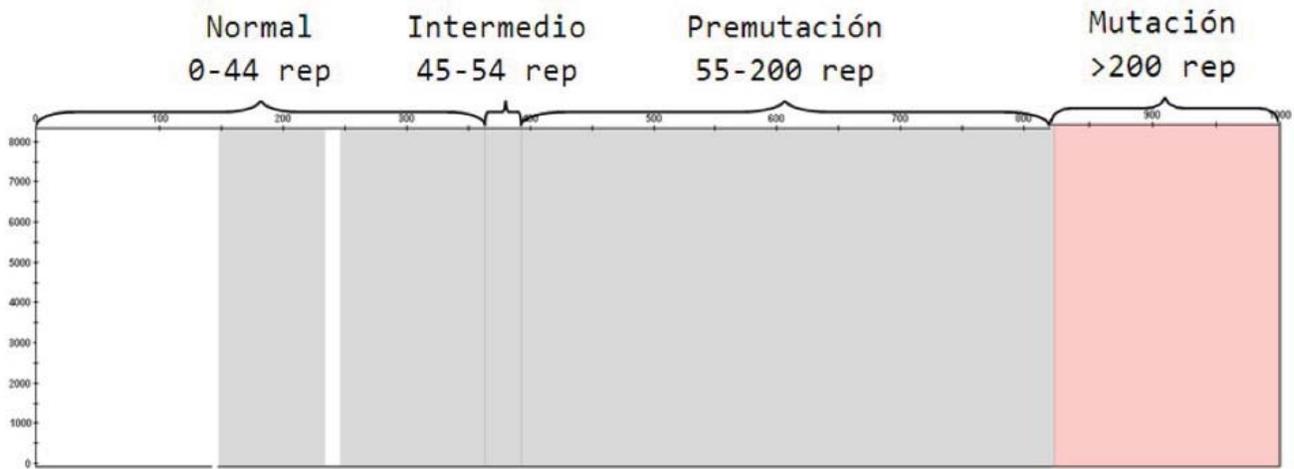
PCR Master Mix	Vol / Rxn (µL)
GC-Rich AMP Buffer	11.45
<i>FMR1</i> F, R FAM-Primers	0.50
<i>FMR1</i> CGG Primer	0.50
Diluyente	0.50
GC-Rich Polymerase Mix	0.05
DNAg [20-80 ng/ µL]	2.0
Volumen Total (µL)	15.00



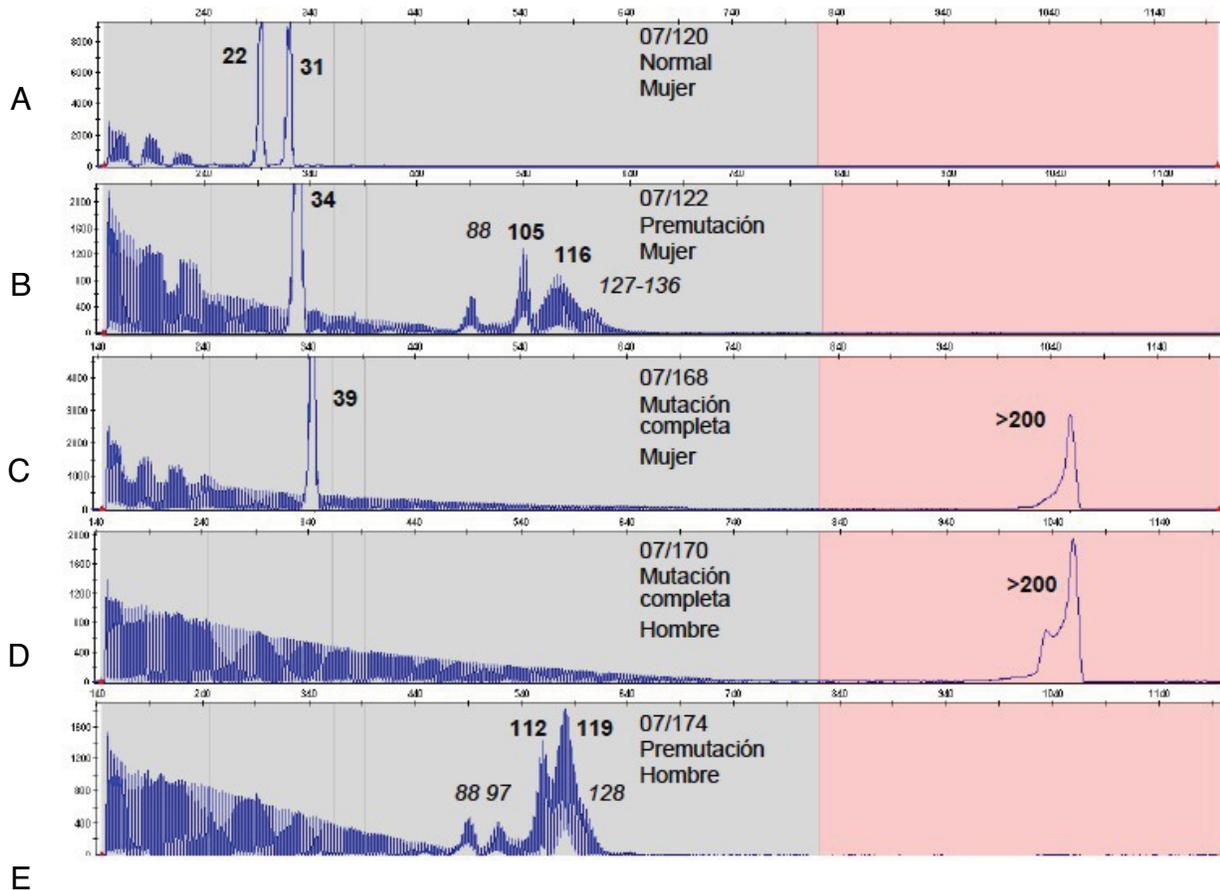
**Figura 11.** Ciclos para la TP-PCR.

**Cuadro 4.** Volúmenes específicos para realizar la EC

Maste Mix de Electroforesis	Vol / Rxn (µL)
Hi-Di Formamida	11.0
ROX Ladder	2.0
Producto de PCR	2.0
Volumen total (µL)	15.00



**Figura 12.** Asignación de valores y zonas para los electroferogramas.



**Figura 13.** Ejemplos de electroferogramas obtenidos después de la EC. (A) Se identifican los trectos repetidos CGG con las interrupciones AGG y los alelos específicos en rangos normales. (B) Se observa al igual que en (A) ambos alelos en una mujer portadora de premutación, a diferencia de (C) donde se observan ambos alelos de una mujer portadora de mutación completa. En (D) y (E) se observan dos masculinos, en el primer caso (D) se observa el alelo en rango de mutación, y en el segundo caso (E) en rango de premutación.

Los propios electroferogramas fueron exportados a un Macro análisis en Excel®, proporcionado por Asuragen®, el cual determinó el número de repetidos CGG en *FMR1* presentes en cada muestra (Figura 14).

**FMR1 Analysis Macro**  
Version 2.1.2

Macro calculates CGG repeat length from size in base pairs for gene specific FMR1 product peaks using site-specific correction factors. The final report includes site-specific genotype cutoff ranges.

**Site Information**

Configuration	Value
Site	
Instrument ID	
Polymer	POP-7
Capillary length	50cm

**CGG Repeat Calibration Factors**

Variable	Analysis Factors
Correction Factor ( $c_1$ )	230.0
Mobility Factor ( $m_1$ )	2.9800
Signal Threshold	50
Date Derived	02-Feb-10

**Genotype Cutoffs**

Genotype	Abbreviation	Range [CGG]	
Normal	NOR	0	44
Intermediate	INT	45	54
Premutation	PM	55	200
Full Mutation	FM	>200	
Full Mutation Mosaic	FMm	<i>includes FM and FM allele</i>	



$$CGG_i = \frac{Peak_i - c_0}{m_0}$$

(RUO) Research Use Only

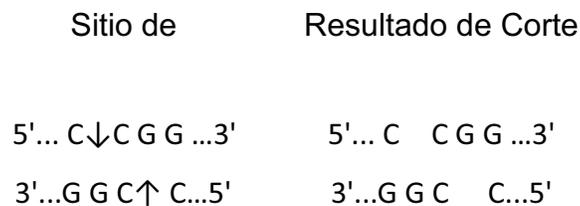
Generate New Panels and Bins
Analyze

**Figura 14.** Obtención de número de repetidos a través del Macro de Excel, Azuragen® (2017).

## Reacción de PCR sensible a metilación (mPCR).

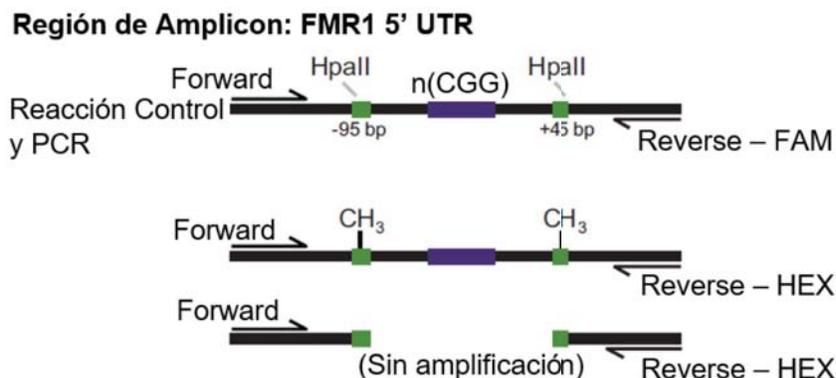
La Reacción en Cadena de la Polimerasa específica de Metilación (m-PCR) es una técnica que ha facilitado la detección de la hipermetilación del promotor en islas CpG. La capacidad de la m-PCR para diferenciar una citosina metilada de no metilada depende de una previa modificación al DNA, ya sea por tratamiento de bisulfito de sodio, el cual actúa desaminando las citosinas del DNA convirtiendo estas en uracilo mientras que es incapaz de actuar sobre las citosinas que se encuentren metiladas, o digestión enzimática mediante HpaII (Figura 15), donde el sitio de corte una enzima de restricción dependa del estado metilado o no metilado evidenciando la ausencia o presencia de un corte enzimático, seguido de una PCR sobre en DNA modificado utilizando pares de primers complementarios [84].

El Kit comercial AmplideX® mPCR *FMR1* (Asuragen®), describe el proveedor que fue diseñado para cuantificar porcentualmente el grado de metilación en los alelos presentes en *FMR1*. Para ellos se llevan a cabo dos reacciones por separado, las cuales parten de una mezcla de dos plásmidos: uno de Control de Digestión (CtrlDig), marcado con FAM, y uno con Control de Referencia (CtrlRef), marcado con HEX, se emplea una digestión enzimática con HpaII [82], la cual es una enzima de restricción de tipo II que es producida por el género y especie bacteriano *Haemophilus parainfluenzae* que posee una diana de restricción en el ds-DNA dependiente de una secuencia no metilada, palindrómica y asimétrica, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos adhesivos (Figura 15) [85].



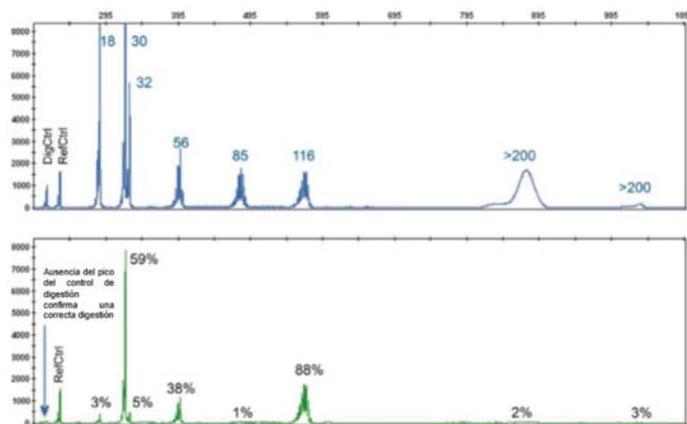
**Figura 15.** Diagrama de restricción de HpaII. Modificado de KEGG .

De lo contrario, si se encuentra una isla CpG metilada entonces la actividad catalítica se verá inhibida, lo cual se ve reflejado en la ausencia de metilación en cualquiera de los sitios de corte de la enzima resulta en digestión y por lo tanto no amplifica (Figura 16) [86].



**Figura 16.** Representación de la región del amplicón y resultados de digestión Modificado de Grasso, et al, (2014).

Solo los alelos completamente metilados son amplificados usando el fluoroforo HEX, y como se ha mencionado, la falta de metilación en cualquier sitio no origina un corte y por lo tanto da lugar a amplificación marcada con FAM (Figura 17) [86].



**Figura 17.** Ejemplo de los dos fluorocromos para un control de múltiples alelos. El electroferograma en el canal FAM (fluorocromo azul) muestra la determinación del repetido CGG presente. La intensidad de señal en el canal HEX (fluorocromo verde) corresponde a la presencia de metilación del alelo para *FMR1*. Modificado de Grasso, et al, (2014).

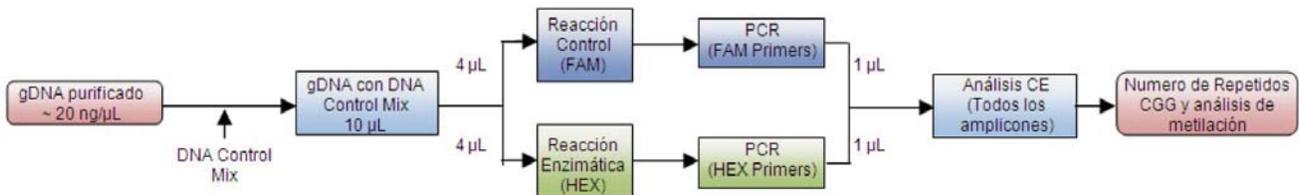
El porcentaje de metilación (%Met) para cada pico generado, es calculado como la proporción normalizada de la altura del pico en el canal HEX contra el canal FAM para cada amplicón del alelo, según la fórmula 2 [86].

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

**Fórmula 2.** Ecuación para el cálculo del porcentaje de metilación. Obtenido de Grasso, et al, (2014). Donde el Pico<sub>i</sub> (Peak<sub>i</sub>) corresponde a la altura de cada amplicón del alelo y RefCtrl corresponde a la altura del pico del control de referencia de cada color

## Determinación del Porcentaje de metilación de *FMR1* por mPCR.

Se analizó el estado de metilación de aquellas muestras que obtuvieron un resultado positivo para alelos en GZ o PM de *FMR1*, el cual fue mediante el kit comercial AmplideX mPCR *FMR1*, las reacciones se realizaron con base en los protocolos del fabricante (Figura 18) [82].



**Figura 18.** Diagrama general para la mPCR. Modificado de Chen, et al, (2010).

Como se indica en la figura previa, se es necesario dos tratamientos simultáneos para cada muestra, para ello se requiere preparar un control de DNA (DNA Control Mix) al cual se le añadió por cada muestra (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Volúmenes específicos para el DNA

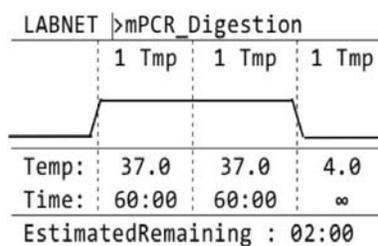
Control Mix	
DNA Control Mix	Vol / Rxn (μL)
DNAg	8.0
DNA Control Mix	2.0
Volumen Total (μL)	10.00

Después de preparar el DNA Control Mix, se prosigue a preparar el buffer de Digestión Enzimática Master Mix, este mismo se preparó con los siguientes volúmenes (Cuadro 6).

Cada buffer preparado es colocado a cada DNA Control Mix por separado, es decir, 4.0μL de Control (FAM) al tubo que ya contiene DNA Control Mix de alguna muestra y 4.0μL de Digestión (HEX) al tubo que ya contiene DNA Control Mix de la misma muestra, la digestión enzimática se llevó a cabo en un termociclador marca MultiGene™ Optimax Thermal Cycle (LabNet® USA) (Figura 19).

**Cuadro 6.** Volúmenes específicos para el Control FAM y Digestión HEX

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



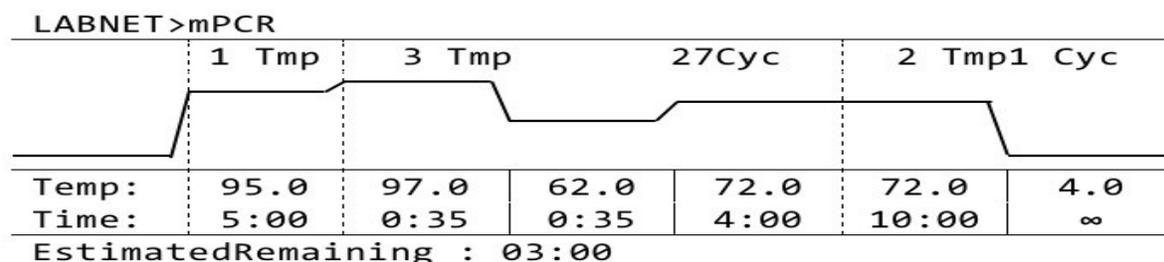
**Figura 19.** Ciclos para la digestión enzimática en mPCR. Autoría propia

Finalizando la digestión enzimática se debe llevar a cabo la reacción de mPCR, la cual se añadiendo por muestra (Cuadro 7)

**Cuadro 7.** Volúmenes específicos para la mPCR

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

Después de añadir dichos contenidos a cada muestra recién salida de la digestión por separado, se prosigue con la reacción de PCR, la cual se llevo a cabo en un termociclador marca MultiGene™ Optimax Thermal Cycle (LabNet® USA) (Figura 20)



**Figura 20.** Ciclos para mPCR.

Transcurridas las 3:00 horas de la reacción de PCR se realizó la EC, añadiendo a cada muestra los reactivos correspondientes (Cuadro 8).

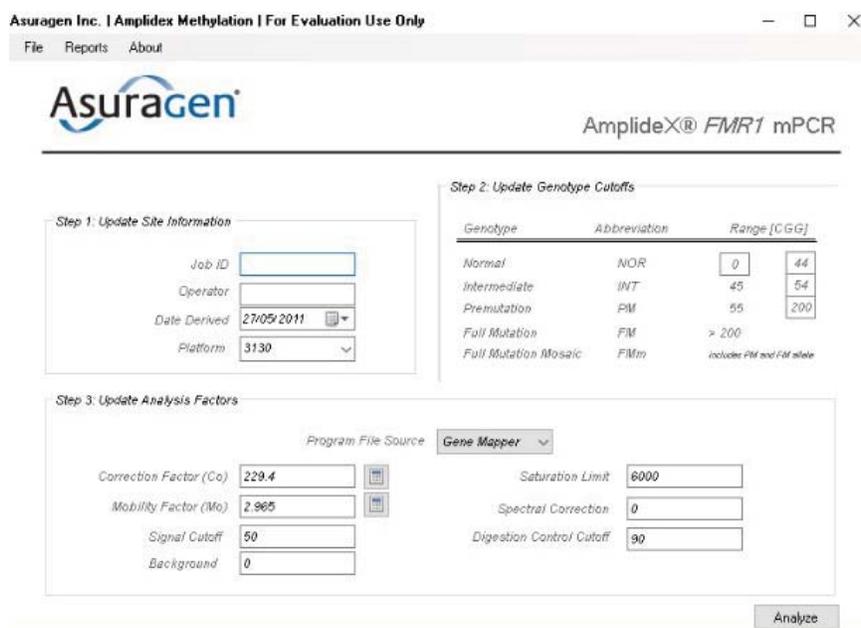
Se prosiguió a montar una placa de 96 pozos para secuenciación, un pozo por cada muestra, solo en este paso es donde las reacciones separadas se juntan para la EC, se centrifugo y desnaturalizo a 95°C por 2 minutos y se resolvió en el analizador genético

Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (capilar de 36 cm). Los electroferogramas generados fueron interpretados con ayuda del programa GeneMapper® Version 4.0 (previamente ajustado para un tamaño de alelo Normal, GZ, PM y FM; Figura 17), dando dos señales, una azul para FAM y una verde para HEX.

Los valores de amplitud y área bajo la curva de los electroferogramas obtenidos fueron exportados a un Macro para el análisis en Excel®, proporcionado por Asuragen®, el cual determinó el porcentaje de metilación en *FMR1* presentes en cada muestra (figura 21).

**Cuadro 8.** Volúmenes específicos para la Electroforesis Capilar

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



**Figura 21.** Interfase de AmplideX© mPCR *FMR1* (Asuragen®).

## **Análisis estadístico**

Se realizó una descripción de las características socio-demográficas, clínicas y moleculares de la muestra mediante medidas de tendencia central y dispersión. Posteriormente se compararon dichas variables, mediante  $\chi^2$  ó t de Student de acuerdo al tipo de variable, entre los pacientes portadores de alteración de *FMR1* y no portadores (Grupo FXTAS y Grupo no FXTAS respectivamente).

En cuanto a los Criterios Diagnósticos de FXTAS, se compararon las frecuencias entre los grupos arriba señalados y posteriormente se realizó Prueba de puntos de Wilson para establecer su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y precisión diagnóstica, así como curva ROC empleando como estándar de oro para el diagnóstico el estudio molecular de *FMR1*.

Los cálculos fueron realizados mediante paquete estadístico SPSS versión 25.

## Resultados

### Características socio-demográficas de la muestra.

De los 1509 registros encontrados en la genoteca de ataxias del Departamento de Genética del INNN"MV" se seleccionaron 569 que presentaban diagnóstico molecular negativo para SCA2, SCA3, SCA7 y Ataxia de Friedreich (las formas de ataxia más frecuentes en México) y se procedió a realizar la revisión del expediente clínico, encontrando 244 expedientes vigentes y con la información clínica y radiológica completa de pacientes que cumplían los criterios de inclusión. Se eliminaron 3 expedientes debido a que dos pertenecían a dos hermanos diagnosticados con ataxia secundaria a citopatía mitocondrial y uno por diagnóstico posterior de Ataxia de Friedreich, quedando 241 expedientes. Posteriormente se procedió a localizar las muestras de DNA correspondientes a cada expediente seleccionado, encontrando que sólo 99 se encontraban en condiciones para su análisis molecular; el resto se encontraba degradado, contaminado o presentaba concentraciones de material genético por debajo de lo necesario para el análisis molecular, por lo que se procedió a contactar directamente al paciente recuperando 5 muestras; finalmente, durante el desarrollo del presente estudio se integraron dos pacientes nuevos en quienes se descartaron otras patologías y cumplían los criterios necesarios, por lo que se anexaron al presente estudio, previo consentimiento informado.

De esta manera se integró un grupo de estudio conformado por 106 pacientes con temblor/ataxia, con una edad media de 58.37 años (D.E.= 10.07; 39-78 años), de los cuales 49.1% (n=52) eran hombres y 50.9% (n=54) mujeres. Tres casos habían perdido seguimiento y no fue posible contactarles, por lo que se desconoce si al momento del estudio se encontraban vivos, sin embargo, se incluyeron en la muestra de estudio ya que la información presente en los expedientes clínicos se consideró completa y previamente autorizaron mediante consentimiento informado en que la muestra de DNA obtenida, así como la información clínica y radiológica respectiva podían emplearse para estudios de investigación asociados a su condición.

Al analizar las variables socio-demográficas, se observó que 18.9% (n=20) pacientes pertenecían a estrato socioeconómico bajo, 63.2% (n=63) al estrato medio y el 17.9% (n=19) restante a nivel alto; del total de pacientes el 53.8% (n=57) mantenían una relación de pareja estable mientras que el restante 46.2% (n=49) no, de igual manera se observó que el 45.3% (n=48) tenía empleo remunerado, 18.9% (n=20) eran amas de casa y 35.8% (n=38) se encontraban desempleados, con una escolaridad media de 9.5 años (D.E.= 4.9; 0-19 ).

Se observó que la mayoría de los pacientes radicaban en el centro de la república, siendo el 41.5% (n = 44) residentes de la Ciudad de México y 11.3% (n = 12) del Estado de México, el 47.2% (n= 50) eran originarios diferentes estados de la república, notándose la ausencia de casos residentes de los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Nayarit, Aguascalientes, Querétaro, Tabasco Campeche y Yucatán.

En cuanto a toxicomanías, el 36% (n=39) tenía historia de consumo de tabaco, 31.1% (n=33) antecedente de consumo de alcohol, 6.6% aceptaba haber consumido marihuana, solo el 2.8% (n=3) cocaína o inhalantes y solo 1.9% (n=2) refería el antecedente de consumo de otra sustancia.

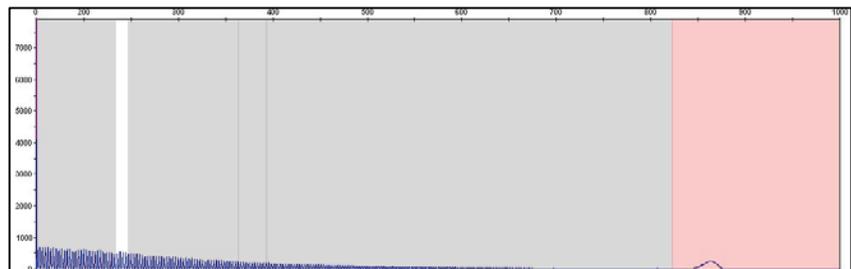
## Características Moleculares de la muestra.

Para conformar los grupos de estudio se realizó diagnóstico molecular en todas las muestras, de acuerdo a los protocolos mencionados anteriormente obteniendo los respectivos electroferogramas, los cuales fueron analizados de acuerdo a los criterios mencionados previamente con el software respectivo. A continuación, se muestran ejemplos de los mismos.

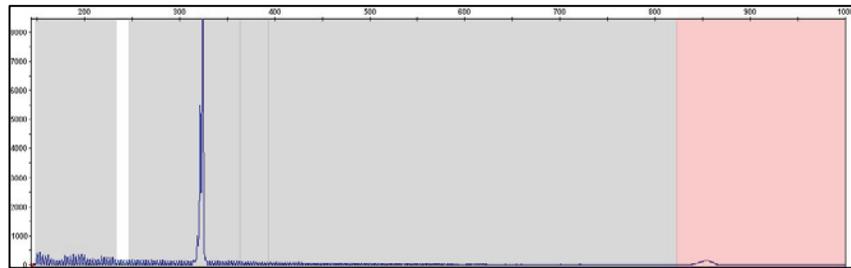
### Descripción

### Electroferograma

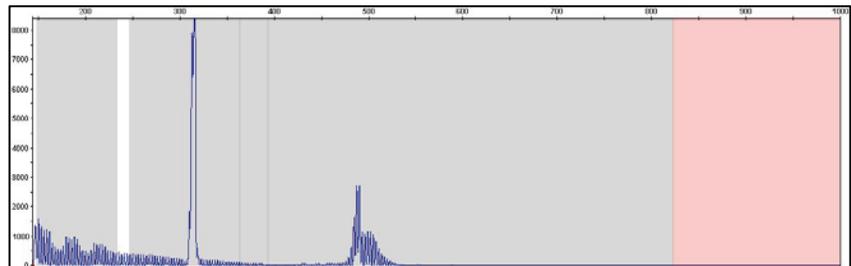
Individuo masculino que presenta un alelo en rango de mutación completa (FM). (>200 repetidos CGG)



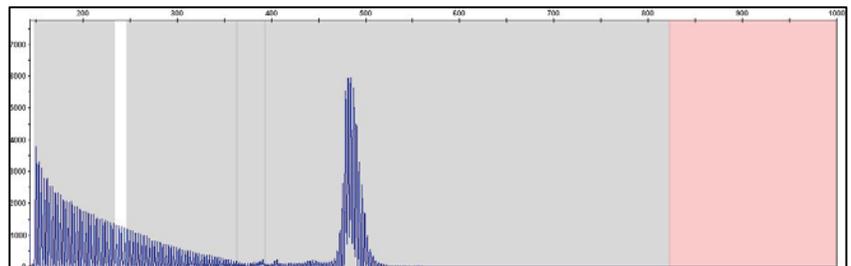
Individuo femenino heterocigoto que presenta un alelo normal (32 repetidos CGG) y otro alelo en rango de FM (>200 repetidos CGG).



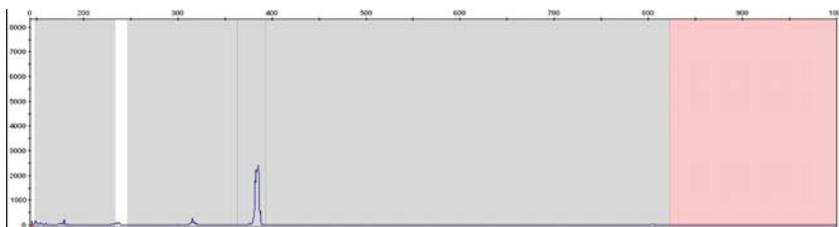
Individuo femenino heterocigoto que presenta un alelo normal (N) (42 repetidos CGG) y otro alelo en estado de premutación (PM) (87 repetidos CGG).



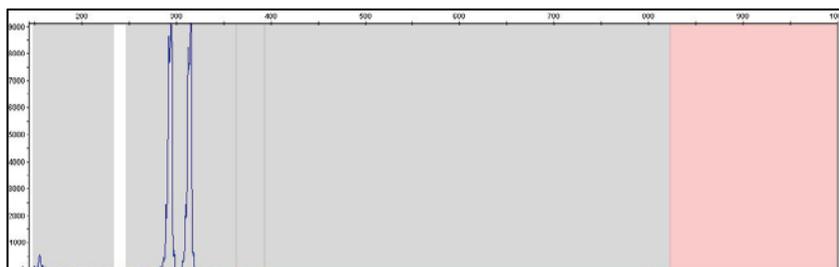
Individuo masculino que presenta un alelo en estado de PM (84 repetidos CGG).



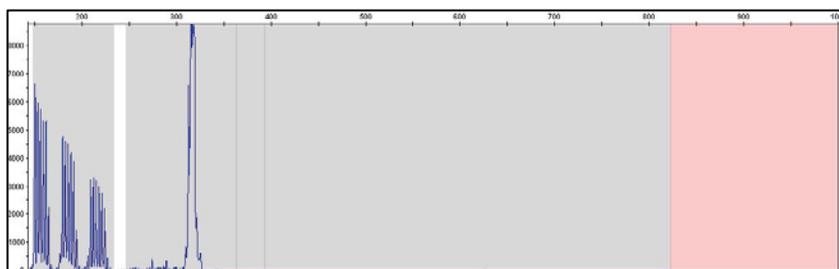
Individuo masculino que presenta un alelo en rango de zona gris o intermedio (GZ) (49 repetidos CGG).



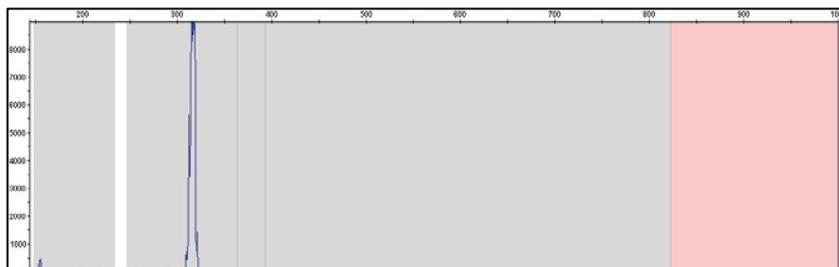
Individuo femenino heterocigoto que presenta ambos alelos en rango N (21 y 30 repetidos CGG respectivamente).



Individuo femenino homocigoto, que presenta ambos alelos en rango N (29 repetidos CGG).



Individuo masculino que presenta un alelo en rango N (29 repetidos CGG).



De un total de 160 cromosomas X analizados, la media de repeticiones del trinucleótido CGG en la región 5'UTR de *FMR1* fue de 33 repetidos (D.E.= 18.5; 19 - 200 repetidos ) similar a lo reportado por la literatura [61].

En cuanto a los 160 alelos, se encontraron 149 en rango normal con una extensión media de 29 repetidos CGG (D.E.=3; 19 -42 ) de los cuales, el 39% presentó 29 repetidos CGG (n=58), 34% de 30 repetidos (n=51) y 4.6% constaba de 22 repetidos CGG (3.5%); los 35 alelos restantes oscilaban entre 19 y 42 repetidos CGG con frecuencias bajas. En cuanto a su longitud, se encontró que el 89.6% (n=95) de los pacientes portaban alelos en rangos

normales y 10.33 (n=11) presentaban expansión, distribuidos de la siguiente manera: 2.8 (n=3) presentaban un alelo en rango de GZ, 6.6% (n=7) en rango de PM y sólo se encontró un paciente (0.9%) portador de un alelo con mutación completa.

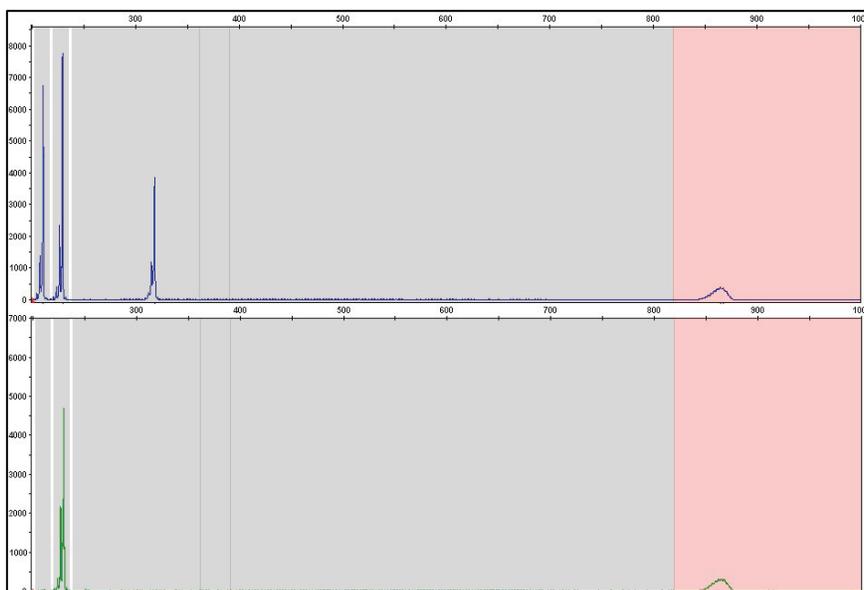
Al analizar la frecuencia del expandido CGG de los 11 alelos de *FMR1* en rangos anormales, éstos presentaban longitudes únicas, por lo que no pudieron determinarse las frecuencias alélicas en GZ, PM y FM. Se observó que la proporción de hombres y mujeres con alteración en *FMR1* tendía al 50%, lo que llama la atención ya que la literatura señala que la proporción de los hombres portadores de alelos en rango de premutación con sintomatología es de 40% y en mujeres sólo ocurre en un 8-16% de las portadoras.

Posteriormente, en los casos que mostraron presentar alelos de *FMR1* en rangos de GZ, PM o FM se realizó la mPCR, obteniendo los electroferogramas respectivos como se muestra a continuación en los siguientes ejemplos:

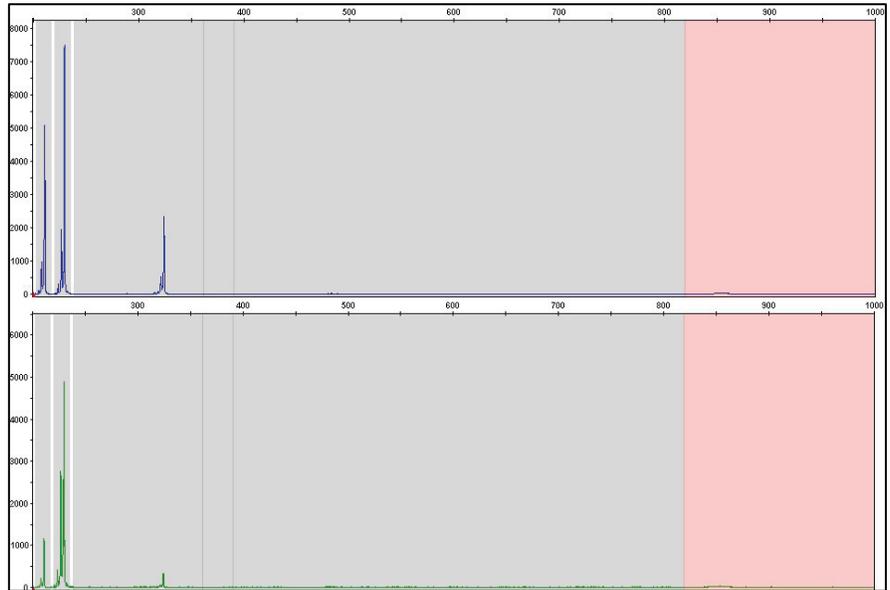
### Descripción

Individuo femenino heterocigoto que presenta un alelo normal (32 repetidos CGG) y otro alelo en rango de FM (>200 repetidos CGG). En el alelo en rango normal se determinó una metilación del 6% y en el de rango de FM de 48%

### Electroferograma



Individuo masculino que presenta un alelo normal (32 repetidos CGG) y una metilación respectiva de 12%



En el cuadro 9 se muestran los casos con alteración de *FMR1*, mostrando la longitud de sus alelos y el porcentaje de metilación en cada caso.

**Cuadro 9.** Características de longitud de alelos de FMR1, % de metilación por sexo

Sexo	# CGG Alelo normal	% Metilación	# CGG Alelo alterado	% Metilación	Estatus
Mujeres	39	29	48	86	INT
	29	28	48	80	INT
	29	41	44	85	INT
	42	78	56	59	PM
	32	6	200	48	MUT
	29	40	87	78	PM
Hombres			124	49	INT*
			92	29	INT*
			56	59	PM*
			52	75	PM
			84	8	PM

#CGG número de repetidos por alelo. Estatus: Rango en que se ubica el alelo anormal de acuerdo al número de repetidos (GZ: Intermedio o zona gris; PM: Premutación; MUT: Mutación completa)

\* Sin seguimiento actual en el INNN"MV5"

En el porcentaje de metilación llama la atención: en el grupo de mujeres, donde la metilación en ambos alelos de FMR1 debería tender al 50%, se puede observar mayor porcentaje de metilación en el alelo expandido (que podría interpretarse como inactivación preferencial del cromosoma X alterado), mientras que, en los hombres, donde el alelo único de *FMR1* debería presentar niveles de metilación muy bajos, presentaba distintos niveles, generalmente mayores a lo esperado, de metilación.

## Comparación de las características clínicas entre los grupos.

### a) Antecedentes familiares.

Se observó que 6.1% (n = 6) de los pacientes sin alteración en *FMR1* presentaban antecedente de consanguinidad, mientras que ningún paciente con FXTAS presentaba este antecedente.

De los antecedentes familiares en primer grado, llamó la atención que el antecedente de diagnóstico de enfermedad de Párkinson, también considerado diagnóstico diferencial de FXTAS, se presentó en el 27.3% (n=3) de los pacientes con expansión en *FMR1* mientras que solo el 5.3% (n = 5) de los pacientes sin alteración en *FMR1* presentaban este antecedente (Prueba exacta de Fisher p = 0.035).

Al extender la descripción familiar a los antecedentes en segundo grado, la presencia de familiares con discapacidad intelectual fue más frecuente en el grupo de pacientes con alteración en *FMR1* observándose en el 27.3% (n = 3) en comparación con el 2.1% (n = 2) de los pacientes sin expandido en *FMR1* que presentaban este antecedente (Prueba exacta de Fisher p = 0.008). Aunque el antecedente de enfermedad de Parkinson en segundo grado perdió la diferencia observada previamente (Prueba exacta de Fisher p = 0.053) se observó que mantenía cierta tendencia en los pacientes con el diagnóstico molecular de FXTAS presentándose en el 18.2% (n = 2) mientras que en los pacientes sin alteración en *FMR* sólo se observó en el 2.1% (n = 2) de los casos.

Tanto en primer como en segundo grado, no se observaron diferencias en cuanto a otros antecedentes familiares, incluyendo otros trastornos del movimiento, alteraciones cognitivas, alteraciones neuropsiquiátricas y alteraciones de fertilidad asociadas a POF1, previamente reportadas como más frecuentes en la genealogía de pacientes con FXTAS.

## **b) Antecedentes personales no patológicos.**

Entre los pacientes que presentaban FXTAS y aquellos en quienes no se demostró alteración en *FMR1* no se observaron diferencias en cuanto al sexo, en el primer caso 45.5% (n=5) pertenecían al sexo masculino y el 54.5% (n=6) al sexo femenino, mientras que en el segundo grupo el 49.5% (n=47) eran hombres y 50.5% (n=48) mujeres.

En cuanto a la edad, en los pacientes con diagnóstico de FXTAS se observó una media de 54.63 años (D.E. = 11.7; 43-76 años) en los 8 pacientes que continuaban en seguimiento, mientras que en los pacientes con alelos normales de *FMR1* con temblor / ataxia la edad media fue de 58.68 AÑOS (D.E. = 9.9; 39-78 años) sin mostrar diferencias.

El estado civil tampoco presentó diferencias. En el caso de grupo de pacientes con FXTAS 36.4% (n=4) no tenían relación de pareja estable mientras que el 63.6% (n=7) mantenía una relación estable y en los pacientes sin alteración en *FMR1*, el 47.4% (n=45) o tenían pareja y el 52.6% (n=50) restante si mantenía una pareja estable.

Respecto a la escolaridad, se observó una media de 13.5 años de estudio (D.E.=4.20; 6-19 años) en el grupo de pacientes con FXTAS y de 9.5 años (D.E.=4.77; 0-16 años) en el grupo de pacientes sin alteración en *FMR1*, siendo esta una diferencia entre ambos grupos ( $p=0.004$ ).

Otros antecedentes personales como la entidad federativa de origen, antecedente de uso de sustancias (mostrado en el cuadro 10), los hábitos de actividad física y sedentarismo, tipo de vivienda, zoonosis, hacinamiento, exposición a pesticidas, insecticidas o solventes orgánicos, no mostraron diferencias entre grupos.

De las mujeres que participaron en el estudio, se registraron las edades de menarca, menopausia, número de gestas, partos, cesáreas y abortos en búsqueda de datos sugestivos de alteraciones reproductivas secundarias a POF1, sin encontrar diferencias entre ambos

grupos, cabe señalar que, al momento de la realización del presente estudio, 3 mujeres aún se encontraban en edad reproductiva y no habían iniciado la menopausia (Cuadro 11).

Ninguna de las mujeres estudiadas presentó POF1 o alteraciones de la fertilidad y sólo una mujer no portadora de alteración en *FMR1* reportó amenorrea secundaria a los 31 años de edad, debida a histerectomía y ooforectomía bilateral indicada por miomatosis uterina complicada con endometriosis.

**Cuadro 10.** Frecuencia de toxicomanías en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Sustancia	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Tabaco	36.8	35	36.4	4	>0.05
Alcohol	28.4	27	54.5	6	>0.05
Inhalantes	2.1	2	9.1	1	>0.05
Cannabinoides	6.3	6	9.1	1	>0.05
Cocaína	2.1	2	9.1	1	>0.05
Otras toxicomanías	1.1	1	9.1	1	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

**Cuadro 11.** Comparación de las características ginecobstétricas en mujeres con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Antecedente Ginecobstétrico	Grupo no FXTAS (n=48)		Grupo FXTAS (n=5)		p*
	Media	D.E. (Rango)	Media	D.E. (Rango)	
Edad de Menarca	12.58	1.648 (9.15)	12.60	0.548 (12-13)	>0.05
Edad de Menopausia*	45.96	4.145 (31-51)	42.40	3.209 (40-48)	>0.05
Número de gestas	2.96	2.798 (0-11)	2.60	1.817 (0-5)	>0.05
Número de partos	2.35	2.662 (0-10)	1.20	1.643 (0-3)	>0.05
Número de cesáreas	0.35	0.729 (0-3)	1.00	1.414 (0-3)	>0.05
Número de abortos	0.25	0.934 (0-6)	0.60	0.894 (0-2)	>0.05

\* 3 pacientes sin alteración en *FMR1* no reportaban inicio de menopausia al momento del estudio.

D.E. Desviación Estándar

### c) Cuadro clínico.

La edad de inicio en ambos grupos fue similar, siendo de 47 años (D.E.=10.9 ; 30-63 años) para los pacientes con FXTAS y de 46.18 años (D.E.=8.48; 30-67 años) para los pacientes sin alteración en *FMR1*. El tiempo de evolución también fue similar en los dos grupos, reportándose de 8.38 años (D.E.=5.9; 1-17 años) en los pacientes con FXTAS (exceptuando 3 casos donde no se conoce el estado actual) y de 12.5 años (D.E.=8.65; 1-34 años) en quienes no presentaron alteración en *FMR1*.

Ningún paciente presentó malformaciones congénitas que pudieran asociarse a otras entidades clínicas sindrómicas que explicaran la sintomatología de los pacientes.

Las características oftalmológicas analizadas no mostraron diferencias en cuanto a los grupos (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Frecuencia de alteraciones oftalmológicas en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Alteración Oftalmológica	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Ceguera	7.4	7	0	0	>0.05
Alteración de nervio óptico	11.6	11	0	0	>0.05
Retinosis pigmentaria	2.1	1	0	0	>0.05
Alteración de campo visual / escotoma	7.4	7	9.1	1	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

Al comparar las características clínicas cerebelosas no se observaron diferencias entre grupos (Cuadro 13), aunque la frecuencia individual de cada una fue muy alta en ambos grupos y la ataxia se encontró presente en todos los casos, se sobrentiende ya que fue uno de los criterios de inclusión para el presente estudio. El temblor cerebeloso fue analizado por separado junto con otros tipos de temblor.

**Cuadro 13.** Frecuencia de alteraciones cerebelosas en pacientes con Temblor/ ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Alteración Cerebelosa	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Dismetría	11.6	11	0	0	>0.05
Disdiadococinesia	20	19	36.4	4	>0.05
Nistagmo	55.8	53	36.4	4	>0.05
Sacadas lentas	36.8	35	18.2	2	>0.05
Disartria	71.6	68	45.5	5	>0.05
Ataxia de la marcha	100	95	100	11	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

Las características del síndrome parkinsonico observadas en cada grupo se muestran a continuación (Cuadro 14), llama la atención que el signo de Romberg positivo fue más frecuente en los pacientes con FXTAS, sin embargo otras características no mostraron diferencia y sólo se integró síndrome parkinsonico en 31 pacientes (4 pacientes con FXTAS y 27 sin alteración en *FMR1*), el temblor de reposo o parkinsonico se analizó por separado junto con otros tipos de temblor.

Los datos piramidales o de neurona motora superior registrados en la exploración física fueron muy frecuentes en ambos grupos, sin embargo, no mostraron diferencias, como se muestra en el Cuadro 15.

Los datos extrapiramidales o de neurona motora inferior fueron menos frecuentes que los datos de neurona motora superior, y al igual que éstos, no mostraron diferencias entre grupos (Cuadro 16)

En cuanto al temblor, se analizaron en un apartado específico todos los tipos de temblor, ya que es un dato cardinal en el diagnóstico de FXTAS; cabe mencionar que varios pacientes presentaban más de un tipo de temblor de acuerdo a la valoración realizada por el médico especialista en movimientos anormales y el más frecuente era el tipo parkinsónico o de reposo, como se muestra en el Cuadro 17.

**Cuadro 14.** Frecuencia de signos de parkinsonismo en pacientes con Temblor/ ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Signo parkinsónico	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Rigidez muscular	28.4	27	36.4	4	>0.05
Bradicinecia	78.9	75	54.5	6	>0.05
Romberg positivo	31.6	30	63.6	7	<b>0.047</b>
Alteración de la voz	30.5	29	18.2	2	>0.05
Micrografismo	66.3	66	63.6	7	>0.05
Sx Parkinsónico	28.4	27	36.4	4	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

**Cuadro 15.** Frecuencia de datos piramidales o de neurona motora superior en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Signo piramidal	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Debilidad muscular	8.4	8	27.3	3	>0.05
Parálisis o alteración motora	9.5	9	0	0	>0.05
Espasticidad	26.3	25	45.5	5	>0.05
Hiperreflexia	70.5	67	72.7	8	>0.05
Babinski	17.9	17	9.1	1	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

**Cuadro 16.** Frecuencia de datos extapiramidales o de neurona motora inferior en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Signo de neurona motora inferior	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Atrofia muscular	8.4	8	27.3	3	>0.05
Hipotonía	31.6	30	27.3	3	>0.05
Fasciculaciones	22.1	21	36.4	7	>0.05
Hiporreflexia	5.3	5	9.1	1	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

**Cuadro 17.** Frecuencia de tipos de temblor en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Temblor	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Temblor de intención	20	19	36.4	4	>0.05
Temblor de reposo	70.5	67	63.3	7	>0.05
Temblor fino distal	27.4	26	54.5	6	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

Finalmente, dentro de las características clínicas se recabaron los diagnósticos psiquiátricos que presentaban los pacientes y se comparó entre grupos, individualmente no se observaron diferencias por diagnósticos, sin embargo, la frecuencia combinada fue mayor en los pacientes con FXTAS que en los pacientes con temblor / ataxia sin alteración de *FMR1* como se muestra en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Frecuencia de alteraciones psiquiátricas en pacientes con Temblor/ ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Diagnóstico	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Trastorno depresivo	36.8	35	45.5	5	>0.05
Trastorno de ansiedad	14.7	14	36.4	4	>0.05
Trastorno obsesivo compulsivo	5.3	5	0	0	>0.05
Trastorno afectivo bipolar	0	0	9.1	1	>0.05
Diagnóstico psiquiátrico	56.8	54	90.9	10	<b>0.025</b>

\* Prueba exacta de Fisher

d) Características radiológicas y electrofisiológicas.

A todos los pacientes se les realizó velocidades de conducción nerviosa y potenciales evocados somatosensoriales como mínimo en búsqueda de alteraciones neuropáticas, al analizar la frecuencia de los hallazgos electrofisiológicos, no se encontraron diferencias entre los grupos (Cuadro 19), sin embargo, llama la atención su alta frecuencia, presentándose en el 72.8% (n=8) pacientes con FXTAS y 53.6% (n=51) de los pacientes sin alteración en *FMR1* (p>0.05).

**Cuadro 19.** Frecuencia de alteraciones electrofisiológicas en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Diagnóstico	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p*
	%	(n)	%	(n)	
Neuropatía sensitiva**	6.3	6	9.1	1	>0.05
Neuropatía motora	10.5	10	18.2	2	>0.05
Neuropatía mixta	9.5	9	18.2	2	>0.05
Alteraciones propioceptivas***	26.3	25	27.3	3	>0.05

\* Prueba exacta de Fisher

\*\* Demostrado en estudio de electrofisiología

\*\*\*Referidas en exploración física.

En cuanto a los hallazgos en IRM, se analizaron las secuencias de T1, T2 y Flair en todos los pacientes, y los hallazgos fueron corroborados por un médico especialista en imagenología del servicio de Resonancia Magnética del INNN “MVS”. Llama la atención que no se encontró un patrón de lesiones propio de los pacientes con FXTAS, y el signo del pedúnculo cerebeloso medio (MPC) referido previamente como hallazgo característico, solo se encontró en un paciente (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Frecuencia de hallazgos por IRM en pacientes con Temblor/ataxia de etiología desconocida y secundaria a FXTAS.

Hallazgo en IRM	Grupo no FXTAS (n=95)		Grupo FXTAS (n=11)		p**
	%	(n)	%	(n)	
Atrofia Cortical	45.3	43	45.5	5	>0.05
Atrofia Subcortical	21.1	20	18.2	2	>0.05
Lesiones aisladas en sustancia blanca	9.5	9	9.1	1	>0.05
>4 lesiones en sustancia blanca	8.4	8	18.2	2	>0.05
Atrofia de Cerebelo	71.6	68	54.5	6	>0.05
Hiperintensidad en pedúnculo cerebeloso medio (Signo MPC)	0	0	9.1	1	>0.05
Hiperintensidades en sustancia blanca cerebelosa	9.5	9	0	0	>0.05
Lesiones de la sustancia blanca en el esplenio del cuerpo caloso	0	0	0	0	‡

IRM Imagen por resonancia magnética (Secuencias T1, T2 y Flair)

\* Prueba exacta de Fisher

‡ No se realizó prueba estadística ya que es una constante en la muestra

## **Descripción de la muestra bajo los Criterios Diagnósticos de FXTAS.**

La distribución de los pacientes de acuerdo a las categorías de los Criterios Diagnósticos correspondientes, mostró que un paciente cumplió los criterios para denominarse caso definitivo (0.9%), 21.7% de los pacientes presentaban características para integrarse al grupo de casos probables (n = 23), el 34.9% (n = 37) para denominarse casos posibles y el 42.5% (n=45) restante como improbables.

Al comparar ambos grupos, sólo se observó que el deterioro cognitivo se presentaba en el 36.4% (n=4) de los pacientes con FXTAS mientras que solo se presentó en el 7.4% (n=7) de aquellos que no presentaron alteración en *FMR1* (p=0.015), los demás criterios clínicos y radiológicos no presentaron diferencias entre los grupos de estudio (cuadro 21).

Cuadro 21. Hallazgos en la muestra de pacientes con temblor/ataxia y alteración en FMR1.respecto a los criterios diagnósticos.

Evaluación	Calase	Criterio	Grupo		p*
			FXTAS (n=11)	No FXTAS (n=95)	
Clínica	Mayor	Temblor de intención	36.4% (4)	20% (19)	0.190
		Ataxia de la marcha	100% (11)	100% (95)	‡
	Menor	Parkinsonismo	36.4% (4)	28.4% (27)	0.407
		Neuropatía	45.5% (5)	26.3% (25)	0.163
		<b>Alteraciones en funciones ejecutivas</b>	<b>36.4% (4)</b>	<b>7.4% (7)</b>	<b>0.015</b>
		Déficit moderado a severo en memoria a corto plazo	0% 0	4.2% (4)	0.641
Radiológica	Mayor	Lesiones en pedúnculo cerebelar medioy/ o tallo cerebral	9.1% (1)	0% 0	0.104
		Lesiones de la sustancia blanca en el esplenio del cuerpo caloso	0% 0	0% 0	‡
	Menor	Lesiones en sustancia blanca cerebral	18.2% (2)	8.4% 8	0.277
		Atrofia generalizada moderada a severa	45.5% (5)	42.1% (40)	0.538

\* Prueba Exacta de Fisher

‡ No se calculó prueba estadística ya que es una constante

## **Criterios Diagnósticos de FXTAS en pacientes con expansión en *FMR1*.**

Posteriormente se compararon las categorías diagnósticas de los casos positivos para alteración en *FMR1* con los Criterios Diagnósticos [44, 87], observándose que el índice de sospecha de la enfermedad sería bajo en la mayoría de los casos, incluso, en cuatro de los 11 casos diagnosticados, no se cumplieron los criterios necesarios para considerar FXTAS como posible diagnóstico diferencial (Cuadro 22). Debe considerarse que, en este estudio, todos los pacientes presentaban ataxia, mientras que el temblor de intención solo se presentó en 4 pacientes con expansión en *FMR1*, aclarando que los demás presentaban tipos diferentes de temblor, como temblor de reposo, temblor postural y temblor cerebeloso. Sólo un caso presentó diagnóstico clínico definitivo de FXTAS y se corroboró por estudio molecular (caso 11), tres pacientes presentaron expansión en GZ y mientras uno no presentaba criterios clínicos para sospechar FXTAS (caso 4) los otros dos presentaban diagnóstico clínico probable y posible (casos 6 y 7 respectivamente) llamó la atención un caso que no presentaba criterios diagnósticos, pero por estudio molecular, se corroboró como portador de mutación completa (caso 9).

Cuadro 22. Hallazgos en la muestra de pacientes con temblor/ataxia y alteración en FMR1 respecto a los Criterios Diagnósticos de FXTAS

Evaluación	Calase	Criterio	Caso										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Molecular		Número de repetidos CGG	124	48	92	48	56	52	44	56	>200	87	84
		Estatus	PM	P M	P M	G Z	P M	G Z	G Z	P M	FM	P M	P M
Clínica	Mayor	Temblor de intención		X			X	X				X	
		Ataxia de la marcha	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Menor	Parkinsonismo					X		X			X	X
		Neuropatía	X	X						X	X		X
		<b>Alteraciones en funciones ejecutivas</b>	X						X	X			X
		Déficit moderado a severo en memoria a corto plazo											
Radiológica	Mayor	Lesiones en pedúnculo cerebelar mediod/ o tallo cerebral											X
		Lesiones de la sustancia blanca en el esplenio del cuerpo caloso											
	Menor	Lesiones en sustancia blanca cerebral	X						X				
		Atrofia generalizada moderada a severa	X				X	X				X	X
<b>Categoría diagnóstica</b>			Po	Pr	Ip	Ip	Pr	Pr	Po	Ip	Ip	Pr	D

Definitivo (D) \* Un criterio clínico mayor + Un criterio radiológico mayor

Probable (Pr) \* Un criterio radiológico mayor + Un criterio clínico menor  
\* Dos criterios clínicos mayores

Posible (Po) \* Un criterio clínico mayor + un criterio radiológico menor

Improbable (Ip) \* Ausencia de los criterios para denominarlo definitivo, probable o posible

GZ: Zona Gris (41-54 repetidos); PM: Premutación (155-199 repetidos); FM: Mutación completa (>200 repetidos)

## **Evaluación de los Criterios Diagnósticos de FXTAS.**

Dados los resultados previos, y como parte de los objetivos del presente estudio, se evaluaron los Criterios Diagnósticos mediante evaluación de prueba diagnóstica de múltiples categorías empleando el método de Puntos de Wilson y curva ROC, para establecer su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y precisión diagnóstica (PD) empleando el diagnóstico molecular como estándar de oro.

Se agrupó a los pacientes en dos categorías, quienes no se esperaba que presentaran alteración en *FMR1* ya que clínicamente fueron catalogados como casos improbables, considerando que no ameritarían tamizaje molecular de *FMR1*, y quienes previamente fueron catalogados como casos posibles, probables o definitivos de FXTAS, calificados como candidatos para el tamizaje molecular.

Los resultados observados, así como las respectivas curvas de sensibilidad, especificidad y la curva ROC se muestran a continuación. (Cuadro 23; Figuras 23 y 24).

La precisión diagnóstica de los criterios de Jacquemont es baja, de acuerdo al área bajo la curva obtenida en las Curvas ROC, siendo esta precisión menor al 50%. De igual forma, los valores de sensibilidad y especificidad fueron inadecuados para la identificación del diagnóstico de FXTAS entre los pacientes de la muestra evaluada.

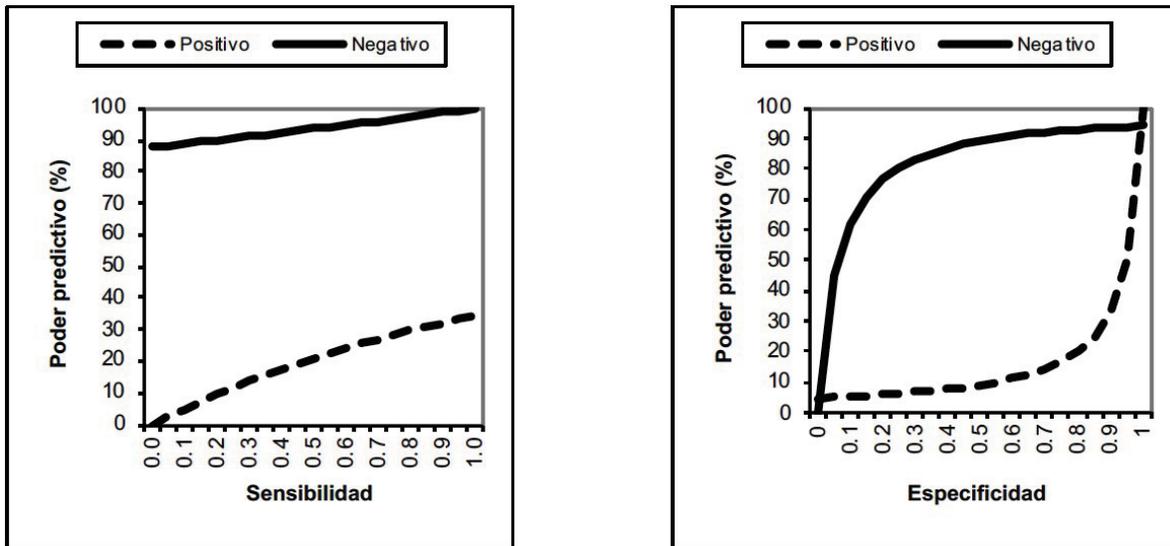
**Cuadro 23.** Evaluación de los Criterios Diagnósticos de FXTAS como indicación para prueba de tamizaje molecular de FMR1\*.

Diagnóstico Molecular de <i>FMR1</i>					Evaluación de Prueba Diagnóstica (Puntos de Wilson)	
Positivo		Negativo			Sensibilidad (I.C. 95%)	36.36% (D.E. 15.17-64.62)
%	n (11)	%	n (95)		Especificidad (I.C. 95%)	43.16% (D.E. 33.66-53.19)
Requiere tamizaje	36.4%	4	56.8%	54	VPP (I.C. 95%)	6.897% (D.E. 2.714-16.43)
No requiere Tamizaje	63.6%	7	43.2%	41	VPN (I.C. 95%)	85.42% (D.E. 72.83-92.75)
					PD (I.C. 95%)	42.45% D.E. (33.47-51.96)

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; PD: Presición Diagnóstica  
 Requiere tamizaje: Pacientes con diagnóstico clínico Definitivo (Presencia de un signo radiológico mayor y un criterio clínico mayor), Probable (Presencia de un signo radiológico mayor y un criterio clínico menor o presencia de dos criterios clínicos mayores) y Posible (Presencia de un signo radiológico menor y un criterio clínico mayor) de acuerdo a los Criterios Diagnósticos de FXTAS.

No requiere tamizaje: Paciente que no presenta criterios radiológicos ni criterio clínicos de acuerdo a los Criterios Diagnósticos de FXTAS.

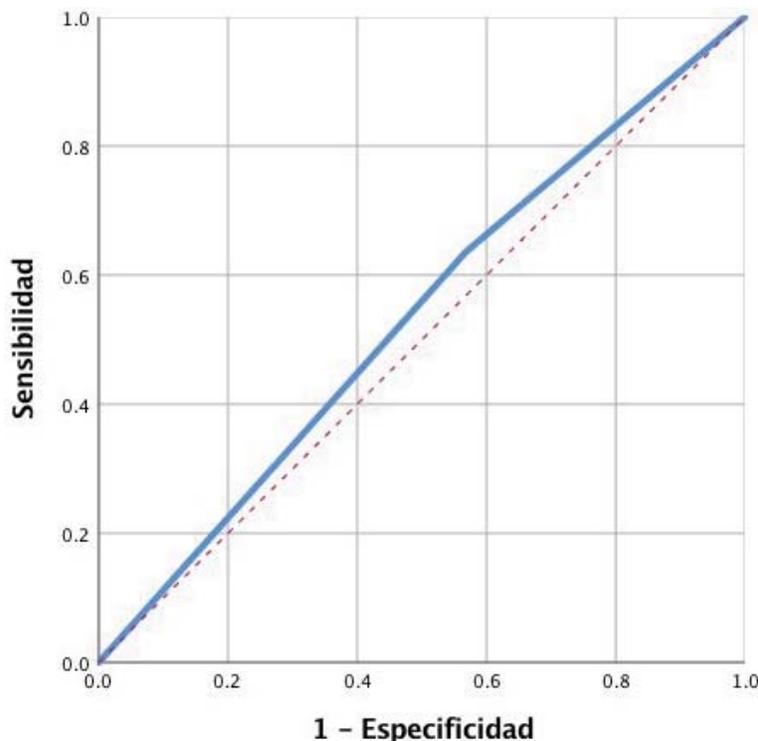
\*p = 0.069 (prueba exacta de Fisher)



**Figura 22.** Gráficos de sensibilidad y especificidad de los Criterios diagnósticos de FXTAS, aplicados como parámetro para tamizaje molecular del expandido CGG de *FMR1* para el diagnóstico de FXTAS.

Estudio de *FMR1* positivo con >40 repetidos CGG (Punteada)

Estudio de *FMR1* negativo con número de repetidos CGG en rango normal (Continúa)



**Figura 23.** Curva ROC (azul) de los Criterios Diagnósticos de FXTAS aplicados como criterio para tamizaje molecular y hallazgos por estudio molecular de *FMR1*.

Área bajo la curva = 0.534 Desviación = 0.091 I.C 95%. 0.355 - 0.731)  $p = 0.713$

## Discusión

El objetivo del presente estudio fue describir las manifestaciones clínicas y radiológicas en pacientes mexicanos con temblor/ataxia con expandido CGG de *FMR1* en zona gris y de permutación.

Aunque se conoce que la mayor parte de las características sociodemográficas no afectan en la incidencia, prevalencia y manifestaciones de las enfermedades hereditarias, comprobándose que no había diferencias entre los grupos al respecto; la exposición ambiental y laboral a insecticidas, pesticidas y solventes no presentó diferencias en los grupos, apoyando la etiología probablemente genética de los síntomas.

Si bien las toxicomanías pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, los patrones de consumo de sustancias en ambos grupos resultó muy similar a lo reportado por la encuesta nacional de consumo de drogas, alcohol y tabaco ENCODAT 2016-2017 [88].

Se encontró que la proporción de pacientes con FXTAS, corroborado por estudio molecular, sobrepasó al 5% esperado de acuerdo a las series realizadas previamente [47, 74, 75], encontrando un 10.4% (correspondiente a 11 casos de los 106 analizados).

La mayor proporción de pacientes con FXTAS puede atribuirse, en parte, al diseño de la muestra, ya que fueron seleccionados sólo los casos con patrón de herencia esporádica o bien sugestiva de herencia ligada al cromosoma X, así como sólo los considerados de inicio tardío (a partir de los 30 años de edad), con el objeto de disminuir la posibilidad de incluir casos autosómicos dominantes o autosómicos recesivos, y al hecho de que la genoteca de ataxias del Departamento de Genética del INNN "MVS" se inició en 1993, constituyendo un acervo de material genético e información clínica de pacientes con ataxia que comprende casi 25 años.

No puede dejarse de lado que existen sesgos importantes, como el de atención, ya

que el 52,8% de los pacientes radicaban en la Ciudad de México y zona conurbada y por las características de la población a la que están dirigidos los servicios de los Instituto Nacionales de Salud, ninguno de los participantes contaba con seguridad social (IMSS, ISSSTE, CEDENA o similares) por lo que estos sectores no se encuentran considerados en el presente estudio y no permiten establecer cálculos de la incidencia y prevalencia de esta patología en nuestro país, sin embargo, los resultados obtenidos pueden interpretarse como indicador de que no es una patología rara ni ajena a la práctica médica diaria, especialmente en centros especializados de neurología donde debería ser considerada como diagnóstico diferencial en los pacientes con movimientos involuntarios, específicamente en pacientes con ataxia. Estos sesgos pudieran también contribuir al hecho de que la proporción de pacientes con FXTAS masculinos y femeninos se aproximó al 50% contrario a lo esperado donde la literatura clásicamente describe que hasta el 40% de los portadores de alelos alterados de *FMR1* presentan dicha sintomatología en comparación con un 8-16% de las mujeres [54, 55, 58]

Al comparar las distintas características demográficas, sociales clínicas y radiológicas, tanto en los pacientes con FXTAS como en los pacientes con temblor/ataxia de etiología no determinada, se observó una distribución muy similar, lo que ocurrió de igual manera al analizar las características de los pacientes con FXTAS portadores de alelos en rangos intermedios o de zona gris, alelos en premutación y alelos en rango de mutación completa.

Dentro de las características que podrían alertar para el diagnóstico de FXAS en los pacientes con cuadro clínico de Temblor/Ataxia se encuentran los antecedentes familiares de probable enfermedad de Parkinson, antecedentes de discapacidad intelectual, así como un cuadro clínico complicado con déficit de memoria moderado o severo. Sin embargo, no fue posible establecer un perfil propio de los pacientes con expansión en *FMR1*.

Aunque la muestra de pacientes con diagnóstico de FXTAS es pequeña para establecer un cuadro clínico específico de esta patología, nuestros hallazgos sugieren que el cuadro clínico podría definirse más como un espectro, donde en un extremo se encuentran los casos severos, representados por el cuadro clínico de XFS y autismo, pasando por cuadros moderados, representados por FXTAS, a cuadros de parkinsonismo y alteraciones

ejecutivas hasta el otro extremo donde existen manifestaciones leves que podrían pasar inadvertidas o bien la falta de penetrancia, llama la atención la alta frecuencia de alteraciones psiquiátricas que presentan los pacientes, dato reportado previamente, aunque no se encontró una patología específica o más frecuente de este grupo de pacientes [54, 89, 90].

La neuropatía es un dato frecuente en los pacientes neurológicos adultos, especialmente en los pacientes con ataxia, tanto en el grupo de las SCAs, FRDA y en FXTAS, como se observó en los resultados obtenidos, por lo que es necesario conocer más el componente electrofisiológico de estas patologías con el fin de aumentar su utilidad diagnóstica en el abordaje de las ataxias [91-93].

No se encontraron casos de alteración en la fertilidad o POF1 en las mujeres afectadas, sin embargo, no puede negarse su asociación debido a la abrumadora evidencia que existe al respecto en la literatura [33, 46, 94].

Un hallazgo importante que llamó la atención fue que al comparar ambos grupos empleando los criterios clínicos para el diagnóstico de FXTAS propuestos por Jacquemont y cols [44, 55] posteriormente reformados por Brich y cols en 2017 [50], no fue posible diferenciar entre quienes mostraron un alelo expandido de *FMR1* y quienes no presentaban alteraciones en este gen, mostrando una sensibilidad y especificidad muy bajas que, en esta serie de pacientes mostraron no ser de utilidad diagnóstica o como herramienta de tamizaje para elegir a los pacientes candidatos a estudio molecular de *FMR1*.

La gran heterogeneidad en las características clínicas de los pacientes con alteraciones en *FMR1* pueden explicarse en parte a lo descrito previamente en cuanto a la fisiopatología del gen, ya que se ha descrito que el expandido CGG aumenta la metilación del mismo, disminuyendo la transcripción normal del gen y por tanto la función de FMRP, sin embargo, también contribuye a la disregulación del mismo, ocasionando transcripción RAN así como producción de proteína disfuncional que lleva a agregados intracitoplasmáticos y secuestro de proteínas asociadas [37, 95], por lo que se esperaría que el cuadro clínico no estuviera definido simplemente por la longitud del repetido CGG de *FMR1*, sino también por

sus niveles de metilación, los mosaicismos asociados a este tipo de mutación [39, 40] y la posible participación de genes modificadores [96, 97]

## Conclusiones

1. En la muestra analizada se demuestra la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de FXTAS y la similitud que presenta con otros cuadros de temblor/ataxia, apoyando el postulado que señala que posiblemente se trate de un amplio espectro de manifestaciones y no de una patología única bien definida.
2. De acuerdo a los resultados presentes, el diagnóstico de FXTAS deberá tomarse en cuenta como diagnóstico diferencial en todos los casos de temblor/ataxia de etiología desconocida cuando se hallan descartado las causas más frecuentes.
3. Los hallazgos obtenidos en este estudio no demuestran utilidad de los Criterios Diagnósticos de en la práctica clínica como criterios diagnósticos o de tamizaje para FXTAS.
4. Es necesario realizar estudios epidemiológicos con diseños metodológicos específicos para determinar la incidencia y prevalencia de FXTAS en la población mexicana, así como de las patologías relacionadas a expansiones en *FMR1* (POF1 y FXS).
5. Considerando los sesgos propios de la muestra analizada y el número de sujetos con FXTAS diagnosticados por estudio molecular, es necesario aumentar el tamaño la muestra con el fin de definir las características clínicas del espectro de esta enfermedad y su frecuencia para establecer mejores criterios que permitan optimizar los esfuerzos para el diagnóstico de FXTAS y sus patologías asociadas en la población mexicana.

## Bibliografia

1. Verkerk, A.J., et al., Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 905-14.
2. Eichler, E.E., et al., Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*, 1993. **2**(8): p. 1147-53.
3. Dolzhanskaya, N., G. Merz, and R.B. Denman, Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry*, 2006. **45**(34): p. 10385-93.
4. O'Donnell, W.T. and S.T. Warren, A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci*, 2002. **25**: p. 315-38.
5. Santoro, M.R., S.M. Bray, and S.T. Warren, Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol*, 2012. **7**: p. 219-45.
6. Capelli, L.P., et al., The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). *Arq Neuropsiquiatr*, 2010. **68**(5): p. 791-8.
7. Hall, D.A. and A. O'Keefe J, Fragile x-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 2012. **2**: p. <http://tremorjournal.org/article/view/56>.
8. Lozano, R., C.A. Rosero, and R.J. Hagerman, *Fragile X spectrum disorders*. *Intractable Rare Dis Res*, 2014. **3**(4): p. 134-46.
9. Jin, P. and S.T. Warren, Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(6): p. 901-8.
10. Bowater, R.P. and R.D. Wells, The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2001. **66**: p. 159-202.
11. Lokanga, R.A., et al., Somatic expansion in mouse and human carriers of fragile X premutation alleles. *Hum Mutat*, 2013. **34**(1): p. 157-66.
12. Mulvihill, D.J., et al., Effect of CAT or AGG interruptions and CpG methylation on nucleosome assembly upon trinucleotide repeats on spinocerebellar ataxia, type 1 and fragile X syndrome. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4498-503.
13. Lenzmeier, B.A. and C.H. Freudenreich, Trinucleotide repeat instability: a hairpin curve at the crossroads of replication, recombination, and repair. *Cytogenet Genome Res*, 2003. **100**(1-4): p. 7-24.
14. Terracciano, A., et al., Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet*, 2004. **12**(4): p. 333-6.
15. Nolin, S.L., et al., Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet A*, 2013. **161A**(4): p. 771-8.
16. Ashley, C.T., et al., Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet*, 1993. **4**(3): p. 244-51.
17. Jin, P., R.S. Alisch, and S.T. Warren, RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(11): p. 1048-53.
18. Khandjian, E.W., Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein. *Biochem Cell Biol*, 1999. **77**(4): p. 331-42.
19. Siomi, M.C., et al., FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J*, 1995. **14**(11): p. 2401-8.
20. Zhang, Y., et al., The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J*, 1995. **14**(21): p. 5358-66.
21. Bardoni, B. and J.L. Mandel, Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev*, 2002. **12**(3): p. 284-93.
22. Eberhart, D.E., et al., The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(8): p. 1083-91.
23. Huber, K.M., et al., Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7746-50.

24. Rousseau, F., et al., Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*, 1995. **57**(5): p. 1006-18.
25. Lieb-Lundell, C.C., Three Faces of Fragile X. *Phys Ther*, 2016. **96**(11): p. 1782-1790.
26. Raspa, M., A.C. Wheeler, and C. Riley, Public Health Literature Review of Fragile X Syndrome. *Pediatrics*, 2017. **139**(Suppl 3): p. S153-S171.
27. Tassone, F., et al., Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *J Med Genet*, 2004. **41**(4): p. e43.
28. de Graaff, E., et al., Instability of the CGG repeat and expression of the FMR1 protein in a male fragile X patient with a lung tumor. *Am J Hum Genet*, 1995. **57**(3): p. 609-18.
29. Kumari, D. and K. Usdin, Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha -Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. *J Biol Chem*, 2001. **276**(6): p. 4357-64.
30. Tassone, F., et al., Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 2000. **97**(3): p. 195-203.
31. Pretto, D.I., et al., Intranuclear inclusions in a fragile X mosaic male. *Transl Neurodegener*, 2013. **2**(1): p. 10.
32. Tassone, F., et al., Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet*, 2000. **66**(1): p. 6-15.
33. Allen, E.G., et al., A study of the distributional characteristics of FMR1 transcript levels in 238 individuals. *Hum Genet*, 2004. **114**(5): p. 439-47.
34. Kenneson, A., et al., Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(14): p. 1449-54.
35. Feng, Y., et al., Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science*, 1995. **268**(5211): p. 731-4.
36. Beilina, A., et al., Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(5): p. 543-9.
37. Green, K.M., A.E. Linsalata, and P.K. Todd, *RAN translation-What makes it run?* *Brain Res*, 2016. **1647**: p. 30-42.
38. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), november 2017. World Wide Web URL: <https://omim.org/>.
39. Jiraanont, P., et al., Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(11): p. 1023-1032.
40. Rajaratnam, A., et al., Fragile X syndrome and fragile X-associated disorders. *F1000Res*, 2017. **6**: p. 2112.
41. Huang, W., et al., Correlation between FMR1 expression and clinical phenotype in discordant dichorionic-diamniotic monozygotic twin sisters with the fragile X mutation. *J Med Genet*, 2014. **51**(3): p. 159-64.
42. Oostra, B.A. and R. Willemsen, *FMR1: a gene with three faces*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(6): p. 467-77.
43. Saul, R. and J. Tarleton, FMR1-Related Disorders. 1998 Jun 16 [Updated 2012 Apr 26]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>. 2017.
44. Jacquemont, S., et al., Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(4): p. 869-78.
45. Mattison, D.R., et al., Familial premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*, 1984. **36**(6): p. 1341-8.

46. Bretherick, K.L., M.R. Fluker, and W.P. Robinson, FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet*, 2005. **117**(4): p. 376-82.
47. Hagerman, R. and P. Hagerman, Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol*, 2013. **12**(8): p. 786-98.
48. Hagerman, R.J., et al., Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*, 2001. **57**(1): p. 127-30.
49. Munoz, D.G., Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*, 2002. **58**(6): p. 987; author reply 987-8.
50. Birch, R.C., J. Cohen, and J.N. Trollor, Fragile X-associated disorders: Don't miss them. *Aust Fam Physician*, 2017. **46**(7): p. 487-491.
51. Hwang, Y.T., et al., Partially methylated alleles, microdeletion, and tissue mosaicism in a fragile X male with tremor and ataxia at 30 years of age: A case report. *Am J Med Genet A*, 2016.
52. Hwang, Y.T., et al., Molecular Inconsistencies in a Fragile X Male with Early Onset Ataxia. *Genes (Basel)*, 2016. **7**(9).
53. Apartis, E., et al., FXTAS: new insights and the need for revised diagnostic criteria. *Neurology*, 2012. **79**(18): p. 1898-907.
54. Hall, D.A., et al., *Emerging topics in FXTAS*. *J Neurodev Disord*, 2014. **6**(1): p. 31.
55. Jacquemont, S., et al., Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA*, 2004. **291**(4): p. 460-9.
56. Jacquemont, S., et al., Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol*, 2007. **6**(1): p. 45-55.
57. Brown, S.S. and A.C. Stanfield, Fragile X premutation carriers: A systematic review of neuroimaging findings. *J Neurol Sci*, 2015. **352**(1-2): p. 19-28.
58. Juncos, J.L., et al., New clinical findings in the fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS). *Neurogenetics*, 2011. **12**(2): p. 123-35.
59. Louis, E.D., *Diagnosis and Management of Tremor*. *Continuum (Minneap Minn)*, 2016. **22**(4 Movement Disorders): p. 1143-58.
60. Capelli, L.P., et al., Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: intrafamilial variability and the size of the FMR1 premutation CGG repeat. *Mov Disord*, 2007. **22**(6): p. 866-70.
61. Rosales-Reynoso, M.A., et al., Genetic diversity at the FMR1 locus in Mexican population. *Arch Med Res*, 2005. **36**(4): p. 412-7.
62. Ashizawa, T. and G. Xia, *Ataxia*. *Continuum (Minneap Minn)*, 2016. **22**(4 Movement Disorders): p. 1208-26.
63. Ure, R.J., et al., Unusual tremor syndromes: know in order to recognise. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2016. **87**(11): p. 1191-1203.
64. Gironell, A. and J. Marin-Lahoz, [The essence of essential tremor: neurochemical bases]. *Rev Neurol*, 2016. **62**(11): p. 507-15.
65. Elble, R.J., The essential tremor syndromes. *Curr Opin Neurol*, 2016. **29**(4): p. 507-12.
66. Alonso, E., et al., Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord*, 2007. **22**(7): p. 1050-3.
67. Klockgether, T., Sporadic ataxia with adult onset: classification and diagnostic criteria. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(1): p. 94-104.
68. Jayadev, S. and T.D. Bird, *Hereditary ataxias: overview*. *Genet Med*, 2013. **15**(9): p. 673-83.
69. Grant, R. and F. Graus, Paraneoplastic movement disorders. *Mov Disord*, 2009. **24**(12): p. 1715-24.
70. van Gaalen, J., P. Giunti, and B.P. van de Warrenburg, *Movement disorders in spinocerebellar ataxias*. *Mov Disord*, 2011. **26**(5): p. 792-800.
71. Ruano, L., et al., The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 2014. **42**(3): p. 174-83.

72. Garcia-Velazquez, L.E., et al., Founder effect and ancestral origin of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) mutation in Mexican families. *Neurogenetics*, 2014. **15**(1): p. 13-7.
73. Magana, J.J., et al., Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet*, 2014. **85**(2): p. 159-65.
74. Seixas, A.I., et al., FXTAS, SCA10, and SCA17 in American patients with movement disorders. *Am J Med Genet A*, 2005. **136**(1): p. 87-9.
75. Hall, D.A., et al., Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology*, 2005. **65**(2): p. 299-301.
76. Rasmussen, A., et al., Clinical and genetic analysis of four Mexican families with spinocerebellar ataxia type 10. *Ann Neurol*, 2001. **50**(2): p. 234-9.
77. World Medical, A., World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 2013. **310**(20): p. 2191-4.
78. Annexe 2. WMA Declaration of Taipei on ethical considerations regarding health databases and biobanks. Adopted by the 53rd WMA General Assembly, Washington, DC, USA, October 2002 and revised by the 67th WMA General Assembly, Taipei, Taiwan, October 2016. *J Int Bioethique Ethique Sci*, 2017. **28**(3): p. 113-117.
79. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(3): p. 1215.
80. Ciotti, P., et al., Triplet repeat primed PCR (TP PCR) in molecular diagnostic testing for Friedreich ataxia. *J Mol Diagn*, 2004. **6**(4): p. 285-9.
81. Seneca, S., et al., Reliable and sensitive detection of fragile X (expanded) alleles in clinical prenatal DNA samples with a fast turnaround time. *J Mol Diagn*, 2012. **14**(6): p. 560-8.
82. Chen, L., et al., An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. *J Mol Diagn*, 2010. **12**(5): p. 589-600.
83. Filipovic-Sadic, S., et al., A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem*, 2010. **56**(3): p. 399-408.
84. Ku, J., Y. Jeon, and J. Park, *Epigenetics Protocols; Methylation-Specific PCR*. 1 ed. Methods in Molecular Biology. Vol. 791. 2004, Totowa, Nueva Jersey, EE. UU.: Humana Press. XII, 304.
85. KEGG ENZYME Database Entry (2.1.1.37) HapII.
86. Grasso, M., et al., A novel methylation PCR that offers standardized determination of FMR1 methylation and CGG repeat length without southern blot analysis. *J Mol Diagn*, 2014. **16**(1): p. 23-31.
87. Berry-Kravis, E., et al., Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. *Mov Disord*, 2007. **22**(14): p. 2018-30, quiz 2140.
88. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública, Comisión Nacional Contra las Adicciones, Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Drogas (ENCODAT). Villatoro-Velázquez JA., Resendiz-Escobar, E., Mujica-Salazar, A., Bretón-Cirett, M., Cañas-Martínez, V., Soto-Hernandez, I., Fregoso-Ito, D., Feliz-Bautista, C., Medina-Mora, ME., Gutiérrez-Reyes, J., Franco-Núñez, A., Romero-Martínez, M. y Mendóza-Alvarado, L. Ciudad de México, México: INPRFM; 2017.
89. Bacalman, S., et al., Psychiatric phenotype of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in males: newly described fronto-subcortical dementia. *J Clin Psychiatry*, 2006. **67**(1): p. 87-94.
90. Bourgeois, J.A., et al., A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. *J Clin Psychiatry*, 2009. **70**(6): p. 852-62.
91. Yadav, R., et al., Electrophysiological evaluation of spinocerebellar ataxias 1, 2 and 3. *J Neurol Sci*, 2012. **312**(1-2): p. 142-5.
92. Liang, L., T. Chen, and Y. Wu, The electrophysiology of spinocerebellar ataxias. *Neurophysiol Clin*, 2016. **46**(1): p. 27-34.
93. Hagerman, R.J., et al., Neuropathy as a presenting feature in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Am J Med Genet A*, 2007. **143A**(19): p. 2256-60.

94. Basehore, M.J. and M.J. Friez, Molecular analysis of Fragile X syndrome. *Curr Protoc Hum Genet*, 2009. **Chapter 9**: p. Unit 9 5.
95. Botta-Orfila, T., G.G. Tartaglia, and A. Michalon, Molecular Pathophysiology of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome and Perspectives for Drug Development. *Cerebellum*, 2016. **15**(5): p. 599-610.
96. Sullivan, S.D., C. Welt, and S. Sherman, FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*, 2011. **29**(4): p. 299-307.
97. Georgieva, D., et al., New X-chromosomal interactors of dFMRP regulate axonal and synaptic morphology of brain neurons in *Drosophila melanogaster*. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2014. **28**(4): p. 697-709.

## **ANEXOS**

I. CARTAS DE APROBACIÓN POR LOS COMITÉS INSTITUCIONALES

II. CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

III. FORMATO DE CAPTURA DE DATOS CLÍNICOS

IV. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

A. Tutoría en tesis de licenciatura.

B. Artículos científicos.

C. Participación en foros de divulgación.

## **ANEXO I: APROBACIÓN POR COMITÉS INSTITUCIONALES**



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
Manuel Velasco Suárez



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D. F. a 3 de Febrero de 2016  
OFICIO N° DIC/012/16

**DR. DAVID JOSÉ DÁVILA ORTÍZ DE MONTELLANO**  
**INVESTIGADOR PRINCIPAL**  
**P R E S E N T E**

La presente es para informarle que su protocolo de investigación No. 118/15 intitulado: "DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA Y CORRELACIÓN CLÍNICA DEL EXPANDIDO CGG DE FMR1 EN PACIENTES MEXICANOS CON ATAXIA", ha sido **APROBADO** por el Comité Científico. No obstante, el desarrollo del protocolo queda sujeto a la aprobación por el Comité de Ética en Investigación.

**ATENTAMENTE**

**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
**DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

X

C.c.p. Dr. Daniel San Juan Orta.- Jefe del Depto. de Investigación Clínica

Insurgentes Sur # 3877 Col. La Fama 14269 México, D.F. Tel. (55) 56063822

[www.innn.salud.gob.mx](http://www.innn.salud.gob.mx)



**Comité de Ética en Investigación**

Dra. Teresa Corona  
Presidenta Ex Officio

Dr. Ricardo Colín Piana  
Presidente

Dra. Helgi Jung Cook  
Vicepresidenta

M. en C. Adriana Ochoa  
Secretaria

**Miembros Honorarios:**

Dr. Antonio Torres Ruiz  
Dr. Fernando Zameño Pohl  
Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela

**Vocales:**

Titular  
Dra. Erika Rivera Durón  
Suplente  
Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Titular  
Dr. Daniel San Juan Orta  
Suplente  
M. en C. Iván Pérez Neri

Titular  
Dra. Mariana Espinoza Nadurille  
Suplente  
Dr. Adolfo Leyva Rendón

Titular  
Dra. Zolita Trujillo de los Santos  
Suplente  
M.E. Guadalupe Nava Galán

Titular  
Mtra. Alejandra Sánchez Guzmán  
Suplente  
Lic. Claudia García Pestrana

Titular  
Dra. Yameth Rodríguez Agudelo  
Suplente  
M. en C. Mireya Chávez Oliveros

Titular  
Dr. Juan Barges Coll  
Suplente  
Dr. Daniel Crail Melendez

**Consejo Consultivo:**

Dr. Tirso Zuriga Santamaría  
M. en C. T.S. Francisco Calzadilla Lemos  
Rosario Corona Cao Romero

OFICIO N° CEI031/16  
ASUNTO: PROTOCOLO 118/15

México, D.F., 10 de Febrero del 2016.

**DR. DAVID JOSÉ DÁVILA ORTIZ DE MONTELLANO**  
**INVESTIGADOR PRINCIPAL**  
**INNyN MVS.**  
**PRESENTE.**

Estimado Dr. Dávila Ortiz de Montellano:

Con fecha 3 de febrero del 2016, recibimos el oficio No. DIC/013/16, firmado por la doctora María Lucinda Aguirre Cruz, Directora de Investigación, en que solicita la valoración de este Comité al Protocolo de Investigación No. 118/15 intitulado: "DETERMINACION DE LA FRECUENCIA Y CORRELACION CLINICA DEL EXPANDIDO CGG DE FMR1 EN PACIENTES MEXICANOS CON ATAXIA", en virtud a que fue aprobado por el Comité de Investigación.

La opinión de nuestros evaluadores concuerda en que el Protocolo cumple con los elementos indispensables desde la perspectiva Bioética: su Validez Científica, Valor Social, Consentimiento Informado, Selección Equitativa de la Muestra y Relación de Riesgo-Beneficio, por lo que es **APROBADO**.

Reciba un saludo cordial.

**DR. RICARDO COLÍN PIANA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA**  
**EN INVESTIGACIÓN.**

**ATENTAMENTE**

**M. en C. ADRIANA OCHOA MORALES**  
**SECRETARIA**

c.p. Ma. Lucinda Aguirre Cruz - Directora de Investigación  
c.p. Dr. Amin Cervantes Arriaga - Titular de la Unidad de Apoyo al Predicamen  
c.p. Dr. Daniel San Juan Orta - Jefe del Depto. de Investigación Clínica  
c.p. Archivo RCP/Inch.

## **ANEXO II: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**IINSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO  
SUÁREZ**

**LIC. SANITARIA 04 AM 0913012**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO: “Probable ataxia espinocerebelosa tipo 2, 3, 7, 17 o  
ataxia de Friedreich”**

**DM-CI-AE23717F-1-1015**

NOMBRE DEL PACIENTE FECHA HORA

REGISTRO INSTITUCIÓN

NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL

Yo \_\_\_\_\_, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:

√ He sido informado/a que es probable que padezca:

o Ataxiataxia espinocerebelosa tipo 2 ( )

o Ataxiataxia espinocerebelosa tipo 3 ( )

o Ataxiataxia espinocerebelosa tipo 7 ( )

o Ataxiataxia espinocerebelosa tipo 17 ( )

o Ataxia de Friedreich ( )

√ Estas enfermedades se caracterizan por alteraciones en la marcha y el lenguaje. Son padecimientos hereditarios por lo que es frecuente que haya otros miembros de su familia con la misma enfermedad.

√ He sido informado/a que para poder determinar si padezco alguna de estas enfermedades, en primera instancia se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados. A continuación, se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el DNA (material hereditario) y se estudiará el posible gen responsable de la enfermedad.

√ He sido informado/a que cuando la sangre es obtenida, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.

✓ He sido informado/a que la identificación del gen que causa alguna de estas enfermedades, permitirá establecer el riesgo que otros integrantes de la familia puedan heredar y desarrollar el padecimiento. Es importante mencionar que a pesar de que ninguna de estas enfermedades tiene tratamiento curativo, el tener un diagnóstico claro permitirá a los médicos tratantes proporcionar mejor tratamiento.

✓ He sido informado/a si soy paciente del Instituto el costo del estudio será de acuerdo al nivel socioeconómico asignado por trabajo social. En caso de que sea paciente externo, el costo es de \$1,935.00 y se deberá cubrir mediante depósito bancario en la cuenta HSBC 4043050087 a nombre de este Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

✓ He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para este estudio y otros en los que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto, acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos: SI ( ) NO ( )

✓ He sido informado/a que si me surgen dudas durante el tiempo en el que le informaremos su resultado, puede comunicarse con la Dra. Alejandra Camacho Molina, el Dr. David Dávila Ortiz de Montellano o la M. en C. Adriana Ochoa Morales del departamento de Neurogenética y Biología Molecular, al tel. 56 06 38 22 Ext. 2018 o 1071.

✓ Después de haber leído detenidamente este documento y de que mis dudas han sido aclaradas satisfactoriamente, acepto VOLUNTARIAMENTE que se me realice el estudio molecular para determinar el tipo de ataxia espinocerebelosa que padezco.

Domicilio: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Correo electrónico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOMBRE, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA**

**MANUEL VELASCO SUÁREZ**

LIC. SANITARIA 04 AM 0913012

**CONSENTIMIENTO INFORMADO:** “Determinación de la frecuencia y correlación clínica del expandido CGG de *FMR1* en pacientes mexicanos con ataxia” 118/15

Nombre del paciente

Fecha

Hora

Registrp

Fecha en que se realizará el procedimiento

Nombre del representante legal

Yo \_\_\_\_\_, en pleno uso de mis facultades mentales y en mi calidad de paciente, o representante legal de éste:

**DECLARO EN FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA LO SIGUIENTE:**

- (1) He sido informado/a que es probable que padezca ataxia. Estas enfermedades se caracterizan por alteraciones en la marcha y el lenguaje. Pudiera ser un padecimiento hereditario por lo que es frecuente que haya otros miembros de su familia con la misma enfermedad, aunque tenga distintas manifestaciones.
- (2) He sido informado/a que se me ha invitado a participar en el protocolo de investigación “Determinación de la frecuencia y correlación clínica del expandido CGG de *FMR1* en pacientes mexicanos con ataxia”
- (3) Si acepto participar, en primera instancia se revisará mi expediente clínico y se me realizará una historia clínica completa, la cual incluye la elaboración de árbol genealógico, con la finalidad de identificar a otros familiares que posiblemente estén afectados. A continuación se me tomará una muestra de sangre periférica de la cual se extraerá el DNA (material hereditario) y se estudiará el gen *FMR1*, posible responsable de mi enfermedad. He sido informado/a que cuando la sangre es obtenida, podré experimentar un leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local.

(4) He sido informado/a que a pesar de que se obtenga un resultado positivo, esta enfermedad no tiene tratamiento curativo, pero el tener un diagnóstico específico permitirá a los médicos tratantes proporcionar mejor tratamiento e información más completa sobre la enfermedad y la posibilidad de manifestaciones en otros familiares.

(5) He sido informado/a que el presente estudio no tiene costo para mí.

(6) He sido informado/a que mi DNA puede ser usado para este estudio y otros en los que se están analizando genes de la población mexicana, por tanto acepto que mi muestra sea usada en otros proyectos:

SI ( ) NO ( )

(7) He sido informado/a que si me surgen dudas durante el tiempo en el que le informaremos su resultado, puede comunicarse con la Dra. Alejandra Camacho Molina o el Dr. David José Dávila Ortiz de Montellano en el departamento de Neurogenética y Biología Molecular, al tel. 56 06 38 22 Ext. 2018 o 1071. Después de haber leído detenidamente este documento y de que mis dudas han sido aclaradas satisfactoriamente, acepto **VOLUNTARIAMENTE** que se me realice el estudio molecular del gen *FMR1*.

Domicilio: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Correo electrónico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOMBRE, FIRMA Y CÉDULA DEL MÉDICO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

## **ANEXO III: FORMATO DE CAPTURA DE DATOS CLÍNICOS**

**Hoja de captura de datos clínicos de Ataxia**

Nombre \_\_\_\_\_ Sexo  M  F Fecha \_\_\_\_\_ Muestra \_\_\_\_\_

No. Registro \_\_\_\_\_ Edad de Inicio \_\_\_\_\_ Edad actual \_\_\_\_\_ F. de nacimiento \_\_\_\_\_

Literaldad:  D  Z  A EDO. CIVIL  Edad al Diagnóstico \_\_\_\_\_ Revisor Genética \_\_\_\_\_ Revisor Neurología \_\_\_\_\_

Origen de los padres \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_ Patrón de Herencia

AD  AR  Mat  Esp

Teléfono \_\_\_\_\_ Tel. Recados \_\_\_\_\_ Mail \_\_\_\_\_

Antecedentes	SI	No	Observaciones		SI	No	Observaciones
Alcoholismo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	Malformaciones	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____
Tabaquismo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Escoliosis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Otras toxicomanías	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Telangiectasias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Exposición a Neurotóxicos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Enf. Cardíaca	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
TCE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		All. Esfínteres	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
CC	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	All. Vegetativas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Alt. en el Desarrollo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Calambres	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Parkinsonismo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Demencia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	
Enf. Psiquiátrica	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Menopausia precoz	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
<b>Neurona Motora Superior</b>	<b>SI</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Neurona Motora Inferior</b>	<b>SI</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>
Hipertonía	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	Hipotónia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____
Babinski	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Fasciculaciones	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Hiperreflexia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Hiporreflexia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Atrofia muscular moderada				Atrofia muscular marcada			
<b>Movimientos anormales</b>	<b>SI</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Oftalmológico</b>	<b>SI</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>
Distonía	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____	Nistagmus Horizontal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	_____
Corea	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Nistagmus Vertical	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Atetosis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Nistagmus Rotatorio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Balismo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Sacadas lentas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Rigidez	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		Ceguera	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Tembor	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Retinosis pigmentaria	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Mioclonías	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Neuropatía óptica	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		
Disinesias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Parálisis supranuclear	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		

<b>Signos Cerebelosos:</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>		<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>
Dismetrias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Dismetria	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Dismetria	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Tándem	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Exploración sensitiva	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>		<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>Observaciones</b>
Propiocepción	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Táctil fina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Temperatura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Hiperestesia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Hipoestesia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Neuropatía	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>			<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Observaciones

LCR

VCM

EMG

EEG

PES

IREA/VM

IRM

Otros

PX

ELABORO

## **ANEXO IV: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

A: Tutoría en tesis de licenciatura.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

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

**T E S I S**

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

**PRESENTA:**

**DANIHUI SÁNCHEZ GARCÍA**

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

**COASESOR: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza al alumno:  
**Danihui Sánchez García**

Con número de cuenta: 310318044 a presentar la: **Tesis y Examen Profesional**

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

Bajo la asesoría del: **M. en C. David José Dávila Ortiz de Montellano**  
Para obtener el título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA	FECHA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>		<u>5/12/17</u>
<b>VOCAL</b>	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>		<u>7/12/2017</u>
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Andrés Romero Rojas</u>		<u>5/12/17</u>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>M. en C. Nydia Berenice González Angeles</u>		<u>5/12/17</u>
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>		<u>5/12/2017</u>

Atentamente notificamos su participación en la revisión y evaluación del trabajo para que en un plazo no mayor a 15 días hábiles emita su VOTO APROBATORIO. Si existieran correcciones u observaciones en el trabajo, contaría con 15 días hábiles más a partir del momento en que el pasante entrega el trabajo corregido, para emitir su VOTO APROBATORIO o RECHAZO, todo esto de acuerdo al artículo 21 del Reglamento de Exámenes Profesionales.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 05 de Diciembre de 2017.

**I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO**

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

LMCF/cga\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

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

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

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

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

Que presenta el pasante: **Danihui Sánchez García**

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

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

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

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES  
CONSTANCIA DE EXAMEN

En el examen profesional que sustentó: **Danihui Sánchez García**, con número de cuenta: **310318044**, para obtener el Título de:

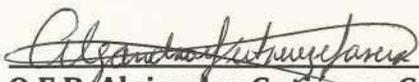
**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

Bajo la Opción: "**TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL**", el jurado ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

*Aprobado por unanimidad*

Cuatitlán Izcalli, Estado de México a 28 de febrero de 2018.

El Secretario Del Jurado

  
Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García  
1001180065  
JACO/LMCF/mmgm\*

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

**Vo.Bo. EXÁMENES PROFESIONALES**

Al cabo de 45 días hábiles al examen profesional, consulte la página de internet <http://www.escolar.unam.mx>. Para recabar informes respecto a la entrega de Título.

Este documento no será válido sin el sello del Departamento.

B. Artículos científicos.

Frecuencia de polimorfismos de nucleótido único y haplotipos de alfa-sinucleína asociados con la enfermedad de Parkinson esporádica en población mexicana

## Frecuencia de polimorfismos de nucleótido único y haplotipos de alfa-sinucleína asociados con la enfermedad de Parkinson esporádica en población mexicana

David J. Dávila-Ortiz de Montellano, Mayela Rodríguez-Violante, Ana Fresán, Nancy Monroy-Jaramillo, Petra Yescas-Gómez

**Introducción.** La enfermedad de Parkinson (EP) es una entidad neurodegenerativa común de inicio en la etapa adulta. Su incidencia en México se estima en 40-50 casos por 100.000 habitantes/año y constituye la cuarta causa de atención médica en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. La proteína alfa-sinucleína, SNCA, es clave en la patología de la EP y sus polimorfismos se han asociado a un riesgo aumentado de desarrollarla.

**Objetivo.** Evaluar el riesgo que representan los polimorfismos rs2619364, rs2619363, rs2736990, rs7684318, rs17016074, rs356219, rs356220 y rs356203 de SNCA en una muestra de sujetos mexicanos para la EP.

**Sujetos y métodos.** Se evaluaron 171 pacientes con diagnóstico de EP y 171 controles pareados por sexo y edad mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, y se realizó un análisis estadístico para determinar la asociación de los polimorfismos con la enfermedad.

**Resultados.** Las variantes rs356220, rs356203, rs7684318 y rs2736990 de SNCA están asociadas a la enfermedad y forman dos haplotipos de riesgo elevado para desarrollar EP esporádica en la población mexicana.

**Conclusiones.** Las variaciones en SNCA son un factor de riesgo para desarrollar EP y pueden ser biomarcadores genéticos específicos para pacientes mestizos mexicanos como herramienta de apoyo diagnóstico en la EP esporádica.

**Palabras clave.** Enfermedad de Parkinson. Haplotipos de riesgo. Población mexicana. rs356203. rs356220. rs2736990. rs7684318. SNCA.

### Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo de inicio en la etapa adulta que consiste en bradicinesia, generalmente acompañada de rigidez muscular, temblor de reposo e inestabilidad postural [1,2], aunque también presenta otras manifestaciones [3] como alteraciones del estado de ánimo, alteraciones del ciclo vigilia-sueño y alteraciones cognitivas, entre otras [4,5]. Su incidencia en México se estima en 40-50 casos por 100.000 habitantes/año [6], constituye la cuarta causa de atención médica en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en la Ciudad de México y representa una causa importante de discapacidad en el adulto mayor [3].

La mayor parte de los pacientes presenta un cuadro esporádico, sin que se pueda determinar un agente causal específico; la exposición a neurotóxicos (pesticidas e insecticidas), antecedentes de traumatismo craneoencefálico, alcoholismo y otras toxicománias (uso de inhalantes, cannabinoides y cocaína) son factores de riesgo ambiental bien carac-

terizados, mientras que el tabaquismo se ha considerado como un factor de protección [7,8]; sin embargo, también se conoce que en la etiología de la EP existe un componente genético importante [8,9].

Mediante estudios de patología *post mortem* en pacientes con EP, se ha identificado la presencia de inclusiones eosinofílicas, redondeadas y con un halo pálido en las neuronas de la sustancia negra, llamadas cuerpos de Lewy [9]. Estos agregados están constituidos por diversas proteínas, entre las que destaca la  $\alpha$ -sinucleína (SNCA) [5], que actualmente se ha identificado como clave en la patología de la EP. Se ha clonado el gen que la codifica (SNCA) y se ha identificado como el primer gen causal de la EP hereditaria (*PARK1/PARK4*) [10].

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo no se han identificado mutaciones puntuales [11] ni alteraciones estructurales mediante MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) en SNCA [11]. En contraste, hemos identificado una elevada frecuencia de la mutación p.L444P en la proteína glucocerebrosidasa (GBA), factor de riesgo ya conocido para desarrollar la EP [12]. En conjunto, es-

Departamento de Genética y Biología Molecular (D.J. Dávila-Ortiz de Montellano, N. Monroy-Jaramillo, P. Yescas-Gómez); Laboratorio Clínico de Enfermedades Neurodegenerativas (M. Rodríguez-Violante); Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Subdirección de Investigaciones Clínicas; Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (A. Fresán). Ciudad de México, México.

#### Correspondencia:

Dra. Petra Yescas Gómez.  
Departamento de Genética y Biología Molecular. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Insurgentes Sur, 3877. Col. La Fama. Tlalpan. CP 12269. Ciudad de México (México).

#### E-mail:

yescasp@gmail.com

#### Financiación:

Fondos aportados por CONACyT (CONACyT SALUD-2010-01-140190).

#### Agradecimientos:

Se agradece el apoyo brindado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

#### Nota:

Resultados preliminares de este estudio fueron presentados en el 18.º Congreso Internacional de Enfermedad de Parkinson y Movimientos Anormales.

Aceptado tras revisión externa: 14.06.16.

#### Cómo citar este artículo:

Dávila-Ortiz de Montellano DJ, Rodríguez-Violante M, Fresán A, Monroy-Jaramillo N, Yescas-Gómez P. Frecuencia de polimorfismos de nucleótido único y haplotipos de alfa-sinucleína asociados con la enfermedad de Parkinson esporádica en población mexicana. Rev Neurol 2016; 63: 345-50.

© 2016 Revista de Neurología

tos hallazgos implican que la etiología de la EP esporádica en nuestra población debe continuar investigándose.

Aunque las mutaciones puntuales [13-15] y multiplicaciones en *SNCA* [16] son una causa rara de EP hereditaria, varios estudios han documentado la asociación de sus polimorfismos de nucleótido único (SNP) y la EP esporádica [17-19]. Dicha asociación ha sido replicada y corroborada mediante estudios de asociación de genoma completo [20,21].

El mecanismo exacto por el cual los SNP de *SNCA* modifican la susceptibilidad para la EP esporádica aún no está claro. Existe evidencia de que los alelos asociados con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad también se correlacionan con una mayor expresión de la proteína *SNCA in vitro* y con niveles elevados en plasma [17,22,23].

En la población mexicana existen pocos estudios encaminados a relacionar polimorfismos y haplotipos genéticos de *SNCA* con la EP esporádica. Solamente se encontró un informe sobre el polimorfismo IVS4+66A-G en *SNCA*, el cual no presentó asociación con la enfermedad [24].

La variabilidad genética en la región promotora 5'UTR y la región terminal 3'UTR del gen *SNCA* puede ser la responsable de la modulación de la expresión de la proteína, y de hecho son las regiones donde se notifican más SNP asociados a un mayor riesgo de EP esporádica en distintas poblaciones, especialmente la noruega, alemana, china y japonesa [15,18,25-28].

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se seleccionaron los siguientes SNP: rs2619364, rs2619363 [27], rs2736990, rs7684318 [29], rs17016074 (asociado con un aumento en la tasa de transcripción de *SNCA*) [30], rs356219 [27], rs356220 y rs356203 [31] para determinar si se encuentran también asociados a la EP esporádica en la población mexicana.

El presente estudio fue avalado por los comités científico y de bioética locales de acuerdo con la normativa vigente [32].

## Sujetos y métodos

Todos los participantes (pacientes y controles) provenían de la Ciudad de México y su conurbación, identificados como mestizos mexicanos (considerados como hijos y nietos de sujetos nacidos en México), seleccionados aleatoriamente.

Los pacientes fueron reclutados dentro de la clínica de movimientos anormales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, teniendo en cuenta que el diagnóstico clínico de EP esporádica

fuera realizado por dos neurólogos especialistas en movimientos anormales de acuerdo con los criterios del banco de cerebros del Reino Unido [33]. Los controles fueron reclutados teniendo en cuenta que no presentaran antecedentes familiares de EP y que en la exploración física y neurológica no presentaran alteraciones o datos de patología neurológica. Todos los individuos participantes aceptaron participar mediante consentimiento informado y la información sensible ha sido tratada de acuerdo con la confidencialidad requerida.

El tamaño de la muestra fue calculado mediante la fórmula de Fleiss, según la frecuencia alélica de los SNP seleccionados para el análisis de acuerdo con lo descrito en la bibliografía para los alelos de riesgo (4%), con un intervalo de confianza al 95% y un poder del 80% [34]. De acuerdo con esto, se estimó una muestra de 172 pacientes y 172 controles pareados por edad y sexo.

La información clínica y sociodemográfica de cada participante fue obtenida mediante interrogatorio directo, exploración física y revisión de expediente clínico. Las variables que se registraron de cada paciente fueron: edad cronológica del sujeto, edad de inicio de la EP esporádica, exposición a neurotóxicos (pesticidas e insecticidas), antecedentes de traumatismo craneoencefálico, tabaquismo, alcoholismo y otras toxicomanías (uso de inhalantes, cannabinoides y cocaína).

El ADN para el análisis molecular se obtuvo a partir de sangre periférica mediante técnicas convencionales.

En todas las muestras se tamizaron previamente los tres genes más frecuentemente asociados a EP, incluyendo los exones 31, 35 y 41 de *LRRK2* [35], la secuencia y dosis de *PARK2* [35-37] y los exones 9-10 de *GBA* [12]. Sólo un paciente presentó la mutación L444P en *GBA*, por lo que se eliminó de la muestra junto con su respectivo control.

La discriminación alélica de los ocho SNP de *SNCA* se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando sondas TaqMan® en equipo Step One® de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Applied Biosystems).

## Análisis estadístico

La información obtenida se analizó mediante el paquete informático SPSS v. 20 y SNPstats [38] para determinar el equilibrio de Hardy Weinberg y la asociación de los SNP y haplotipos de *SNCA* con la EP esporádica mediante prueba de chi al cuadrado con un intervalo de confianza al 95% y una significación estadística menor de 0,05.

## Resultados

En la muestra, el 65% ( $n = 111$ ) de los individuos era del sexo masculino y el 35% ( $n = 60$ ) del femenino, y la edad media fue de  $51,6 \pm 13,4$  años (rango: 18-79 años). Las características sociodemográficas, de edad y de sexo fueron similares a lo descrito en la población general [9].

En el análisis de las variables, el antecedente de traumatismo craneoencefálico presentó una frecuencia del 11,34% en los controles ( $n = 19$ ) y del 19,77% ( $n = 34$ ) en los pacientes con EP esporádica; la exposición a neurotóxicos se observó en el 9,5% de los controles ( $n = 16$ ) y el 21,51% de pacientes ( $n = 37$ ), y mostró diferencias entre grupos ( $p < 0,05$ ); sin embargo, no se consideraron para el análisis estadístico debido a la falta de información proporcionada por los sujetos. Ninguna otra variable clínica o sociodemográfica mostró diferencias entre los grupos de estudio ( $p > 0,05$ ).

Las frecuencias alélicas de los SNP de *SNCA* referidas al ámbito mundial en el proyecto de los 1.000 genomas [39] se muestran en la tabla I y se comparan con las frecuencias documentadas en mexicanos encontradas en este estudio. Cinco de los SNP estudiados se hallaron en equilibrio de Hardy-Weinberg (rs356220, rs356203, rs7684318, rs2736990 y rs2619364) y los polimorfismos rs2619363, rs17016074 y rs356219 presentaron una distribución fuera del equilibrio, probablemente debido a deriva génica. Por ello, estos últimos tres SNP fueron omitidos del análisis de asociación con la EP esporádica.

Los SNP que representaron asociación a la EP esporádica fueron rs356220, rs356203, rs7684318 y rs2736990; el SNP rs2619364 no presentó diferencias entre los pacientes y controles y, por tanto, no se consideró para el análisis de riesgo por haplotipos.

La asociación encontrada en la población mestiza mexicana de estos cinco SNP presentó una distribución distinta a la notificada en otras poblaciones [27,29,30,40-42] (Tabla II). El haplotipo denominado "TACT" fue el más común, con una frecuencia media del 30%, sin presentar asociación con la EP esporádica. Los haplotipos obtenidos de esta combinación de SNP que presentaron asociación con la EP esporádica se muestran en la tabla III.

De los haplotipos posibles, seis fueron identificados como factores de riesgo para la EP esporádica, presentes en el 35% de casos, lo que indica una importante participación de *SNCA* en la EP esporádica; sin embargo, no explica por completo la variabilidad genética dentro de la enfermedad, que podría deberse a interacción y participación con otros genes de riesgo, como *MAPT* y *GBA*, por ejemplo.

**Tabla I.** Frecuencias alélicas de los polimorfismos de nucleótido único del gen *SNCA* seleccionados de acuerdo con los 1.000 genomas [39] y lo encontrado en población mexicana.

	Posición cromosómica	Cambio de nucleótido	1.000 genomas, AMF (n)	México, AMF (n)
rs17016074	4:89726127	A/G	0,0503 (252)	0,0238 (252)
rs2619363	4:89837896	G/T	0,1074 (538)	0,1706 (252)
rs2619364	4:89838736	A/G	0,1094 (548)	0,1904 (252)
rs2736990	4:89757390	A/G	0,3934 (1.970)	0,4642 (252)
rs356203	4:89744890	C/T	0,4832 (2.420)	0,4920 (252)
rs356219	4:89716450	A/G	0,4892 (2.450)	0,4801 (252)
rs356220	4:89720189	C/T	0,4834 (2.421)	0,4920 (252)
rs7684318	4:89733852	C/T	0,3287 (1.646)	0,4124 (252)

AMF: alelo de menor frecuencia; n: número de alelos analizados.

## Discusión

Distintas variantes de *SNCA* se han reconocido como factores de riesgo para desarrollar EP esporádica. En este estudio se seleccionaron ocho SNP, previamente notificados como variantes asociadas a riesgo de EP esporádica en diversas poblaciones, para analizarlos en la población mexicana.

Las frecuencias de los SNP de *SNCA* estudiados presentan una distribución similar a la observada en las poblaciones asiática y caucásica. La distribución del SNP rs7684318 resulta similar a la notificada en la población afroamericana, lo que podría deberse al mestizaje en nuestro país. Es interesante la observación de que el SNP rs17016074 presenta una distribución distinta a otras poblaciones, probablemente debido al componente indígena mexicano [39,43].

Las variantes rs356220, rs356203, rs7684318 y rs2736990, reconocidas previamente como factores de riesgo para la EP esporádica en diversas poblaciones [15,18,19,25-28], se encontraron en la población mestiza mexicana analizada, y seis haplotipos conformados por dichos SNP podrían también representar un riesgo elevado de desarrollar EP esporádica.

Es importante mencionar que otras variantes de *SNCA*, así como las interacciones gen-gen y gen-medio ambiente, pueden modificar el riesgo de padecer EP esporádica, y describir un perfil genético que pudiera usarse como biomarcador genético de

**Tabla II.** Asociación de los polimorfismos de nucleótido único del gen *SNCA* encontrados en equilibrio de Hardy-Weinberg en controles y pacientes mestizos mexicanos con enfermedad de Parkinson esporádica y su comparación con lo notificado en otras poblaciones.

	México <sup>a</sup>				Otras poblaciones <sup>b</sup>			
	Pacientes	Controles	Odds ratio (IC 95%)	p	Población	n	Odds ratio (IC 95%)	p
rs356220	83 (48,5%)	53 (31,0%)	2,10 (1,35-3,27)	0,0024	Japonesa	175	1,48 (1,25-1,74)	< 0,001
rs356203	77 (45,0%)	58 (33,9%)	1,60 (1,03-2,47)	0,035	Japonesa	175	1,48 (1,25-1,74)	< 0,05
rs7684318	119 (69,6%)	32 (18,7%)	9,94 (5,99-16,50)	< 0,001	Noruega, alemana	175	1,54 (1,35-1,75)	< 0,05
rs2736990	89 (52,0%)	53 (31,0%)	2,42 (1,55-3,76)	< 0,001	Noruega, alemana	NN	1,30 (1,18-1,43)	0,01
rs2619364	122 (71,4%)	133 (77,8%)	0,71 (0,44-1,16)	0,17	Noruega	236	1,45 (1,01-2,11)	0,02

IC 95%: intervalo de confianza al 95%; NN: no notificado. <sup>a</sup> Presente estudio; <sup>b</sup> Otras poblaciones [27,29,30,40-42].

**Tabla III.** Haplotipos del gen *SNCA* conformados por los polimorfismos de nucleótido único rs356220, rs356203, rs7684318 y rs2736990 asociados con enfermedad de Parkinson esporádica en población mexicana.

	Frecuencia	Odds ratio (IC 95%)	p
CGTC	0,1978	1,92 (1,18-3,13)	0,009
CATC	0,0694	2,54 (1,37-4,72)	0,003
CGCC	0,0258	14,51 (1,68-125,15)	0,016
TGTC	0,0251	8,97 (2,05-39,19)	0,003
TACC	0,0192	4,71 (1,16-19,15)	0,031
CACT	0,0178	16,18 (1,88-139,18)	0,012

IC 95%: intervalo de confianza al 95.

la enfermedad deberá ser específico para cada población, incluida la mestiza mexicana, para apoyar el diagnóstico clínico certero de manera temprana.

Las implicaciones funcionales de estos hallazgos no tienen una explicación clara inmediata. Diversos autores han hallado una fuerte asociación de SNP de *SNCA* sólo con un riesgo incrementado para el desarrollo de EP esporádica, pero no con progresión o edad de inicio de la enfermedad.

Aunque no se conoce el mecanismo exacto, se ha postulado que los SNP en regiones no codificantes de *SNCA* podrían afectar la tasa de transcripción por mecanismos de regulación en *cis* [44], alterando el *splicing* alternativo en el procesamiento postranscripcional de las isoformas de *SNCA*. Así,

las modificaciones postraduccionales favorecerían su fosforilación y agregación, lo que afectaría la homeostasis de *SNCA* y de otras proteínas relacionadas, e interferiría con la función de los receptores dopaminérgicos, aumentando la citotoxicidad, el estrés oxidativo, la autofagia y la excitotoxicidad, mecanismos propuestos para la génesis de la EP esporádica [45-47].

En conclusión, las variaciones en *SNCA* constituyen un factor de riesgo para desarrollar EP esporádica en distintas poblaciones, incluyendo la población mestiza mexicana, donde los SNP rs356220, rs356203, rs7684318 y rs2736990 y por lo menos seis de los haplotipos derivados de estos probablemente se relacionan con un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad.

Estos hallazgos deberán confirmarse mediante estudios de asociación en una muestra de mayor tamaño, incorporando el análisis de otros factores de riesgo. Sin embargo, representan un comienzo alentador en la búsqueda de biomarcadores genéticos específicos para pacientes mestizos mexicanos con EP esporádica como herramienta de apoyo diagnóstico.

Evidentemente, estos hallazgos motivan a estudiar el efecto de los polimorfismos de *SNCA* en un contexto biológico en trabajos futuros mediante modelos funcionales capaces de corroborar la asociación de los SNP de *SNCA* y aclarar su mecanismo fisiopatológico en la EP.

#### Bibliografía

1. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). MIM number #168600. Baltimore, MD: Johns Hopkins University. URL: <http://omim.org/>. [30.11.2015].

2. World Health Organization. ICD-10. VI Nervous Diseases, VI3 extrapyramidal system and movement disorders. Tenth revision of the International Classification of Diseases. Clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: WHO; 1992.
3. Rodríguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Villar-Velarde A, Corona T. Prevalence of non-motor dysfunction among Parkinson's disease patients from a tertiary referral center in Mexico City. *Clin Neurol Neurosurg* 2010; 112: 883-5.
4. Secretaría de Salud, México. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. México DF: Secretaría de Salud; 2010. URL: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>.
5. Calne D. A definition of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005; 11 (Suppl 1): S39-40.
6. Secretaría de Salud, México. Comunicado de prensa 148. Enfermedad de Parkinson: una condición discapacitante. México DF: Subsecretaría de Comunicación Social; 2010.
7. Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 1997; 48: 1583-8.
8. Jenner P, Morris HR, Robbins TW, Goedert M, Hardy J, Ben-Shlomo Y, et al. Parkinson's disease –the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *J Parkinsons Dis* 2013; 3: 1-11.
9. Pankratz ND, Wojcieszek J. Parkinson disease overview in GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource. Seattle: University of Washington; 1997-2011. URL: <http://www.genetests.org>. [31.03.2015].
10. Kay DM, Factor SA, Samii A, Higgins DS, Griffith A, Roberts JW, et al. Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B: 1222-30.
11. Dávila-Ortiz de Montellano D, Alonso M, Monroy N, Rodríguez-Violante M, López-López M, Yescas P. Detección de mutaciones puntuales en el gen de alfa-sinucleína en pacientes mexicanos con enfermedad de Parkinson y herencia autosómica dominante. *Arch Neurocienc Mex* 2012; 17 (Suppl II): S17-21.
12. González-del Rincón ML, Monroy-Jaramillo N, Suárez-Martínez AI, Yescas-Gómez P, Boll-Woehrlén MC, López-López M, et al. The L444P GBA mutation is associated with early-onset Parkinson's disease in Mexican Mestizos. *Clin Genet* 2013; 84: 386-7.
13. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-7.
14. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18: 106-8.
15. Pankratz ND, Nichols WC, Elsaesser VE, Pauciulo MW, Marek DK, Halter CA, et al. Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24: 1125-31.
16. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364: 1167-9.
17. Maraganore DM, De Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JB, Krüger R, et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296: 661-70.
18. Li NN, Mao XY, Chang XL, Zhao DM, Zhang JH, Liao Q, et al. SNCA rs356219 variant increases risk of sporadic Parkinson's disease in ethnic Chinese. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013; 162B: 452-6.
19. Han W, Liu Y, Mi Y, Zhao J, Liu D, Tian Q. Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2015; 168B: 123-34.
20. Klein C, Ziegler A. From GWAS to clinical utility in Parkinson's disease. *Lancet* 2011; 377: 613-4.
21. Latourelle JC, Hendricks AE, Pankratz N, Wilk JB, Halter C, Nichols WC, et al. Genomewide linkage study of modifiers of LRRK2-related Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26: 2039-44.
22. Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, et al. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J* 2008; 22: 1327-34.
23. Mata IE, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, et al. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol* 2010; 67: 1350-6.
24. Ramírez-Jirano LJ, Ruiz-Sandoval JL, Jiménez-Gil FJ, Ramírez-Vega J, Vargas-Frutos E, Gallegos-Arreola MP. Frecuencia del polimorfismo IVS4+66A-G en el gen alfa-sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson del noroccidente de México. *Rev Neurol* 2007; 44: 15-7.
25. Parsian A, Racette B, Zhang ZH, Chakraverty S, Rundle M, Goate A, et al. Mutation, sequence analysis, and association studies of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurology* 1998; 51: 1757-9.
26. Farrer M, Maraganore DM, Lockhart P, Singleton A, Lesnick TG, De Andrade M, et al. Alpha-synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1847-51.
27. Myhre R, Toft M, Kachergus J, Hulihan MM, Aasly J, Klungland H, et al. Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurol Scand* 2008; 118: 320-7.
28. Pan F, Ding H, Dong H, Ye M, Liu W, Cui G, et al. Association of polymorphism in rs2736990 of the  $\alpha$ -synuclein gene with Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurol India* 2013; 61: 360-4.
29. Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, et al. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 2010; 74: 97-109.
30. Sotiriou S, Gibney G, Baxevas AD, Nussbaum R. A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2009; 461: 196-201.
31. Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, et al. Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1151-8.
32. General Assembly of the World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Coll Dent* 2014; 81: 14-8.
33. Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 75-86.
34. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (dbSNP Build ID: rs356219, rs356220, rs356203, rs17016074, rs7684318, rs2736990, rs2619363, rs2619364). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. [30.03.2015].
35. Yescas P, López M, Monroy N, Boll MC, Rodríguez-Violante M, Rodríguez U, et al. Low frequency of common LRRK2 mutations in Mexican patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010; 485: 79-82.
36. Guerrero-Camacho JL, Monroy-Jaramillo N, Yescas-Gómez P, Rodríguez-Violante M, Boll-Woehrlén C, Alonso-Vilatela ME, et al. High frequency of Parkin exon rearrangements in Mexican-mestizo patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27: 1047-51.
37. Monroy-Jaramillo N, Guerrero-Camacho JL, Rodríguez-Violante M, Boll-Woehrlén MC, Yescas-Gómez P, Alonso-Vilatela ME, et al. Genetic mutations in early-onset Parkinson's disease Mexican patients: molecular testing implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2014; 165B: 235-44.
38. Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22: 1928-9.
39. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491: 56-65.

40. Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, et al. Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1151-8.
41. Winkler S, Hagenah J, Lincoln S, Heckman M, Haugarvoll K, Lohmann-Hedrich K, et al. Alpha-synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurology* 2007; 69: 1745-50.
42. Yu L, Xu P, He X, Hu F, Lin Z, Zhu M, et al. SNP rs7684318 of the alpha-synuclein gene is associated with Parkinson's disease in the Han Chinese population. *Brain Res* 2010; 1346: 262-5.
43. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449: 851-61.
44. Tagliafierro L, Chiba-Falek O. Up-regulation of SNCA gene expression: implications to synucleinopathies. *Neurogenetics* 2016; 17: 145-57.
45. Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakajo S, Baba M, Iwatsubo T, et al. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2000; 275: 390-7.
46. Sotiriou S, Gibney G, Baxevanis AD, Nussbaum RL. A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2009; 461: 196-201.
47. Davis AA, Andruska KM, Benítez BA, Racette BA, Perlmutter JS, Cruchaga C. Variants in GBA, SNCA, and MAPT influence Parkinson disease risk, age at onset, and progression. *Neurobiol Aging* 2016; 37: 209.e1-7.

### Frequency of single nucleotide polymorphisms and alpha-synuclein haplotypes associated with sporadic Parkinson's disease in the Mexican population

**Introduction.** Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease which begins in adulthood. Its incidence in Mexico is estimated to be 40-50 cases per 100,000 inhabitants/year and is the fourth reason for medical care in the National Institute of Neurology and Neurosurgery. The protein alpha-synuclein, SNCA, plays a key role in the pathology of PD, and its polymorphisms have been associated with an increased risk of developing the disease.

**Aim.** To evaluate the risk of PD represented by the polymorphisms rs2619364, rs2619363, rs2736990, rs7684318, rs17016074, rs356219, rs356220 and rs356203 of *SNCA* in a sample of Mexican subjects.

**Subjects and methods.** Altogether 171 patients diagnosed with PD and 171 gender- and age-paired controls were assessed by means of real-time polymerase chain reaction, and a statistical analysis was performed to determine the association between the polymorphisms and the disease.

**Results.** The *SNCA* variants rs356220, rs356203, rs7684318 and rs2736990 were associated with the disease and form two haplotypes with a high risk of developing sporadic PD in the Mexican population.

**Conclusions.** Variations in *SNCA* are a risk factor for the development of PD and can act as specific genetic biomarkers as a diagnostic support tool in sporadic PD for Mexican mestizo patients.

**Key words.** Mexican population. Parkinson's disease. Risk haplotypes. rs2736990. rs356203. rs356220. rs7684318. *SNCA*.

## Síndrome de Pelizaeus Merzbacher: breve revisión de la literatura

# Síndrome de Pelizaeus Merzbacher: breve revisión de la literatura

Ramos-Raudry Elizabeth<sup>1</sup>, Dávila-Ortiz de Montellano David José<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Correspondencia: David José Dávila-Ortiz de Montellano. Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, Delegación Tlalpan, 14269, Ciudad de México, México. E-mail: djdodem@gmail.com

## Resumen

**Introducción:** Las enfermedades de la mielina han sido descritas desde el siglo XIX; las leucodistrofias son un grupo heterogéneo de enfermedades, de curso progresivo, que pueden manifestar una amplia gama de síntomas y complicaciones, en su mayoría son de etiología genética, siendo el Síndrome de Pelizaeus Merzbacher, de herencia ligada al cromosoma X, el más frecuente de estos.

**Objetivo:** Brindar una panorámica actualizada sobre las enfermedades desmielinizantes en especial del síndrome de Pelizaeus Merzbacher. Método: Se seleccionaron los artículos considerados mas relevantes por los autores en PubMed; EBSCO; Thomson Reuters y OvidSP.

**Resultados:** el Síndrome de Pelizaeus Merzbacher presenta una heterogeneidad clínica importante y desafortunadamente al momento no cuenta con un tratamiento efectivo, sin embargo las nuevas tecnologías de células madres proporcionan oportunidades para su tratamiento.

**Palabras clave:** Mielina, Enfermediades desmielinizantes, Pelizaeus-Merzbacher, Leucopatías.

Recepción  
25/07/2017

Aceptado  
29 /11/ 2017

# Pelizaeus Merzbacher syndrome: brief review of the literature

## Abstract

**Introduction:** Myelin diseases have been described since the 19th century, leucodistrophias are a heterogeneous group of diseases, of progressive course, that can manifest a wide range of symptoms and complications, mostly of genetic aetiology, being Syndrome of Pelizaeus Merzbacher, of inheritance linked to the X chromosome, the most frequent of these.

**Objective:** provide an up-to-date overview of the special demyelinating diseases of the Pelizaeus Merzbacher syndrome.

**Material and method:** the most relevant articles considered by the authors were selected in PubMed; EBSCO; Thomson Reuters and OvidSP. **Results:** Merzbacher Pelizaeus Syndrome presents important clinical heterogeneity and unfortunately at the moment does not have an effective treatment, however new stem cell technologies provide opportunities for its treatment.

*Keywords: Myelin, Demyelinating diseases, Pelizaeus-Merzbacher, Leukopathies*

## Introducción

Las enfermedades de la mielina han sido descritas desde el siglo XIX, y hasta la fecha, comprenden un grupo cada vez mayor de patologías con diversos mecanismos y factores genéticos y ambientales involucrados en estas entidades; pueden manifestarse en cualquier edad desde la infancia hasta la edad adulta, y revelan una gran variabilidad en la progresión y presentación clínica de la enfermedad, que van desde el retraso del desarrollo hasta convulsiones y espasticidad<sup>1</sup>. El concepto "leucodistrofia" fue introducido por primera vez por Bielschowski y Henneberg en 1928 y su definición, tanto clínica como histopatológica, así como su clasificación

ha cambiado de forma considerable en el último siglo, principalmente debido a los estudios de imagen por resonancia magnética y a la comprensión de sus mecanismos fisiopatológicos y la genética involucrada<sup>1</sup>. Las leucodistrofias clásicas, como la leucodistrofia metacromática y la enfermedad de Krabbe, representan sólo un pequeño número de enfermedades hereditarias que afectan a la sustancia blanca<sup>1,2</sup>.

Actualmente, el término leucoencefalopatía se utiliza para reflejar un grupo heterogeneo de enfermedades que cursan con cambios, primarios o secundarios, en el desarrollo de mielina<sup>2</sup>.

Las leucodistrofias son un grupo heterogéneo de enfermedades, de curso progresivo, que pueden manifestar una amplia gama de síntomas y complicaciones, en su mayoría son de etiología genética que afectan el desarrollo o el mantenimiento de la mielina del sistema nervioso central y en algunos casos también involucran el sistema nervioso periférico. Tienen una incidencia de 1 / 7,500 y menos del 50% de los pacientes obtienen un diagnóstico específico, estas pueden iniciar en la infancia o en la edad adulta, con variabilidad en la progresión y presentación clínica desde déficit cognitivo, convulsiones y espasticidad<sup>1</sup>.

El desarrollo de la mielina comienza en el 4º mes de la gestación y continua posnatalmente, este complejo proceso biológico requiere de la interacción de células neuronales y gliales, por lo que su alteración causa las leucodistrofias<sup>1,3</sup>.

Estas se clasifican dentro de tres principales categorías<sup>1</sup>:

1. Hipomielinización donde hay ausencia o disminución de la producción de mielina.
2. Dismielinización donde el desarrollo de la mielina es anormal.
3. Desmielinización donde hay pérdida o destrucción de la mielina antes formada.

Hay 30 padecimientos incluidos en el término de leucodistrofia. Siendo el síndrome de Pelizaeus Merzbacher el más frecuente de estos. Cabe aclarar que la diferencia entre las leucoencefalopatías y leucodistrofias es que las primeras pueden presentar una etiología secundaria, por lo que algunos autores engloban las leucodistrofias dentro de las leucoencefalopatías siendo estas de etiología genética<sup>3</sup>.

### Síndrome de Pelizaeus Merzbacher

También llamado leucodistrofia hipomielinizante tipo 1 (MIM #312080), fue reportado por primera vez en 1885 por Friedrich Pelizaeus quien describe el primer caso clínico mostró un patrón de herencia ligado al cromosoma X, 25 años después Ludwig Merzbacher, examina la primera familia reportada (con 12 hombres afectados) notando la alteración de la sustancia blanca cerebral, y en 1958 Tyler reporta la entidad como Pelizaeus-Merzbacher<sup>4-6</sup>.

Es un trastorno dismielinizante con patrón de herencia ligado al cromosoma X, que resulta de la mutación del gen PLP1 cuya incidencia varía en Estados Unidos de 1/300,000 a 1/500,000, En Japón 1.45 /100,000 Alemania 0.13/100 000. La mayoría de las veces la enfermedad es subdiagnosticada como parálisis cerebral<sup>7</sup>.

Se clasifica en subtipos de acuerdo a la severidad existiendo un espectro desde una forma pura de paraparesia espástica 2 (SPG2 la cual con antelación se consideró como una entidad alélica al padecimiento) a la forma más severa del síndrome llamada neonatal<sup>8-10</sup>.

Hay una gran variedad de hallazgos por resonancia magnética en esta enfermedad; sin embargo, la hiperintensidad del tallo encefálico y del tracto corticoespinal de la cápsula interna, son las regiones más representativas se correlacionan con la gravedad y la progresión clínica. Se debe tener en cuenta el espectro de los hallazgos de la RM para diagnosticarla y diferenciarse de otras leucodistrofias desmielinizantes<sup>11</sup>. La atrofia en sustancia blanca es el mayor determinante patológico del compromiso clínico en esta condición<sup>3</sup>.

Existen diversas clasificaciones:

- Seiteber 1970; enfocada en los siguientes hallazgos clínicos: edad de inicio, edad de muerte, patrón de herencia y hallazgos neuroquímicos.
- Renier, et al. quien la clasifica en connatal, transicional, clásico y SPG2 por hallazgos clínicos y progresión.
- Calliox, et al. los clasifica en 5 formas de acuerdo a la severidad<sup>10</sup>.

Los primeros síntomas se presentan al nacimiento o a los pocos meses; nistagmo, hipotonía, estridor, algunas veces puede haber parálisis de las cuerdas vocales, dificultad para la alimentación y crisis convulsivas. El retraso psicomotor es evidente a los 6 meses, la ataxia en extremidades puede ser aparente y agravarse durante los años, la hipotonía de extremidades es remplazada por espasticidad, las posturas distónicas y los movimientos coreicos pueden estar presentes, el compromiso cognitivo se manifiesta en la mayoría de los niños<sup>5,12</sup>. Existiendo también riesgo para la anestesia general que puede correlacionarse con complicaciones por crisis y dificultades de la vía aérea por pobre control de los músculos faríngeos, así como la exacerbación de la espasticidad<sup>13</sup>.

#### La forma neonatal

Se observa al nacimiento o en las 2 primeras semanas de vida. Los pacientes no logran desarrollar sus habilidades de caminar, hablar o el uso propositivo de las extremidades superiores, aunque pueden desarrollar comprensión del lenguaje verbal, algunos presentan corta estatura y un peso disminuido para la edad y generalmente requieren soporte nutricional con gastrostomía, suelen fallecer en la primera o segunda década de la vida.

El distress respiratorio y el estridor es una causa importante de morbimortalidad<sup>5,10</sup>.

#### La forma clásica

Es el fenotipo más común, por lo general tienen nistagmos en los dos primeros meses de vida, aunque, no todos llegan a desarrollarlo. Con frecuencia este resuelve de los 2 a 5 años de edad, también desarrollan movimientos titubeantes de cabeza que llega a desaparecer, poseen un lenguaje disártrico y tienen movimientos propositivos de sus extremidades superiores, pueden adquirir la marcha aunque requieren asistencia por el grado de espasticidad, las crisis no son comunes y la esperanza de vida puede ser hasta la séptima década<sup>5</sup>.

#### El fenotipo por la proteína nula

Se desarrolla en los primeros 3 años de vida, se caracteriza por un retraso del desarrollo leve a moderado, marcha espástica y leve neuropatía periférica desmielinizante, la progresión de los síntomas es típica después de la pubertad, dando lugar a una cuadriplejía espástica y pérdida de las habilidades de comunicación, las anormalidades de sustancia blanca son muy leves.

Se presenta neuropatía periférica por desmielinización con velocidades de conducción lentas. El daño axonal es evidente, puede haber atrofia de la sustancia blanca incluyendo el cuerpo calloso<sup>4,5</sup>. Los pacientes con el fenotipo nulo no revelan nistagmus.

#### La forma complicada de paraparesia espástica 2 pura

Comienza a los 5 años con nistagmo, ataxia y disfunción autonómica como vejiga espástica, la marcha es espástica y el habla es muy lenta, la expectativa de vida es normal<sup>5</sup>.

### Paraparesia Espástica 2 pura (SPG2)

Aparece a los 5 años pero el comienzo puede ser retrasado hasta la tercera década, los pacientes presentan marcha espástica y conservan lenguaje con habla lenta y una esperanza de vida normal, pueden tener áreas en parche de hipomielinización<sup>5</sup>.

Puede haber expresividad variable intrafamiliar. Dentro de esta variabilidad 3 características son consistentes; espasticidad, pérdida de mielina y patrón ligado al cromosoma X. Paradójicamente las mujeres heterocigotas para una mutación puntual menos severa, pueden mostrar más síntomas neurológicos que las mujeres heterocigotas para mutaciones puntuales más severas, esto porque las primeras no condicionan la muerte del oligodendrocito y se mantiene la presencia de la mielina anormal. Mientras que en las otras pacientes donde se condiciona la muerte del oligodendrocito la mielina es remplazada por un oligodendrocito donde la inactivación del cromosoma X, portador de la mutación, le permite la formación de una mielina estable por el alelo no mutado. Otra de las paradojas que presenta este padecimiento es que en las familias de los pacientes masculinos con formas leves, las mujeres portadoras son más frecuentemente sintomáticas. En estas familias por lo general revelan una leve diplejía espástica y una leucodistrofia, lentamente progresiva con desarrollo de demencia en la adultez. En ellas se reportan potenciales auditivos de tallo cerebral normales. Hay también reportes de portadoras de delección con disfagia<sup>4, 5,10,14</sup>. El gen PLP1 consta de 7 exones, que codifica para las siguientes 2 isoformas; PLP1 es una proteína de 277 aminoácidos, con 4 regiones transmembranales predominantes que se expresa en oligodendrocitos y representa más del 50% de la proteína de estos. DM20 consta

de 244 aminoácidos es la isoforma corta donde se pierde la mitad del exón 3. La cual codifica para una porción de un *loop* intracelular que contiene 2 sitios de acilación, ver figura 1.<sup>6,10</sup> El gen PLP1 expresa una regulación espacio-temporal, niveles altos se reproducen en los oligodendrocitos durante mielinización activa, algunas otras células del sistema nervioso central lo expresa de manera periférica en bajos niveles, excepto las células olfativas donde los niveles de expresión son altos<sup>15</sup>.

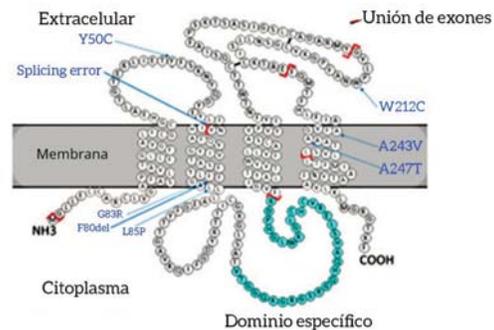


Figura 1. Estructura secundaria de PLP1 tomado de Yamamoto T, Shimojima K. Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom* 2013;53:3-8.

Se han detectado mutaciones puntuales, duplicaciones y deleciones del gen, así como mutaciones de sentido erróneo en el segundo dominio extracelular del gen, donde hay un sitio de splicing alternativo el cual es requerido para la formación de la isoforma DM20, el dominio específico de este es esencial para el mantenimiento de la integridad axonal. Mutaciones en este dominio que se compone de 35 aminoácidos causan una neuropatía periférica y degeneración axonal central<sup>8</sup>.

Entre el 60 y 70% de las mutaciones son duplicaciones submicroscópicas, 15% son mutaciones puntuales. El tamaño de la región duplicada va de 40 kpb a 5Mbp. La deleción representa <1%, los métodos más comunes de detección son FISH y PCR cuantitativa<sup>9</sup>, y se muestran en forma de repetidos directos en tándem, también se han reportado segmentos repetidos en Xq26, Xp, 19pter y en el cromosoma Y. No se conoce que la adición de genes en la duplicación tenga alguna correlación con la severidad clínica<sup>5</sup>.

No se reportan polimorfismos en este gen, y es en extremo conservado entre los mamíferos. Existen *hot spots*, el *loop* externo presenta el 50% de las mutaciones sin sentido ocurridas en este gen<sup>4</sup>.

El espectro clínico es amplio por los diversos mecanismos moleculares con un incremento de severidad cuando acrecenta el número de copias del gen. El cual no se ve modificado por el tamaño de la región duplicada. Las duplicaciones del gen resultan con frecuencia en la forma clásica, mientras que las triplicaciones causan un fenotipo más severo. Las deleciones completas del gen y las mutaciones puntuales que alteran el codón de metionina o causan una proteína trunca, cerca de la región amino terminal resultan en un fenotipo nulo leve y una longevidad casi cercana a lo normal<sup>16</sup>. Otras mutaciones puntuales e indels se han reportado cruzando el espectro fenotípico<sup>4, 5</sup>. Por lo general la forma connatal se manifiesta por mutaciones en sentido erróneo, otras causas implican translocaciones del cromosoma X, triplicaciones y duplicaciones parciales. Mutaciones de sentido erróneo en la región transmembranal dan un fenotipo severo,

mutaciones en el dominio extracelular o en el dominio específico dan un fenotipo leve. La duplicación parcial da una expresión nula<sup>6</sup>. Mutaciones puntuales en el dominio altamente conservado originan un severo fenotipo, se han investigado más de 100 mutaciones puntuales<sup>6</sup>.

Los roles de la proteína PLP1 y DM20, median la adhesión intralaminar en la mielina compacta, mediando el flujo iónico que actúa como un mitógeno precursor de oligodendrocitos la deficiencia completa no impide la desmielinización, sino que resulta en un tardío comienzo de regeneración axonal<sup>8</sup>.

El diagnóstico se sospecha con los hallazgos neurológicos, la progresión, un patrón de herencia ligado al cromosoma X, un patrón de mielinización anormal y difuso, potenciales evocados auditivos y somatosensoriales, son de gran ayuda para diferenciar entre las otras leucodistrofias, mostrando una latencia normal en el componente periférico, pero con retraso y ausencia de componentes centrales de las respuestas evocadas, no hay pruebas bioquímicas específicas por eso el estudio molecular es confirmatorio<sup>8</sup>. Asimismo con una incidencia subestimada, es necesario sospechar el diagnóstico y confirmarlo con el estudio molecular a fin de obtener una incidencia real y poder brindar un manejo y asesoramiento adecuado a los pacientes<sup>17</sup>.

El oligodendrocito muere por una respuesta a la proteína no plegada. Una sobredosis perturba el transporte de la proteína por lo que se acumula en los endosomas, o lisosomas, lo cual lleva a la inducción de apoptosis. La pérdida de PLP1 resulta en la formación de mielina inmadura, ver figura 2.<sup>6</sup>

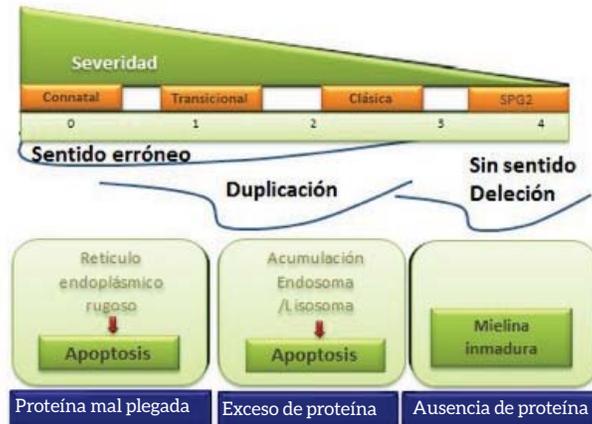


Figura 2. Esquema que muestra la correlación fenotipo-genotipo, así como su fisiopatología. Adaptado de Yamamoto T, Shimojima K. Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom* 2013;53:3-8.

La detección de la duplicación se puede hacer por PCR cuantitativa, MLPA, aCGH, FISH. La secuenciación permite la detección en el 25% de los casos. Otros diferenciales a considerar, (Figura 3)<sup>5</sup>.

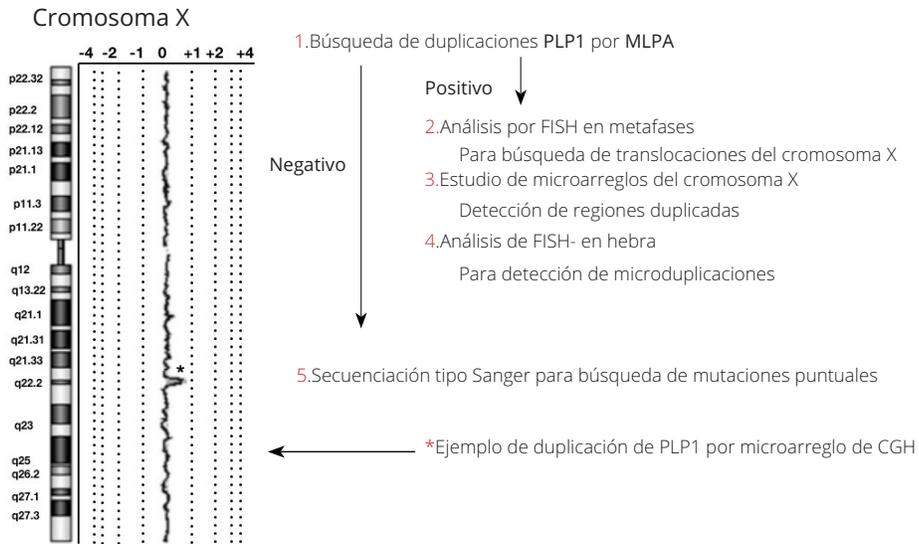


Figura 3. Imagen que muestra un ejemplo de duplicación detectada por aCGH, y los estudios moleculares posibles para la detección de mutaciones en este padecimiento. Modificado de: Yamamoto T, Shimojima K. Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom* 2013; 53:3-8.

### Diagnósticos diferenciales

El 8% de los síndromes de Pelizaeus Merzbacher son causados por mutaciones en el gen GJC2 quien pertenece a la familia de las conexinas y codifica para Cx 47, la cual es una proteína transmembranal con 2 dominios extracelulares, y 3 dominios intracelulares, causa la también llamada leucodistrofia hipomielinizante 2 o SPG44, la cual se hereda con un patrón autosómico recesivo, afectando a ambos géneros con la misma frecuencia, se reportan mutaciones puntuales e indels. Mutaciones en este mismo gen han sido reportadas como etiológicas de linfedema autosómico dominante<sup>5</sup>.

Los siguientes son padecimientos que se deben tener en cuenta como diagnósticos diferenciales

- ▶ Leucodistrofia hipomielinizante tipo 3 (HLD3) con patrón de herencia autosómico recesivo causada por mutaciones en el gen AIMP1<sup>5</sup>.
- ▶ Leucodistrofia hipomielinizante tipo 4 (HLD4) también llamada chaperonopatía. Mitocondrial HSP60 o SPG13 causada por mutaciones en genes que codifican las proteínas HSP60<sup>5,10</sup>.
- ▶ Leucodistrofia hipomielinizante tipo 5 (HLD5) también llamada hipomielinización y catarata congénita<sup>5</sup>.
- ▶ Leucodistrofia hipomielinizante tipo 6 (HLD6) por mutaciones en el gen TUBBA4<sup>5</sup>.
- ▶ Leucodistrofia hipomielinizante tipo 7 (HLD7) por mutaciones en el gen POLR3A<sup>10</sup>.
- ▶ Leucodistrofia hipomielinizante tipo 8 (HLD8) por mutaciones en el gen POLR3B<sup>10</sup>.
- ▶ Síndrome de *Allan Herdon Dudley* por deficiencia del transportador monocarboxilado 8 MCT8 que se caracteriza por presentar resistencia a hormonas tiroideas (TSH y T3) retraso mental ligado al cromosoma X, hipotonía y atrofia muscular<sup>5</sup>.
- ▶ Leucodistrofia desmielinizante de comienzo en el adulto con herencia autosómico dominante por duplicaciones en el gen de LAMININA B1<sup>5</sup>.
- ▶ Enfermedad de Salla y su forma alélica conocida como la forma infantil Sialura, una enfermedad de atesoramiento con patrón de herencia autosómico recesivo causada por mutaciones en SLC17A5<sup>5</sup>.
- ▶ Otras formas severas de paraplejia espástica<sup>5</sup>.
- ▶ El nistagmo también ayuda a diferenciar de otras leucodistrofias (metacromática, adrenoleucodistrofia, Krabbe, Canavan)<sup>4</sup>.

La resonancia magnética es una herramienta que permite valorar el grado de mielinización, las imágenes en T2 tienen una alta sensibilidad para mostrar este proceso<sup>11</sup>. La ausencia de cambios mielinizantes en el puente y el cerebelo de un recién nacido, o ausencia de cambios relacionados a la mielinización en el brazo posterior de la cápsula interna, el esplenio del cuerpo calloso y las radiaciones ópticas en un niño de 3 meses de edad debe valorarse en imágenes de T1 en resonancia magnética sugieren leucodistrofia. Los hallazgos de imagen pueden no ser notorios hasta los 2 años de edad. La atrofia de los hemisferios cerebrales se puede observar en casos severos<sup>4</sup>, todos los pacientes presentan datos de leucodistrofia

difusa que se aprecia mejor en FLAIR o en T2, se muestra incremento en la intensidad de la sustancia blanca en hemisferios cerebrales, cerebelo y tallo<sup>8</sup>. La severidad clínica correlaciona con el grado de atrofia del cuerpo caloso y en la sustancia blanca con el grado de mielinización<sup>3</sup>. Lo que muestra mayor correlación con la severidad son las hiperintensidades difusas en T2 de tallo cerebral<sup>18</sup>. En algunos casos se puede utilizar espectroscopia por resonancia magnética como un patrón distintivo para diferenciar de otras leucodistrofias como sería el caso de SPG44 donde se han reportado niveles de colina, NAA, creatina normales<sup>5</sup>.

Un estudio reporta la medición de la distancia entre núcleos caudados y el diámetro transversal del cráneo, así como el área del cuerpo caloso y su correlación al compromiso funcional<sup>18</sup>. Los potenciales auditivos evocados de tallo cerebral son una herramienta útil para diferenciar entre la forma clásica y otros padecimientos. Un estudio reporta que las ondas III, IV y V están ausentes en esta patología. En un estudio reportan las pruebas auditivas periféricas normales y estudios auditivos centrales anormales, las emisiones otoacústicas se reportan normales, indicando función coclear normal<sup>19</sup>.

Hay una escala estandarizada por 4 neurólogos de la universidad del estado de Wayne que sirve para estimar el compromiso funcional en estos pacientes, haciendo 3 estadios según el puntaje 0<10 severo, 10 <20 moderado, >20 leve<sup>18</sup>.

Hasta hoy el tratamiento es sintomático<sup>5</sup>, los trastornos de la formación y mantenimiento de la mielina central como la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, comparten una falta de

oligodendroglia normalmente mielinogénica y una escasez de opciones de tratamiento disponibles. Estos trastornos pueden servir como pruebas en especial atractivas -principio para establecer la eficacia clínica de la terapia basada en células para la reparación de la mielina en el cerebro humano<sup>20</sup>. Los estudios de ensayos clínicos reportan seguridad posterior a un año del trasplante tanto en la evaluación clínica y radiológica reportando cambios locales y durables en la resonancia en las regiones trasplantadas<sup>18</sup>.

La aproximación terapéutica combina la inmunomodulación y terapia celular.

El papel de la neuroinflamación en esta enfermedad se ve reflejado en una respuesta positiva a los corticoesteroides desafortunadamente la neuroinflamación se reconoce como una característica de todas las enfermedades neurodegenerativas<sup>21</sup>.

#### Financiamiento

Para la realización del presente escrito no se recibió ningún financiamiento.

#### Conflictos de interés

Los autores declaran que no presentan ningún conflicto de interés relacionado con su actividad científica.

#### Agradecimientos

Por el apoyo de la UNAM, así como del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía para la realización de la presente revisión.

## Bibliografía

1. Gordon HB, Letsou A, Bonkowsky JL. The leukodystrophies. *Seminars in Neurol* 2014;34(3):312-20.
2. Kaye EM. Update on genetic disorders affecting white matter. *Pediatric Neurol* 2001;24(1):La11-24.
3. Inoue K. Brain atrophy in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Developmental Medicine Child Neurol* 2016;58(7):653.
4. Hudson LD. Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2: two faces of myelin loss from mutations in the same gene. *J Child Neurol* 2003;18(9):616-24.
5. Hobson GM, Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease, Pelizaeus-Merzbacher-like disease 1, and related hypomyelinating disorders. *Seminars in Neurol* 2012;32(1):62-7.
6. Yamamoto T, Shimojima K. Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenital anomalies* 2013;53(1):3-8.
7. Mierzevska H, Jamroz E, Mazurczak T, Hoffman D, Szczepanik E. Pelizaeus Merzbacher disease in patients with molecularly confirmed diagnosis. *Folia Neurophatol* 2016;54(1):59-65.
8. Lee ES, Moon HK, Park YH, Garbern J, Hobson GM. A case of complicated spastic paraplegia 2 due to a point mutation in the proteolipid protein 1 gene. *J Neurol Sci* 2004;224(1-2):83-7.
9. Xia J, Wang L. Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular diagnosis and therapy. *Intractable Rare Diseases Research* 2013;2(3):103-5.
10. Torii T, Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A. Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. *Pediatrics International* 2014;56(5):659-66.
11. Sumida K, Inoue K, Takanashi J, Sasaki M, Watanabe K, Suzuki M, et al. The magnetic resonance imaging spectrum of Pelizaeus-Merzbacher disease: a multicenter study of 19 patients. *Brain Development* 2016;38(6):571-80.
12. Zittel S, Nickel M, Wolf NI, Uyanik G, Glaser D, Ganos C, et al. Pelizaeus-Merzbacher-like disease presenting as complicated hereditary spastic paraplegia. *J Neurol* 2012;259(11):2498-500.
13. Kamekura N, Nitta Y, Takuma S, Fujisawa T. General anesthesia for a patient with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Anesth Prog* 2016;63:91-4.
14. Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K. Partial PLP1 deletion causing X-linked dominant spastic paraplegia type 2. *Pediatric Neurol* 2013;49(6):477-81.
15. Wight P. Effects of intron I sequences on Human PLP1 Expression: implications for PLP1-related Disorders. *ANS Neuro* 2017:1-6.
16. Laukka J, Kamholz J, Bessert D, Skoff R. Novel pathologic findings in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neurosci Lett* 2016; 627:222-32.
17. Espinosa E, Mera P, Cote J. Clínica y diagnóstico de la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher: descripción de 5 casos. *Rev Neurol* 2016;62(9): 411-4.
18. Laukka JJ, Stanley JA, Garbern JY, Trepanier A, Hobson G, Lafleur T, et al. Neuroradiologic correlates of clinical disability and progression in the X-linked leukodystrophy Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Neurolo Scien* 2013;335(1-2):75-81.

19. Coticchia J, Roeder M, Zuliani G, Gow A, Garbern J. Auditory testing profiles of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; Extra(6):23-9.
20. Osorio MJ, Rowitch DH, Tesar P, Wernig M, Windrem MS, Goldman SA. Concise review: stem cell based treatment of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Stem Cells* 2017;35(2):311-5.
21. Marteyn A, Baron A. Mini- Review Is Involvement of Inflammation Underestimated in Pelizaeus Merzbacher Disease?. *J Neurosci Res* 2016;94:1572-8.

---

Artículo sin conflicto de interés

---

© Archivos de Neurociencias

**Espectro de manifestaciones asociadas a X Frágil: Descripción clínica y molecular de *FMR1* en una familia Mexicana.**

De: **Archivos de Neurociencias** noreply@archivosdeneurociencias.com  
Asunto: Su artículo fue sometido exitosamente  
Fecha: 26 de agosto de 2018, 23:47  
Para: djodem@gmail.com

AD



Instituto Nacional de  
Neurología y Neurocirugía  
Manuel Velasco Suárez

Gracias por colaborar en la revista de [archivosdeneurociencias.com](http://archivosdeneurociencias.com). Su artículo se encuentra en proceso de revisión.



ARCHIVOS DE NEUROCIENCIAS

**INNN**

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

ISSN 0187 - 4705

**Título:**

Espectro de manifestaciones asociadas a X Frágil: Descripción clínica y molecular de FMR1 en una familia Mexicana.

**Title:**

Spectrum of manifestations associated with Fragile X: Clinical and molecular description of FMR1 in a Mexican family.

**Título corto:**

Espectro de manifestaciones asociadas a X Frágil

**Short title:**

Spectrum of manifestations associated with Fragile X

**Resumen:**

**Introducción:** El gen FMR1 presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población. La mutación completa de FMR1 resulta generalmente en la hipermetilación anormal del gen y la pérdida de su expresión se refleja clínicamente en el Síndrome de X frágil y los estados intermedios en el expandido CGG se han relacionado al Síndrome de Temblor / Ataxia relacionado a X Frágil y a la Falla Ovárica Prematura. **Casos Clínicos:** Se presentan 3 pacientes, pertenecientes a la misma familia en quienes se realizó la determinación del expandido CGG de FMR1 y su estado de metilación, así como una descripción de los cuadros clínicos que presentaban. **Conclusión:** En los pacientes con alteraciones en el expandido CGG de FMR1 las manifestaciones clínicas parecen representar un espectro continuo que va desde alteraciones de comportamiento hasta el típico síndrome de X frágil, por lo que siempre deberá mantenerse un alto índice de sospecha en pacientes con alteraciones neuropsiquiátricas de etiología no definida.

**Abstract:**

The FMR1 gene contains an expanded CGG trinucleotide repeats a microsatellite zone CGG whose repeats number is variable in the population. The complete FMR1 mutation usually results in abnormal hypermethylation of the gene and the loss of its expression, clinically reflected in the fragile X syndrome. The intermediate CGG repeats have been related to the Fragile X-related Tremor / Ataxia Syndrome and Premature Ovarian Failure. In this study we present 3 related patients: mother, daughter and son, in whom the determination of the expanded CGG of FMR1 and its methylation status was carried out, as well as a description of the clinical pictures are presented. We conclude that in patients with expanded FMR1, the clinical manifestations seem to represent a continuous spectrum ranging from behavioral alterations, movement disorders and neuropathy to typical fragile X syndrome. High index of suspicion should always be maintained in patients with complex neurological and neuropsychiatric manifestations of undefined etiology.

 Descargar archivo español

 Descargar archivo inglés

**Imágenes:**

 Descargar imágenes

**Palabras clave:**

FMR1. FMRP. Síndrome de X Frágil. Síndrome de Temblor Ataxia asociado a X Frágil. Discapacidad Intelectual ligada al X. Expandido CGG. Diagnóstico Molecular.

**Keywords:**

FMR1. FMRP. Fragile X syndrome. Tremor / Ataxia Syndrome associated with Fragile X. Intellectual Disability linked to the X chromosome. Expanded CGG. Molecular diagnosis

**Categoría:**

Reporte de casos clínicos

**Colaboradores:**

David José Dávila-Ortiz de Montellano, Rodríguez-Violante, Mayela, Sánchez-García, Danihui, Jara-Prado, Aurelio

## **Espectro de manifestaciones asociadas a X Frágil: Descripción clínica y molecular de *FMR1* en una familia Mexicana.**

Autores:

Jara-Prado, Aurelio (1). Rodríguez-Violante, Mayela (2). Sánchez-García, Danihui (3). Dávila-Ortiz de Montellano, David José (1).

(1) Departamento de Genética, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

(2) Clínica de Movimientos Anormales, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

(3) Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Autor Correspondiente:

David José Dávila Ortiz de Montellano.

[djdodem@gmail.com](mailto:djdodem@gmail.com)

Agradecimientos:

Se agradecen las facilidades prestadas por el Departamento de Genética y a la Clínica de Movimientos Anormales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y a la Universidad Nacional Autónoma de México, así como el apoyo económico prestado por CONACyT para la realización del presente reporte.

Conflicto de Intereses.

Los autores declaran que no presentan ningún conflicto de intereses respecto al presente trabajo.

Resumen:

Introducción: El gen *FMR1* presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población. La mutación completa de *FMR1* resulta generalmente en la hipermetilación anormal del gen y la pérdida de su expresión se refleja clínicamente en el Síndrome de X frágil y los estados intermedios en el expandido CGG se han relacionado al Síndrome de Temblor / Ataxia relacionado a X Frágil y a la Falla Ovárica Prematura.

Casos Clínicos: Se presentan 3 pacientes, pertenecientes a la misma familia en quienes se realizó la determinación del expandido CGG de *FMR1* y su estado de metilación, así como una descripción de los cuadros clínicos que presentaban.

Conclusión: En los pacientes con alteraciones en el expandido CGG de *FMR1* las manifestaciones clínicas parecen representar un espectro continuo que va desde alteraciones de comportamiento hasta el típico síndrome de X frágil, por lo que siempre deberá mantenerse un alto índice de sospecha en pacientes con alteraciones neuropsiquiátricas de etiología no definida.

Palabras Clave:

*FMR1*. FMRP. Síndrome de X Frágil. Síndrome de Temblor Ataxia asociado a X Frágil. Discapacidad Intelectual ligada al X. Expandido CGG. Diagnóstico Molecular.

Palabras de Cabecera:

Espectro clínico de X Frágil.

## Introducción

El gen *FMR1* se identificó en el año 1991 por clonación posicional en el locus FRAXA en el brazo largo del cromosoma X, (Xq27.3 OMIM \* 309550) [1, 2]. Está compuesto por 17 exones y abarca aproximadamente 18 kilobases (kb) y su producto transcripcional es un mRNA de 3.9 kb con distintos sitios de splicing. Se ha sugerido que el pre-mRNA transcripcional del gen puede generar hasta 20 isoformas de mRNA transcripcionalmente activo [3].

La región 5' no codificante del gen *FMR1* presenta una zona de tripletes CGG cuyo número es variable en la población. En la población normal esta variación oscila entre 6 y 55 repeticiones, siendo la media de 29-30 repeticiones [4] aunque esta frecuencia puede variar dependiendo de la población analizada. En México, el alelo normal de *FMR1* más frecuente es de 32 repetidos CGG, seguido de 30 y 34 repetidos (con un rango de entre 16 y 40 repetidos) [5, 6].

Al respecto, las Guías Prácticas del Colegio Americano de Genética Médica, definen a los alelos de *FMR1* como normales normales cuando presentan hasta 40 repeticiones CGG, de 41 - 54 repetidos se consideran en "zona gris" o alelos intermedios, la premutación se considera entre 55 y 199 repetidos, mientras que la mutación completa es considerada cuando se encuentran 200 o más repetidos [7].

La mutación completa de *FMR1* resulta generalmente en la hipermetilación anormal de la región CpG del promotor del gen [8] e inhibe su expresión como consecuencia de su metilación anormal [9]. Así, la ausencia de la proteína de *FMR1* (FMRP por sus siglas en inglés) es responsable del síndrome X frágil (FXS por sus siglas en inglés; OMIM #300624), un trastorno del neurodesarrollo que ocasiona discapacidad intelectual severa de etiología hereditaria ligada al cromosoma X y con fenómeno de anticipación, la cuál es la segunda causa genética (después del síndrome de Down) y la causa más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria en varones [4].

Se ha observado que el FXS es ocasionado por niveles de FMRP deficientes o ausentes debidos al silenciamiento de FMR1: la metilación del tracto de CGG, inducida por la mutación, aparentemente inhibe su función, la cual se cree es el transporte dendrítico de mRNAs, la regulación de la traducción y la plasticidad sináptica [10].

Aunque se considera que los niveles de mRNA de *FMR1* y FMRP son normales en el intervalo de premutación y por tanto no causan alteraciones [10], se ha demostrado que los niveles de mRNA de *FMR1* en diversos tejidos son dos a ocho veces superiores a lo normal, a pesar de un nivel normal o ligeramente bajo de FMRP [11], por lo que se plantea que el exceso de mRNA *FMR1* en los portadores de premutación ejerce un efecto de ganancia de función tóxica, lo que conduce a la desregulación de varias proteínas, incluyendo Lamina A/C y varias proteínas de choque térmico o respuesta al estrés [10].

En 2001 el Dr. Randi Hagerman informó sobre fenotipos patológicos, motores y cognitivos en sujetos portadores de premutación en *FMR1*, como son el síndrome de insuficiencia ovárica primaria asociada a X frágil (FXPOI) y el síndrome de Temblor / Ataxia asociado a X frágil (FXTAS), que en conjunto se denominan Trastornos Asociados a X Frágil (FXAD) [12], generando criterios diagnósticos específicos para estas entidades [13]. Sin embargo, al momento, existe evidencia de que los fenotipos asociados a alteraciones en el expandido CGG de *FMR1* pueden ser más extensos, incluyendo una gran gama de manifestaciones, por lo que se ha llegado a acuñar el término de “Espectro de alteraciones en X frágil” [14] llegando a considerarse como diagnóstico diferencial en diversas entidades neurológicas.

Actualmente se propone que la presencia de manifestaciones neurológicas en sujetos portadores de alelos largos de *FMR1* (en rango de zona gris o premutación) puede ser más diversa a lo antes reportado, incluyendo fenotipos que se superponen con alteraciones psiquiátricas, alteraciones de comportamiento, neurodesarrollo y neuropatías, entre otros [10, 14, 15].

En la población general, la premutación en FMR1 se observa en aproximadamente 1/250 mujeres y 1/800 varones, mientras que la mutación completa es mucho menos frecuente (1/2500-4000), estos datos varían de acuerdo a la población estudiada; por ejemplo, en España, la prevalencia estimada de portadores de la premutación es de 1/130 varones y 1/250 mujeres [9] mientras que en México es desconocida, sin embargo se han observado diferencias entre la longitud de los alelos normales en población mestiza y e indígena [6].

### Casos Clínicos

A continuación, se describen tres individuos pertenecientes a la misma familia (Figura 1) que acudieron a la consulta al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Ciudad de México, y fueron atendidos en la clínica de Movimientos Anormales y el Departamento de Genética guardando apego a la legislación local vigente, así como a la declaración de Helsinki.

Para establecer el diagnóstico de certeza en los casos analizados, previo consentimiento informado y aprobación por los comités de Investigación y Bioética locales, se extrajo DNA leucocitario a partir de sangre periférica por métodos estandarizados. En los tres casos se determinó la longitud del expandido CGG de *FMR1* con el Kit comercial AmpliDeX® PCR/CE FMR1 y su nivel de metilación con el Kit comercial AmpliDeX® mPCR FMR1 (Asuragen®) respectivamente, de acuerdo a lo descrito por la literatura y recomendaciones del proveedor [16, 17] empleando los instrumentos MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler (LabNet®, USA) y Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer [18].

Las características clínicas y hallazgos en imagen por resonancia magnética de encéfalo (MRI) de los pacientes presentados se muestran en la Tabla 1.

La MRI en T2 Flair realizada en II6 y III7 se encontró sin alteraciones y en III5 se

observó atrofia generalizada, sin embargo, en los tres casos el pedúnculo cerebeloso medio se encontró sin alteraciones (Fig 2).

El estudio molecular mostró que el paciente II6 era portador de un alelo de *FMR1* normal (32 repetidos CGG con un porcentaje de metilación del 42%) y un alelo en rango de premutación (87 repetidos CGG con un porcentaje de metilación del 78%). El paciente III5 presentó un único alelo en rango de mutación (>200 repetidos CGG y 100% de metilación), mientras que el paciente III7 presentó un alelo normal (32 repetidos CGG con 12% de metilación) y un alelo en rango de mutación completa (>200 repetidos CGG con solo 47% de metilación) (Figura 3).

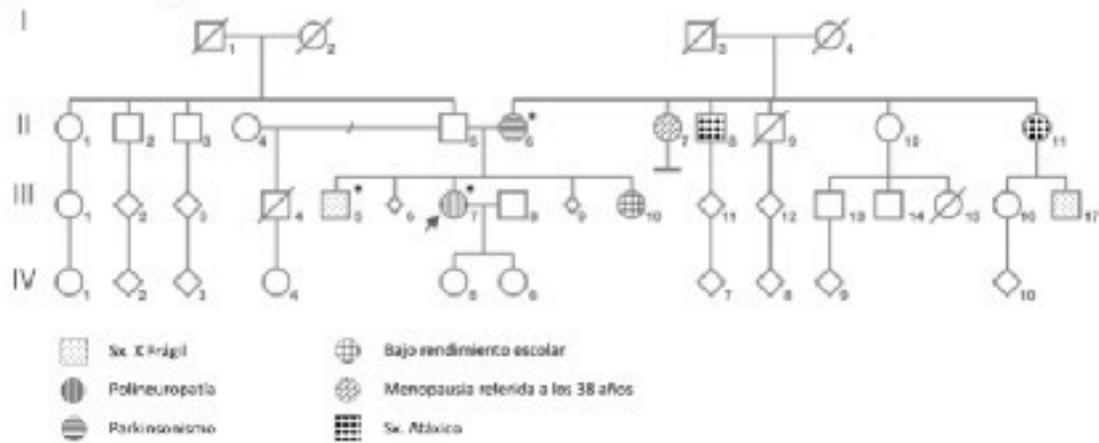
Las diferencias observadas entre las longitudes de los alelos en los tres pacientes, así como sus diferentes grados de metilación, deben condicionar distintos niveles de transcripción del mRNA de *FMR1* y diferentes grados de expresión de FMRP en los pacientes II6 y III7 que condicionan las evidentes diferencias fenotípicas; de la misma forma, la mutación con metilación completa en el paciente III5 debe condicionar una deficiencia completa de FMRP, lo que explica su cuadro clínico típico de FXS.

## Discusión

Al comparar los hallazgos fenotípicos en los tres pacientes, así como su correlación genotípica, es claro que, en las alteraciones del expandido CGG de *FMRP*, más que condicionar fenotipos distintos entre sí, existe un espectro continuo desde portadores de premutación sanos hasta pacientes con FXS, incluyendo fenotipos caracterizados por neuropatía, alteraciones de movimientos, alteraciones psiquiátricas y cognitivas, así como los clásicamente descritos (FXTAS típico y FXPOI) [19].

De esta manera, en pacientes con alteraciones neuropsiquiátricas, con o sin antecedentes familiares o hallazgos por MRI que orienten a alteraciones en *FMR1*, debe mantenerse una alta sospecha como diagnóstico diferencial.

Figura 1. Genealogía



Los pacientes referidos en el presente reporte son II6, III5 y III7 quien fue el caso índice.

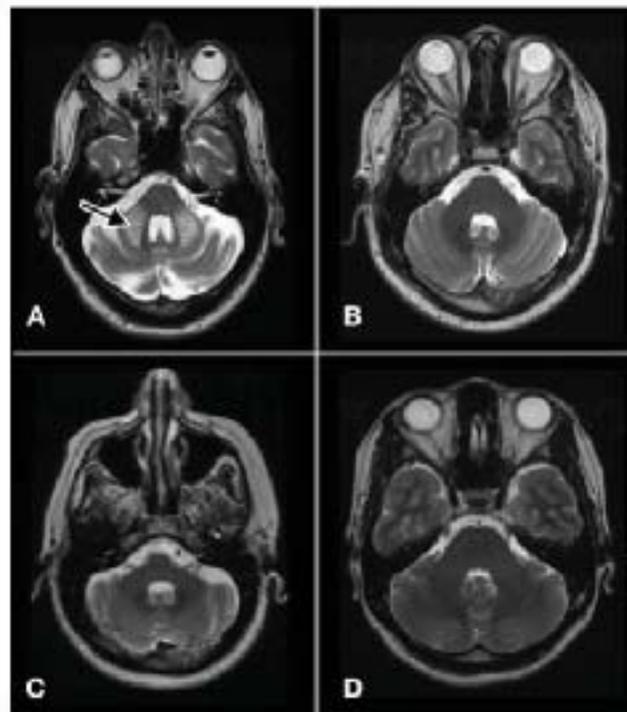


Figura 2. Hallazgos por MRI [Fig. T2]. (A) Paciente masculino de 70 años de edad con diagnóstico clínico y molecular de FXTAS. Flecha: Se observa hiperintensidad de pedúnculo cerebeloso medio (Signo MPC) típico de FXTAS. (B) paciente II6; (C) paciente III5 (D) paciente III7, en los tres pacientes presentados no se observa el signo MPC.

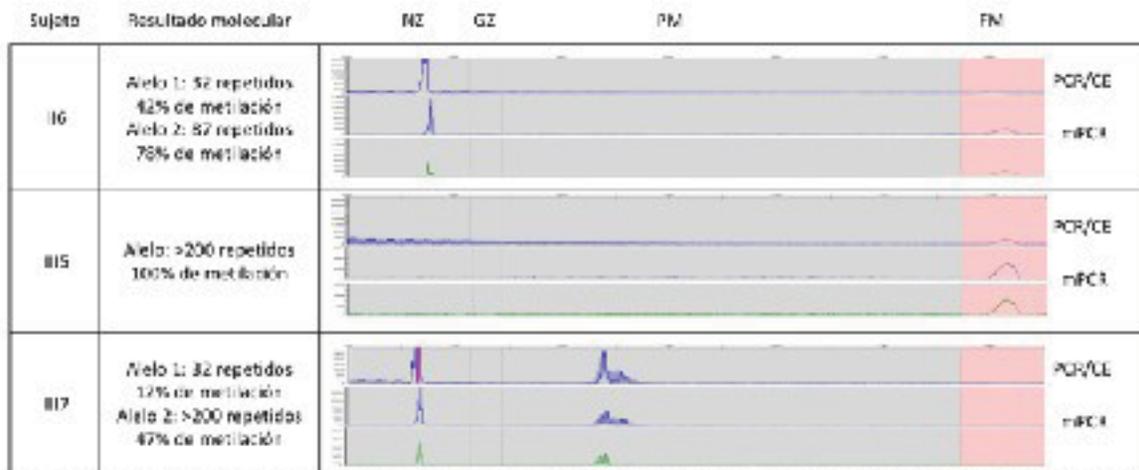


Figura 3. Hallazgos moleculares de FMRI (PCR / CE ; mPCR); PCR/CE: Reacción en cadena de polimerasa con triple cebador; mPCR: Reacción en cadena de polimerasa sensible a metilación; NZ: Longitud normal; GZ: Zona gris; PM: Pre Mutación; FM: Mutación Completa

Suje to	Edad	Clínica	MRI
II6	65 años	Temblor de intención en hemicuerpo derecho; temblor de reposo en lengua marcha sin braceo; bradicinecia; bradilalia, rigidez oromandibular. Hipoacusia mixta leve. Menopausia 41 años.	Normal
III5	35 años	Discapacidad intelectual, facies alargada con pabellones auriculares prominentes, macrorquidismo, movimientos coreoatetósicos.	Atrofia generalizada.
III7	40 años	Bajo rendimiento escolar (CI limítrofe); Facies alargada, hipotonía generalizada con inestabilidad a la marcha, Neuropatía sensitiva para vía propioceptiva de predominio derecho. Biopsia muscular con cambios miopáticos inespecíficos.	Normal

## Bibliografía

1. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 1991 May 31;65(5):905-14. PubMed PMID: 1710175. Epub 1991/05/31.
2. Capelli LP, Goncalves MR, Kok F, Leite CC, Nitrini R, Barbosa ER, et al. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: intrafamilial variability and the size of the FMR1 premutation CGG repeat. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2007 Apr 30;22(6):866-70. PubMed PMID: 17290448.
3. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 1994 Apr;3(4):684-5. PubMed PMID: 8069329. Epub 1994/04/01.
4. Capelli LP, Goncalves MR, Leite CC, Barbosa ER, Nitrini R, Vianna-Morgante AM. The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2010 Oct;68(5):791-8. PubMed PMID: 21049196.
5. Gonzalez-del Angel A, Vidal S, Saldana Y, del Castillo V, Angel Alcantara M, Macias M, et al. Molecular diagnosis of the fragile X and FRAXE syndromes in patients with mental retardation of unknown cause in Mexico. *Annales de genetique*. 2000 Jan-Mar;43(1):29-34. PubMed PMID: 10818218.
6. Barros-Nunez P, Rosales-Reynoso MA, Sandoval L, Romero-Espinoza P, Troyo-Sanroman R, Ibarra B. Genetic variation of the FMR1 gene among four Mexican populations: Mestizo, Huichol, Purepecha, and Tarahumara. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*. 2008 May-Jun;20(3):259-63. PubMed PMID: 18172867.
7. Hall DA, O'Keefe J A. Fragile x-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. *Tremor and other hyperkinetic movements*. 2012;2:<http://tremorjournal.org/article/view/56>. PubMed PMID: 23439567. Pubmed Central PMCID: 3570061.
8. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, et al. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell*. 1991 Feb 22;64(4):861-6. PubMed PMID: 1997211. Epub 1991/02/22.
9. Hagerman R, Hagerman P. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *The Lancet Neurology*. 2013 Aug;12(8):786-98. PubMed PMID: 23867198. Pubmed Central PMCID: 3922535.
10. Bourgeois JA, Coffey SM, Rivera SM, Hessel D, Gane LW, Tassone F, et al. A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. *The Journal of clinical psychiatry*. 2009 Jun;70(6):852-62. PubMed PMID: 19422761. Pubmed Central PMCID: PMC2705685. Epub 2009/05/09.
11. Lieb-Lundell CC. Three Faces of Fragile X. *Phys Ther*. 2016 Nov;96(11):1782-90. PubMed PMID: 27340198. Epub 2016/11/03.
12. Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, et al. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*. 2001 Jul 10;57(1):127-30. PubMed PMID: 11445641.
13. Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, Grigsby J, Zhang L, Brunberg JA, et al. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *American journal of human genetics*. 2003 Apr;72(4):869-78. PubMed PMID: 12638084. Pubmed Central PMCID: 1180350.
14. Lozano R, Rosero CA, Hagerman RJ. Fragile X spectrum disorders. *Intractable*

Rare Dis Res. 2014 Nov;3(4):134-46. PubMed PMID: 25606363. Pubmed Central PMCID: PMC4298643. Epub 2015/01/22.

15. Frait A, Vittal P, Szewka A, Bernard B, Berry-Kravis E, Hall DA. New observations in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) phenotype. *Front Genet.* 2014;5:365. PubMed PMID: 25368631. Pubmed Central PMCID: PMC4201107. Epub 2014/11/05.

16. Seneca S, Lissens W, Endels K, Caljon B, Bonduelle M, Keymolen K, et al. Reliable and sensitive detection of fragile X (expanded) alleles in clinical prenatal DNA samples with a fast turnaround time. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2012 Nov;14(6):560-8. PubMed PMID: 22921311. Epub 2012/08/28.

17. Grasso M, Boon EM, Filipovic-Sadic S, van Bunderen PA, Gennaro E, Cao R, et al. A novel methylation PCR that offers standardized determination of FMR1 methylation and CGG repeat length without southern blot analysis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2014 Jan;16(1):23-31. PubMed PMID: 24177047. Pubmed Central PMCID: PMC3873488. Epub 2013/11/02.

18. Rzonca SO, Gos M, Szopa D, Sielska-Rotblum D, Landowska A, Szpecht-Potocka A, et al. Towards a Better Molecular Diagnosis of FMR1-Related Disorders-A Multiyear Experience from a Reference Lab. *Genes.* 2016 Sep 02;7(9). PubMed PMID: 27598204. Pubmed Central PMCID: PMC5042390. Epub 2016/09/07.

19. Botta-Orfila T, Tartaglia GG, Michalon A. Molecular Pathophysiology of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome and Perspectives for Drug Development. *Cerebellum.* 2016 Oct;15(5):599-610. PubMed PMID: 27277287. Epub 2016/06/10.

**Low diagnostic accuracy of fragile X associated tremor/ataxia syndrome diagnostic criteria:  
Experience of a referral center.**

**Title: Low diagnostic accuracy of fragile X associated tremor/ataxia syndrome diagnostic criteria: Experience of a referral center.**

Authors MD, PhD, David José Dávila-Ortiz de Montellano (1). PhD, Aurelio Jara-Prado (1). MD, PhD, Mayela Rodríguez-Violante (2). MD, PhD, Alejandra Camacho-Molina (1). MD, PhD, Alessandra Carnevale (3). PhD, Ana Fresán-Orellana (4). PhD, Beatriz Camarena-Medellín (5). BSc, Danihui Sánchez-García (6). MD, PhD, Julio Sotelo (7).

- (1) Department of Genetics, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico.
- (2) Abnormal Movement Clinic, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico.
- (3) Mendelian Disease Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico.
- (4) Laboratory of Clinical Epidemiology. Clinical Research Branch, National Institute of Psychiatry, Mexico.
- (5) Pharmacogenetics Department, National Institute of Psychiatry, Mexico.
- (6) National Autonomous University of Mexico, School of Higher Studies Cuautitlán, Mexico.
- (7) Neuroimmunology Unit, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico.

Corresponding author:

David José Dávila-Ortiz de Montellano

Address: Insurgentes Sur No. 3877, La Fama, 14269 Tlalpan, Mexico City, Mexico.

Tel. +52 55 5606 3822 ext. 2018

e-Mail: djdodem@gmail.com

Word count: 2002

Running Title: Evaluation of the FXTAS diagnostic criteria

Key Words

*FMR1*

Ataxia

Fragile X Tremor Ataxia Syndrome (FXTAS)

Evaluation Studies

Diagnostic Techniques, Neurological

The authors declare that they do not have any conflict of interests related to this work.

This work was partly supported by CONACyT for the realization of this study (2015-2 -261271).

Abstract:

Introduction: Fragile X associated tremor / ataxia syndrome (FXTAS) is a poorly recognized neurodegenerative disease, usually present in males above 50 years, caused by the premutation of the CGG repeats in *FMR1* gene, also responsible for the premature ovarian failure, one of the most common causes of infertility in females, and X fragile syndrome, the most common cause of inherited intellectual disability in male. FXTAS comprise approximately 5% of ataxia of unknown etiology. Currently, the suspicion is based on clinical and radiological criteria, however, the constant expansion of its spectrum makes its diagnosis challenging, losing the opportunity to diagnose affected patients and preventing oportune genetic counseling, which includes information about the possibility of affected children with intellectual disability due to expansion of CGG repeats from premutation to a full mutation range of *FMR1*. Therefore, it is necessary to review the accuracy of the FXTAS diagnostic criteria as a basis to improve them. **Methods:** A population with tremor / ataxia was studied. The length of the CGG repeats of *FMR1* was determined by TP-PCR, determining the cases that corresponded to FXTAS and those of unknown etiology. The sensitivity and specificity of the clinical criteria of FXTAS was evaluated. **Results/Discussion:** Frequency of FXTAS in our population was higher than expected. The clinical criteria showed low sensitivity and specificity, which translates into a limited utility, highlighting the need for epidemiological studies aimed at defining the major clinical manifestations to develop a novel approach for clinical diagnostic of FXTAS and its associated phenotypes.

## Introduction

The *FMR1* gene is located at the FRAXA site on the long arm of chromosome X, at the Xq27.3 locus, it is composed of 17 exons and covers approximately 18 kilobases (kb). The 5'UTR region of *FMR1* presents a zone of CGG microsatellites that can be interrupted by AGG triplets. In the general population, its length has an average of 29-30 repetitions with two to three interruptions AGG<sup>1</sup>. The Practical Guides of the American College of Medical Genetics define normal *FMR1* alleles when they present up to 40 CGG repeats, 41 - 54 repeats are considered in gray zone or intermediate alleles (GZ); premutation is identified between 55 and 199 repeats (PM); and full mutation (FM), when 200 or more repetitions are found<sup>2</sup>. The relationship between the complete state of mutation in *FMR1* and Fragile X Syndrome (FXS) has been known since the early 1990s<sup>3</sup>; it is also responsible for premature ovarian failure (POF) and recent reports have present patients with other late-onset neurodegenerative symptoms<sup>4, 5</sup>.

In 2001, Hagerman et al. reported tremor and cognitive phenotype in healthy PM carriers of *FMR1*, relatives of subjects with XFS<sup>6, 7</sup>. Those phenotypes are currently known as fragile X-linked tremor / ataxia syndrome (FXTAS OMIM # 300623), and are described as intention tremor and cerebellar ataxia in men older than 50 years. In addition, there are isolated reports of individuals with additionally neurological and psychiatric features, males and females, carriers to GZ, PM or not methylated FM alleles of *FMR1*<sup>2</sup>.

Clinical and imaging criteria by magnetic resonance imaging (MRI) findings were developed to aid the clinical diagnosis of FXTAS (Table 1)<sup>8, 9</sup>. However, several additional manifestations have been described, such as the presence of neuropathy<sup>10</sup>, other abnormal movements such as dystonia<sup>11</sup> and less severe symptoms<sup>12</sup> which were not considered initially. Consequently, a broader spectrum of phenotypes associated with the expansion in *FMR1* have been described, and the pathophysiology of the disease is now better understood, nevertheless the clinical criteria described is insufficient for a comprehensive diagnosis of this syndrome<sup>13</sup>.

Various reports have pointed out the importance of reviewing and expanding the clinical and radiological criteria to allow a better identification of FXTAS cases, and their implications in offspring (POF and FXS)<sup>14, 15</sup>. A reviewed evaluation of current diagnostic criteria appears necessary.

In individuals with tremor / ataxia the prevalence of altered alleles (GZ, PM or FM) in *FMR1* varies from 0-4%, but increases (up to 5%) when the most frequent causes of hereditary ataxia

(SCA2, SCA3 and Friedreich's Ataxia) have been ruled out<sup>16</sup>. Ataxia, along with kinetic or intention tremor, are frequent symptoms in subjects with FXTAS<sup>17</sup>.

At the National Institute of Neurology and Neurosurgery (NINN), a tertiary referral center in Mexico City, over 1400 patients with tremor / ataxia have been detected in the last two decades. In about 60% of the cases (560 patients) a definitive diagnosis has not been established; extrapolating from other series reports, up to 5% of them could correspond to FXTAS cases<sup>18</sup>.

The objective of the present study was to determine the proportion of FXTAS cases by molecular analysis of *FMR1* in a sample of Mexican patients diagnosed with tremor / ataxia of unknown etiology, and assess the proposed diagnostic criteria in terms of sensitivity, specificity and diagnostic accuracy.

## Methods

The present study was approved by Research Ethics Committee, all patients signed the informed consent to participate in the study<sup>19, 20</sup>. An observational, cross-sectional, comparative study of cases was performed using the record and DNA samples of patients seen in the Departments of Genetics and the Movement Disorders Clinic of the NINN.

Patients with tremor / ataxia whose symptoms began after the age of 30 were included. In addition, the most frequent causes of hereditary ataxia in Mexico (SCA 2, 3, 7 and Friedreich's ataxia) were previously ruled out in all cases<sup>21</sup>. We excluded patients with chorea and dementia (suggestive of SCA 17), as well as those with seizures (frequent in SCA 10). Patients in whom sufficient genetic material could not be obtained, had diagnosis other than FXTAS, or who didn't give written informed consent were also excluded.

The following variables were included in the analysis: socio-demographic characteristics (age at diagnosis, current age, gender and socioeconomic level); clinical features of interest (intention tremor, ataxia, parkinsonism, moderate or severe cognitive impairment and deficit in executive functions). MRI findings associated with FXTAS (white matter lesions of the middle cerebellar peduncles, scattered white matter lesions and moderate to severe generalized atrophy) were also collected. Data from the, neuropsychiatry, neuroimaging and neurogenetics evaluations were recorded.

The DNA was obtained by standard methods from a peripheral blood sample. Allelic discrimi-

nation was performed by fragment methodology by TP-PCR with the commercial kit AmplideX® PCR / CE *FMR1* according to the supplier's specifications (PC-0164ENV6). Samples from patients were classified into the expanded alleles of *FMR1*- 40 or more Repeated CGG - (FXTAS Group) and those with normal length alleles (Non FXTS Group)<sup>22, 23</sup>.

## Statistical analysis

Tests used: We used as non parametric tests the Fisher's Exact Test for categorical variables and the Mann–Whitney U test for continuous variables, to contrast FXTAS and non-FXTAS groups. The molecular study of *FMR1* was used as "gold standard" to evaluate diagnostic accuracy, sensitivity and specificity of the diagnostic criteria using Wilson's point method. ROC curve (receiver operating characteristic) was plotted to determine the area under the curve (AUC). Statistical significance was set at <0.05.

## Results

The study included 106 patients, mean age was 58 years (S.D. = 10.07, range 39-78 years). The mean age at symptom onset was 46 years (S.D. = 8.70, range 30 - 67 years); 49% (n = 52) were men and 51% (n = 54) women. A total of 160 alleles of *FMR1* were analyzed.

From the 160 alleles, 149 were found within the normal range with a mean extension of 29 CGG repeats (S.D. = 3, range 19 - 39) of which, 39% had 29 repeats CGG (n = 58), 34% of 30 repeats (n = 51); the remaining 27% (n = 35) were found in a range of 19 to 39 CGG repeats with low frequencies (0.9 - 8.5%). Regarding its length, 90% (n = 95) of the patients carried alleles within normal range and 10% (n = 11) had expansion, distributed as follows: 27% (n = 3 from all patients with expansion) had one allele in the range of GZ, 64% (n = 7 from all patients with expansion) in the range of PM and one patient with FXTAS (9%) carrying an allele with a complete mutation. In consequence, the two groups were: FXTAS patients (n = 11) and non FXTAS patients (n = 95). Between both groups no statistical differences were found regarding age of onset, current age and tender ( $p > 0.05$ ), whereas high socioeconomic level was more frequent in the group of FXTAS patients ( $p = 0.008$ ) (Table 2).

Cognitive impairment occurred more frequently in patients with FXTAS ( $p < 0.05$ ), while the other clinical and imaging findings showed no differences between groups (Table 3).

Finally, patients were regrouped according to clinical criteria in: molecular screening required (cases with possible, probable and definitive diagnosis of FXTAS), considered likely to have abnormal *FMR1* allele, and those that would not require molecular study (unlikely cases of FXTAS). Sensitivity,

specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and diagnostic accuracy (AD) using the molecular diagnosis (expansion of *FMR1* > 40 repetitions CGG) as gold standard were calculated. The results obtained showed that the diagnostic accuracy of the criteria was low, according sensitivity, specificity and the area under the curve were non-reliable either for diagnostic suspicion or for definitive diagnosis of FXTAS in sample evaluated (Table 4, Figure 1).

## Discussion

The aim of the present study was to determine the proportion of FXTAS cases by molecular analysis of *FMR1* in a sample of Mexican patients and to assess the accuracy of the diagnostic criteria for FXTAS<sup>8, 9, 24</sup>. It was noted that the proportion of patients with FXTAS, corroborated by molecular study, surpassed the expected 5% according to previous reports<sup>16, 17, 25</sup>. This could be partly attributed to the study design; as only cases in whom common causes of ataxia were ruled out, that had sporadic inheritance pattern or were suggestive of inheritance linked to the chromosome X, and a late onset (onset of symptoms after 30 years of age) were included. These criteria was used in order to decrease the possibility of including autosomal dominant or autosomal recessive cases. In addition, he NINN is a national reference center for adult movement disorders (referral bias). On the other hand, the number of cases obtained could also be interpreted as indicator that FXTAS is not a rare pathology, particularly in specialized neurological centers where it should be included as differential diagnosis in patients with abnormal movements, specifically in patients with ataxia, in whom it seems to be under-diagnosed.

Another interesting observation is that the proportion of male and female patients with FXTAS was close to 50%, in contrast to that reported in the literature, which classically describes that up to 40% of male carriers of altered alleles of *FMR1* present symptoms in comparison to 8-16% of women<sup>12, 24, 26</sup>. Although our population of patients diagnosed with FXTAS is relatively small, our findings suggest that the clinical picture could be defined as a spectrum, where at one extreme are severe cases, represented by the clinical picture of XFS and autism, through moderate forms, represented by FXTAS, ataxia, parkinsonism and executive alterations to the other extreme where there are isolated mild manifestations. These cases may go unnoticed or present lack of penetrance<sup>27-29</sup>. These observations on the frequency and distribution of FXTAS should not be interpreted as population indicators, since the present study was conducted in a simple of patients from a reference center and does not directly reflect the scope of the pathology in our country.

As hypothesized, the current clinical criteria for diagnosis of FXTAS<sup>8, 9, 24</sup> had a very low sensi-

tivity and specificity in our sample; suggesting a limited utility for diagnosis or for screening purposes for further molecular studies.

The high heterogeneity of clinical characteristics in patients with alterations of *FMR1* was an important limitation to the study, and could be explained by an increase in methylation of the gene in the presence of expanded CGG, decreasing the normal transcription of the gene and therefore the function of FMRP. However, it may also deregulate it, causing RAN transcription as well as production of dysfunctional proteins that lead to intracytoplasmic aggregates and sequestration of associated proteins<sup>30, 31</sup>. Thus, it would be expected that the clinical picture will not be defined only by the length of the repeated CGG of *FMR1*, but also by its levels of methylation, as well as by the mosaicisms associated with this type of mutation, the presence of antisense transcripts with possible toxic function<sup>32, 33</sup>, the kidnapping of other functional proteins, and by the possible involvement of modifier genes<sup>34, 35</sup>.

The diverse clinical characteristics described in patients with alterations in *FMR1*, besides of the typical image of FXS or FXTAS, such as the presence of dystonia, behavioral and neuropathic alterations make it necessary to design specific clinical and epidemiological studies to integrate the spectrum of this pathology, improve its index of clinic suspicion, have a timely diagnosis, encourage interventions such as genetic counseling and avoid limiting FXTAS to a determined clinical picture, expanding its phenotype to a broad clinical spectrum<sup>29, 36-38</sup>.

Our study had limitations. Despite the fact that the number of patients with FXTAS exceeded our expectations, not enough were found to denote a common pattern, due to the multiple manifestations of this syndrome. In addition, the design of the present study was not adequate to establish the prevalence of each symptom and to determine the incidence of the disease in our population.

Our results indicate that patients with FXTAS are not properly diagnosed, or are underdiagnosed with the actual clinic criteria, so it is necessary to conduct clinical and epidemiological studies to improve diagnostic criteria.

**Table 1.** Diagnostic criteria of FXTAS

Evaluation	Class	Criteria
Clinical	Major	Intent tremor
		Gait ataxia
	Minor	Parkinsonism
		Neuropathy
Radiological	Major	Alterations in executive functions
		Moderate to severe deficit in short-term memory
	Minor	Lesions in medial cerebellar peduncle and / or brainstem
		Lesions of white substance in the splenium of corpus callosum
Definitive (D)	Major	Lesions in cerebral white matter
		Moderate to severe generalized cerebral atrophy
Diagnostic category		
Definitive (D)		a) A mayor clinical criterion + A mayor radiological criterion b) A mayor clinical criterion + presence of inclusions neuronal and astrocytic in the post mortem-examination of brain tissue
Probable (Pr)		(a) A major radiological criterion + a minor clinical criterion (b) Two major clinical criteria
Possible (Po)		A major clinical criterion + a minor radiological criterion
Improbable (Ip)		Absence of the criteria to name the case as definitive, probable or possible

Table 2. Comparison of sociodemographic characteristics between FXTAS and non-FRXT patients

		<b>FXTAS Group (n = 11) % (n)</b>	<b>Non FXTAS Group (n = 95) % (n)</b>	<b>p</b>
<b>Gender</b>	Male	45.5% (5)	49.5% (47)	>1.00*
	Female	54.5% (6)	50.5% (48)	
<b>Socioeconomic level</b>	Low	9.1% (1)	20% (19)	<b>0.004*</b>
	Médium	36.4% (4)	66.3% (63)	
	High	<b>54.5% (6)</b>	13.7% (13)	
		<b>Mean (S.D.)</b>	<b>Mean (S.D.)</b>	
<b>Age</b>	Onset of ataxia	47.00 yr (10.9)	46.18 yr (8.45)	>0.756**
	Current	53.73 yr (10.27)	58.68 yr (9.93)	>0.222**

\*Fisher's Exact Test

\*\*Mann–Whitney *U* test

S.D. Standard Deviation.

Table 3. Findings in the sample of patients with tremor / ataxia and alteration in FMR1 respect to the diagnostic criteria.

Evaluation	Class	Criteria	Grupo		p*
			FXTAS (n=11) % (n)	No FXTAS (n=95) % (n)	
Clinical	Major	Intent tremor	36.4% (4)	20% (19)	0.190
		Gait ataxia	100% (11)	100% (95)	‡
	Minor	Parkinsonism	36.4% (4)	28.4% (27)	0.407
		Neuropathy	45.5% (5)	26.3% (25)	0.163
		Alterations in executive functions	<b>36.4% (4)</b>	<b>7.4% (7)</b>	<b>0.015</b>
Radiological	Major	Moderate to severe deficit in short-term memory	0% 0	4.2% (4)	0.641
		Lesions in cerebellar peduncle medium and / or brainstem	9.1% (1)	0% 0	0.104
	Minor	Lesions of the white substance in the splenium of the corpus callosum	0% 0	0% 0	‡
		Lesions in cerebral white matter	18.2% (2)	8.4% (8)	0.277
		Moderate to severe generalized cerebral atrophy	45.5% (5)	42.1% (40)	0.538

\* Fisher's Exact Test

‡ No statistical test was calculated since it is a constant

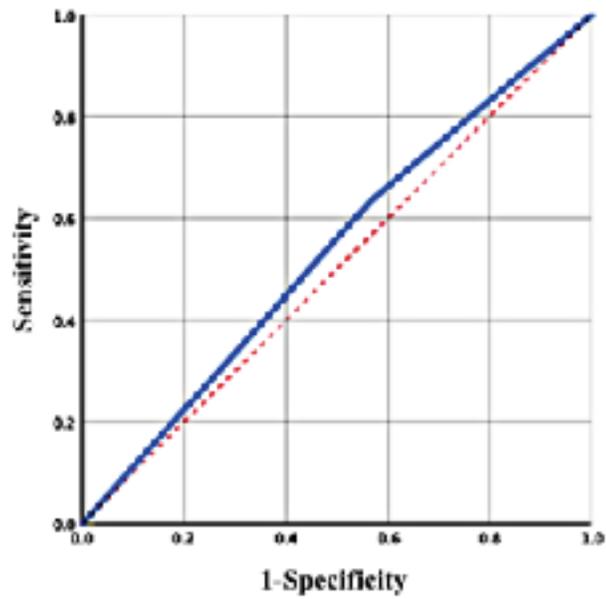
**Table 4.** Evaluation of the FXTAS Diagnostic Criteria as an indication for molecular screening test of *FMRI* \*.

	Molecular diagnosis of <i>FMRI</i>				Diagnostic Test Evaluation (Wilson points)	
	Positive		Negative			
	%	n (11)	%	n (95)		
Requires screening	36.4%	4	56.8%	54	Sensitivity 95% CI	36.36% (S.D. 15.17-64.62)
					Specificity (95% CI	43.16% (C.I. 33.66-53.19)
					PPV 95% CI	6.897% (C.I. 2.714-16.43)
					NPV 95% CI	85.42% (C.I. 72.83-92.75)
Does not require screening	63.6%	7	43.2%	41	DA 95% CI	42.45% (C.I. 33.47-51.96)

PPV: Positive Predictive Value; NPV: Negative Predictive Value; DP: Diagnostic accuracy  
Requires screening: Patients with a clinical diagnosis of Definitive, Probable and Possible FXTAS.

Does not require screening: Does not meet diagnostic criteria of FXTAS

\* p = 0.069 (Fisher's exact test)



**Figure 1.** ROC curve (blue) of the FXTAS Diagnostic Criteria applied as a criterion for molecular screening and findings by molecular study of *FMR1*.  
Area under the curve = 0.534 Deviation = 0.091 I.C 95%. 0.355 - 0.731) p = 0.713

## References

1. Capelli LP, Goncalves MR, Leite CC, Barbosa ER, Nitrini R, Vianna-Morgante AM. The fragile x-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68(5):791-8.
2. Hall DA, O'Keefe J A. Fragile x-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2012;2:<http://tremorjournal.org/article/view/56>.
3. Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;57(5):1006-18.
4. Lieb-Lundell CC. Three Faces of Fragile X. *Phys Ther* 2016;96(11):1782-1790.
5. Raspa M, Wheeler AC, Riley C. Public Health Literature Review of Fragile X Syndrome. *Pediatrics* 2017;139(Suppl 3):S153-S171.
6. Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, et al. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2001;57(1):127-30.
7. Munoz DG. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2002;58(6):987; author reply 987-8.
8. Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, et al. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet* 2003;72(4):869-78.
9. Birch RC, Cohen J, Trollor JN. Fragile X-associated disorders: Don't miss them. *Aust Fam Physician* 2017;46(7):487-491.
10. Hall DA, Berry-Kravis E. Fragile X syndrome and fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Handb Clin Neurol* 2018;147:377-391.
11. Alvarez-Bravo G, Fernández-Carril JM, López-Zuazo I, Yusta-Izquierdo A, Abrol T, Alsinaidi O. A novel clinical phenotype of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome. *Movement Disorders Clinical Practice* 2018;Accepted Author Manuscript.
12. Juncos JL, Lazarus JT, Graves-Allen E, et al. New clinical findings in the fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS). *Neurogenetics* 2011;12(2):123-35.
13. Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol* 2007;6(1):45-55.
14. Apartis E, Blancher A, Meissner WG, et al. FXTAS: new insights and the need for revised diagnostic criteria. *Neurology* 2012;79(18):1898-907.
15. Renaud M, Perriard J, Coudray S, et al. Relevance of corpus callosum splenium versus middle cerebellar peduncle hyperintensity for FXTAS diagnosis in clinical practice. *J Neurol* 2015;262(2):435-42.
16. Seixas AI, Maurer MH, Lin M, et al. FXTAS, SCA10, and SCA17 in American patients with movement disorders. *Am J Med Genet A* 2005;136(1):87-9.
17. Hagerman R, Hagerman P. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol* 2013;12(8):786-98.
18. Rasmussen A, Matsuura T, Ruano L, et al. Clinical and genetic analysis of four Mexican families with spinocerebellar ataxia type 10. *Ann Neurol* 2001;50(2):234-9.
19. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191-4.
20. Annexe 2. WMA Declaration of Taipei on ethical considerations regarding health databases and biobanks. Adopted by the 53rd WMA General Assembly, Washington, DC, USA, October 2002 and revised by the 67th WMA General Assembly, Taipei, Taiwan, October 2016. *J Int Bioethique Ethique Sci* 2017;28(3):113-117.
21. Alonso E, Martinez-Ruano L, De Biase I, et al. Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Mov Disord* 2007;22(7):1050-3.

22. Chen L, Hadd A, Sah S, et al. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. *J Mol Diagn* 2010;12(5):589-600.
23. Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, et al. A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem* 2010;56(3):399-408.
24. Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, et al. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA* 2004;291(4):460-9.
25. Hall DA, Berry-Kravis E, Jacquemont S, et al. Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 2005;65(2):299-301.
26. Hall DA, Birch RC, Anheim M, et al. Emerging topics in FXTAS. *J Neurodev Disord* 2014;6(1):31.
27. Biancalana V, Toft M, Le Ber I, et al. FMR1 premutations associated with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in multiple system atrophy. *Arch Neurol* 2005;62(6):962-6.
28. Magana JJ, Tapia-Guerrero YS, Velazquez-Perez L, et al. Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet* 2014;85(2):159-65.
29. Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin Genet* 2018;93(2):197-205.
30. Green KM, Linsalata AE, Todd PK. RAN translation-What makes it run? *Brain Res* 2016;1647:30-42.
31. Botta-Orfila T, Tartaglia GG, Michalon A. Molecular Pathophysiology of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome and Perspectives for Drug Development. *Cerebellum* 2016;15(5):599-610.
32. Jiraanont P, Kumar M, Tang HT, et al. Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17(11):1023-1032.
33. Rajaratnam A, Shergill J, Salcedo-Arellano M, Saldarriaga W, Duan X, Hagerman R. Fragile X syndrome and fragile X-associated disorders. *F1000Res* 2017;6:2112.
34. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. FMR1 and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med* 2011;29(4):299-307.
35. Georgieva D, Dimitrov R, Kitanova M, Genova G. New X-chromosomal interactors of dFMRP regulate axonal and synaptic morphology of brain neurons in *Drosophila melanogaster*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014;28(4):697-709.
36. Hagerman RJ, Coffey SM, Maselli R, et al. Neuropathy as a presenting feature in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;143A(19):2256-60.
37. Yadav R, Pal PK, Krishna N, Amar BR, Jain S, Purushottam M. Electrophysiological evaluation of spinocerebellar ataxias 1, 2 and 3. *J Neurol Sci* 2012;312(1-2):142-5.
38. Liang L, Chen T, Wu Y. The electrophysiology of spinocerebellar ataxias. *Neurophysiol Clin* 2016;46(1):27-34.

## C. Participación en foros de difusión



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

La Dirección de Enseñanza y Desarrollo Académico

Otorga el presente

# RECONOCIMIENTO

al  
**Dr. David Dávila Ortiz de Montellano**

por su participación como ponente en el

**X Curso de actualización en genética médica**

con el tema:

**Enfermedades por amplificación de microsatélites**

Ciudad de México, a los veinticuatro días del mes de enero del 2018

Dra. Rebeca Gómez Chicho Velasco  
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso  
Profesor titular



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía**  
**Manuel Velasco Suárez**



Otorga la presente  
**Constancia**

A:

David Dávila Ortiz de Montellano<sup>1</sup>, Aurelio Jara Prado<sup>1</sup>, Danihui Sánchez García<sup>2</sup>, Jorge Luis Guerrero Camacho<sup>1</sup>, Mayela Rodríguez Violante<sup>3</sup>.

Por su participación en la **XXXIII Reunión Anual de Investigación**, llevada a cabo en la Ciudad de México durante los días 17 y 18 de mayo de 2018, con el cartel:

**EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE FXTAS EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON TEMBLOR/ATAXIA.**

Ciudad de México, a 18 de mayo de 2018.

  
**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

  
**ING. MARÍA ANGÉLICA GARCÍA GUZMÁN**  
COORDINADORA GENERAL

# Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Manuel Velasco Suárez



Dirección de Enseñanza

Otorga la presente



CONSTANCIA

SALUD  
SECRETARÍA DE SALUD

75  
AÑOS  
1943 - 2018

**David José Dávila Ortiz de Montellano**

A:

Por su participación como **PONENTE** en el curso  
“4º Simposio, Tópicos Selectos en Neurogenética”  
Con el tema: “Síndrome Tremor-Ataxia asociado al X frágil”

Ciudad de México, 26 de julio de 2018

  
DR. PABLO LEÓN ORTÍZ  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA





DR. JAVIER AVENDAÑO MÉNDEZ PADILLA  
SUBDIRECTOR DE FORMACIÓN, ACTUALIZACIÓN Y  
CAPACITACIÓN DE RECURSOS HUMANOS



