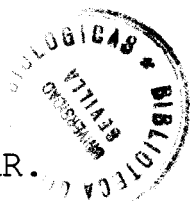


TD  
406

R.14471



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

06 FEB. 1997

*Reera Caff*

# RETRASO MENTAL HEREDITARIO Y

## SÍNDROME X FRÁGIL.

ESTUDIO DE AFECTOS Y PORTADORES  
POR ANÁLISIS DEL ADN.

YOLANDA DE DIEGO OTERO

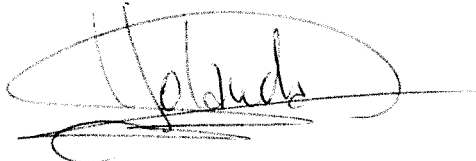
Tesis presentada para optar al  
de la grado de doctor en Biología por  
la Universidad de Sevilla.  
Sevilla, 1997.

TD  
365

**RETRASO MENTAL HEREDITARIO Y SÍNDROME X FRÁGIL.**

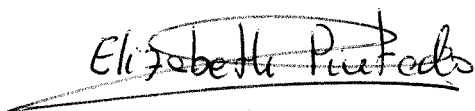
**ESTUDIO DE AFECTOS Y PORTADORES POR ANÁLISIS DEL ADN.**

AUTORA:



YOLANDA DE DIEGO OTERO  
Licenciada en Biología

DIRECTORA DE TESIS:



Dra. Elizabeth Pintado San Juan  
Prof. Titular de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular.  
Universidad de Sevilla.

CODIRECTOR DE TESIS:



Dr. Miguel Lucas Lucas.  
Prof. Titular de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular.  
Universidad de Sevilla.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
41009 SEVILLA

---

Elizabeth Pintado Sanjuán, Profesora Titular de Bioquímica y  
Biología Molecular de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Yolanda de Diego Otero, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "RETRASO MENTAL HEREDITARIO Y SÍNDROME X FRÁGIL. ESTUDIO DE AFECTOS Y PORTADORES POR ANÁLISIS DEL ADN", y que este trabajo reúne las características para que, una vez defendido ante el Tribunal correspondiente, se presente para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 5 de Febrero de 1997

Elizabeth Pintado Sanjuán



TELFs. (95) 455 98 52 - 53 - 54

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
41009 SEVILLA

---

Miguel Lucas Lucas, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Yolanda de Diego Otero, licenciada en Biología, ha realizado bajo su codirección el trabajo titulado "RETRASO MENTAL HEREDITARIO Y SÍNDROME X FRÁGIL. ESTUDIO DE AFECTOS Y PORTADORES POR ANÁLISIS DEL ADN", y que este trabajo reúne las características para que, una vez defendido ante el Tribunal correspondiente, se presente para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 5 de Febrero de 1997

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miguel Lucas Lucas'.

Miguel Lucas Lucas



## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>1. EL SÍNDROME X FRÁGIL</b>	7
1.1 Descripción del síndrome	14
1.1.1 Datos neurológicos y psíquicos	17
1.2 Diagnóstico del síndrome X frágil	21
<b>2. LOCALIZACIÓN DEL GEN FMR-1</b>	23
2.1 Estructura del gen FMR-1	25
2.1.1 Inestabilidad en la zona de triplete	30
2.1.2 Expansiones y retracciones	31
2.1.3 Mutaciones puntuales y deleciones	32
2.1.4 El síndrome X frágil y otras patologías	33
2.2 Metilación de la isla CpG reguladora del gen FMR-1	34
2.3 Otros polimorfismos ligados al gen FMR-1	35
2.4 Modelo para explicar la mutación X frágil	36
<b>3. EXPRESIÓN DEL GEN FMR-1</b>	39
3.1 Estudios sobre la proteína FMR-1	41
3.2 Modelo animal del síndrome X frágil	43
<b>4. FRAGILIDADES PRÓXIMAS AL LOCUS FRAXA</b>	46

## INDICE

---

5. EL ADN INESTABLE, UN NUEVO TIPO DE MUTACIÓN GENÉTICA	50
5.1 Mecanismos de expansión de las repeticiones	55
<b>OBJETIVOS</b>	57
1. OBJETIVOS GENERALES	57
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	59
1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	59
2. ENZIMAS, SOLUCIONES Y REACTIVOS	60
3. EXTRACCIÓN DEL ADN	63
3.1 Método de precipitación salina	64
3.2 Extracción con perclorato sódico	65
3.3 Extracción con fenol	66
4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADN	66
5. TÉCNICA DE "SOUTHERN-BLOT" PARA EL ESTUDIO DE LOS LOCI FRAXA Y FRAXE.	67
5.1 Obtención de las sondas	67
5.2 Marcaje de la sonda	69
5.3 Digestión del ADN	73
5.4 Electroforesis y tratamiento del gel	74
5.5 Transferencia y fijación del ADN	75
5.6 Hibridación con la sonda marcada con dCTP ( $\alpha$ - <sup>32</sup> P)	76
5.7 Autorradiografía	77
6. TÉCNICA DE PCR PARA EL ESTUDIO DE LOS LOCI FRAXA, DXS548 Y FRAXE	77
6.1 Selección de los cebadores	77

6.2	Condiciones de la reacción	79
6.3	Programa del termociclador	80
6.4	Separación de los fragmentos amplificados	80
6.4.1	Electroforesis en gel de agarosa	80
6.4.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida	81
6.5	Autorradiografía	82
7.	ESTUDIO DEL DESPLAZAMIENTO DE LOS CEBADORES POR LA TÉCNICA DE "DOT-BLOT"	82
8.	SECUENCIACIÓN DE DISTINTAS ZONAS DEL LOCUS FRAXA	83
8.1	Secuenciación de la zona de tripletes de ADN genómico	83
8.1.1	Marcaje del cebador con dATP ( $\gamma$ - <sup>32</sup> P)	85
8.1.2	Reacción de secuenciación	85
8.2	Secuenciación de los tripletes de ADNc de rata	87
8.3	Secuenciación de la zona adyacente a los tripletes	87
	<b>RESULTADOS</b>	89
A)	DETECCIÓN DE SUJETOS AFECTOS Y PORTADORES DEL SÍNDROME X FRÁGIL, CON LA TÉCNICA DE "SOUTHERN-BLOT"	90
1.	Digestión con EcoRI	90
1.1	Hibridación con la sonda StB12.3	93
1.2	Hibridación con la sonda Ox1.9	95
2.	Digestión doble con EcoRI y EagI	95
2.1	Hibridación con la sonda StB12.3	98
2.2	Hibridación con la sonda Ox1.9	104
3.	Digestión doble con HindIII y Sac II	104
3.1	Hibridación con la sonda StB12.3	104
4.	Resultados individualizados	107
5.	Mosaicismo en células sanguíneas	112
B)	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TRIPLETES DEL LOCUS FRAXA	116
1.	Amplificación de los tripletes del locus FRAXA	116

## INDICE

---

1.1 Desplazamiento de los cebadores	120
2. Resultados individualizados	123
3. Amplificación simultánea de los loci FRAXA y DXS548	127
4. Frecuencias alélicas del locus FRAXA	127
5. Estudio prenatal del síndrome X frágil	129
5.1 Ejemplo de un diagnóstico por PCR	129
C) POLIMORFISMO (CA/TG) <sub>n</sub> DEL LOCUS DXS548	133
1. Locus DXS548 en la población estudiada	133
2. Estudio haplotípico	135
D) SECUENCIACIÓN DE DISTINTAS ZONAS DEL LOCUS FRAXA	139
1. Secuenciación de los triplete	140
2. Secuenciación de la zona adyacente a los triplete	145
3. Homología del locus FRAXA entre la rata y el hombre	148
E) RELACIÓN GENOTIPO/FENOTIPO EN UNA FAMILIA X FRÁGIL	148
1. Árbol genealógico	148
2. Resultados del "Southern-blot"	152
3. Resultados de la PCR	152
4. Datos físicos y psicológicos	155
5. Estudio en tejidos de distinto origen embrionario	158
F) ESTUDIO DEL POLIMORFISMO (CCG/CGG) <sub>n</sub> DEL LOCUS FRAXE	160
1. Digestión con las enzimas HindIII y SacII	160
1.1 Hibridación con la sonda Ox.E20	162
1.2 Resultados individualizados	162
2. Cálculo del número de triplete del locus FRAXE	165
2.1 Resultados individualizados	167
3. Frecuencias alélicas del locus FRAXE	168
G) DATOS GLOBALES DEL ESTUDIO DEL SÍNDROME X FRÁGIL EN ANDALUCÍA	168
1. Número de muestras estudiadas por provincias	168
2. Prevalencia del síndrome X frágil	170

---

3. Portadores en la población estudiada	173
3.1 Varones con premutación y retraso mental profundo	174
4. Familias estudiadas	174
4.1 Familias X frágiles. Árboles genealógicos y datos moleculares	174
4.2 Familias con retraso mental, no X frágiles. Árboles genealógicos y datos moleculares	187
<b>DISCUSIÓN</b>	191
1. ANÁLISIS DEL ADN FRENTE AL ESTUDIO CITOGÉNÉTICO	192
2. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO	193
3. CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES	195
4. DIAGNÓSTICO PRENATAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL	197
5. EVOLUCIÓN DE LA ZONA FRAXA	198
6. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN EL SÍNDROME X FRÁGIL	200
7. VARIABILIDAD DE LA METILACIÓN EN EL LOCUS FRAXA	202
8. MOSAICISMO EN CÉLULAS SANGUÍNEAS	203
9. BAJA PREVALENCIA DE LA EXPANSIÓN DEL LOCUS FRAXE	204
10. PREVALENCIA DEL SÍNDROME X FRÁGIL	204
<b>CONCLUSIONES</b>	207
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	211

## INTRODUCCIÓN

### 1. EL SÍNDROME X FRÁGIL.

El retraso mental es una afección muy frecuente, 1 de cada 100 nacidos presenta algún tipo de deficiencia mental, sin embargo las causas son muy variadas y en muchos casos desconocidas. Se sabe desde hace mucho tiempo que, en la población general, hay una gran preponderancia de varones respecto a mujeres con retraso mental. En U.S.A. se calcula que existe un 24% más de varones que de mujeres retrasados (Johnson 1987). En 1969 Lehrke propone en su tesis doctoral que este exceso de varones se debe a los genes ligados al cromosoma X, y estos retrasos mentales ligados al cromosoma X son responsables de una gran proporción del total de este tipo de patología (Lehrke, 1974).

En los países industrializados se estima que el 2-3% de la población general sufre algún tipo de retraso mental (Bunday y Carter, 1974) y el 0,4% padece retraso mental severo (Butler y col., 1993), quedando un 63% de los individuos retrasados sin un diagnóstico de certeza, en el que se establezca la causa, por lo que se reúnen en el grupo de retrasos de etiología desconocida. Hasta el momento se han descrito al menos 100 síndromes diferentes de retraso mental ligados al cromosoma X (Lubs y col., 1996). Esto explicaría que haya un 20% más de varones que de

mujeres en instituciones especializadas (Opitz y col., 1986).

Se calcula que los genes ligados al cromosoma X producen el 25% de los retrasos mentales en varones y el 10% de los problemas de aprendizaje en mujeres (Turner y col., 1980). En la figura 1 se muestra la localización aproximada de los presuntos genes responsables de los retrasos mentales ligados al cromosoma X descritos hasta la actualidad.

A mediados de este siglo, se inicia el estudio sistemático de familias con historia de retraso mental ligado al cromosoma X (Martin y Bell, 1943; Dunn y col., 1963; Snyder y Robinson, 1969) y con ellas se forma un grupo heterogéneo denominado retrasos mentales no específicos ligados al cromosoma X (XLMR) (Turner y col., 1971). Martin y Bell describieron en algunas de estas familias un fenotipo de retraso mental y rasgos dismórficos característicos y que, hasta la aparición de una prueba de diagnóstico específica, se llamó síndrome de Martin-Bell (Martin y Bell, 1965).

El síndrome de Martin-Bell es la causa más frecuente de retraso mental hereditario y una de las enfermedades hereditarias más frecuentes, siendo la segunda causa de retraso mental después del síndrome de Down (Rousseau y col., 1991). Está caracterizado principalmente por una deficiencia mental de moderada a severa y rasgos faciales y físicos dismórficos. En las mujeres portadoras el fenotipo es menos específico y en muchos casos no presentan rasgos anormales. Se considera a este síndrome como una enfermedad genética ligada al cromosoma X, dominante y con penetrancia incompleta.

Realizando estudios citogenéticos se encontró un primer marcador cromosómico que se heredaba ligado a este tipo de retraso mental. Se detectó un punto frágil o constricción, en la zona distal del brazo largo del cromosoma X y se propuso que la alteración en esa región, o un gen ligado a la fragilidad, sería responsable de este tipo de retraso mental (Lub y col., 1969).

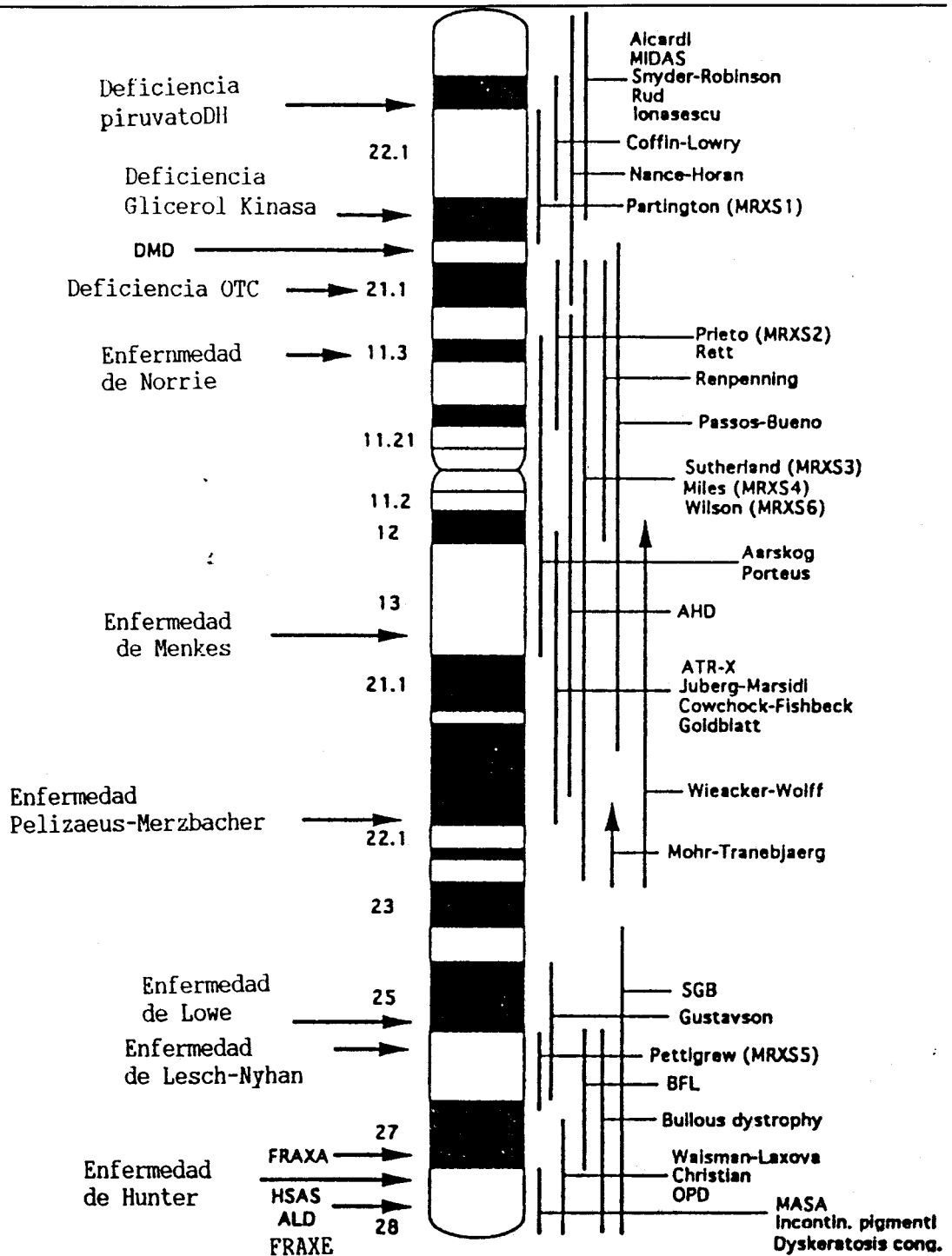


Figura 1. Esquema de un cromosoma X en el que se observan las bandas G, se indican con flechas la localización de cada gen implicado en la patología que se indica al lado de cada flecha, con barras se indica la zona donde se observa ligamiento en otras muchas enfermedades que manifiestan retraso mental ligado al cromosoma X, (adaptada de Lubs y col., 1996)



## **INTRODUCCIÓN**

---

Este hecho fué confirmado por otros autores (Sutherland y col. 1977) que pusieron de manifiesto además que la fragilidad sólo aparecía cuando las células se cultivaban en un medio pobre en ácido fólico, similar al utilizado en los trabajos de Lubs y col. (1969). Esta constricción se refirió como sitio frágil y estudios de bandeos más resolutivos situaron la fragilidad en Xq27.3 (Turner y col., 1978; Brookwell y Turner, 1983). Al retraso mental que segregaba junto con la fragilidad se le dio el nombre de síndrome del X frágil (Giraud y col., 1976, Harvey y col., 1977; Sutherland y col., 1977). En la figura 2 se muestran unas fotografías donde se observa la fragilidad citogenética Xq27.3, en una preparación cromosómica y a la derecha en los dos tipos de cariotipos, se muestran sólo los cromosomas sexuales XX en la mujer y XY en el varón.

El estudio de amplias familias con el síndrome del X frágil puso de evidencia la existencia de varones transmisores normales (NTM), (Fryns y col. 1984). Las peculiaridades de los árboles genealógicos indicaban que la herencia en esta enfermedad no se ajustaba a los patrones conocidos y que además presentaba el fenómeno que se conoce como anticipación; es decir, que en las generaciones posteriores aumenta la frecuencia de aparición y la severidad del fenotipo (Weaver y Sherman, 1987).

Se ha estimado que un 20% de los varones que transmiten la enfermedad no padecen retraso mental (NTM). Las hijas de estos varones transmisores normales, portadoras obligadas, tampoco presentan alteraciones psíquicas ni fenotípicas, sin embargo tienen muchas probabilidades de tener hijos afectados, lo que se conoce como paradoja de Sherman definida por Opitz (1986). En la figura 3 se esquematiza la paradoja en un árbol genealógico hipotético, indicando la frecuencia de aparición del retraso mental en cada generación.

Con esta observación se propone que el riesgo de padecer el



Figura 2. Fotografías donde se observa la fragilidad cromosómica al final del brazo largo del cromosoma X, en el 1 como se observa en una preparación de cromosomas en metafase realizada para los estudios citogenéticos, en el 2 se observa el sitio frágil en el cromosoma X izquierdo de un cariotipo de una mujer portadora y en la 3 el cromosoma X frágil de un varón afecto situado junto al cromosoma Y de menor tamaño.

## INTRODUCCIÓN

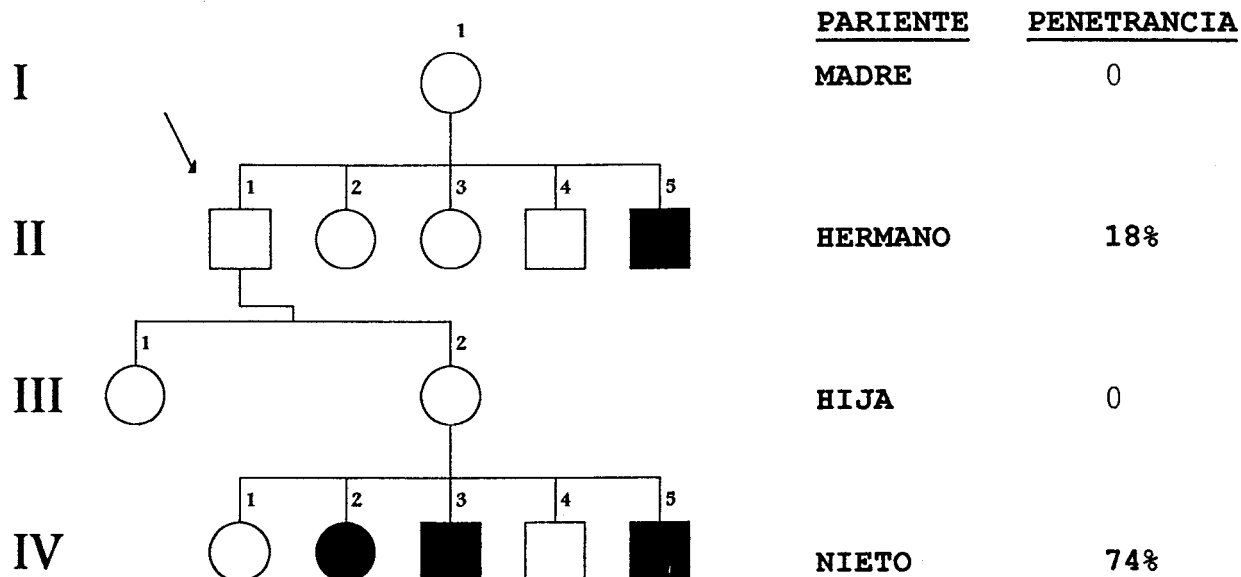


Figura 3. Árbol genealógico en el que se muestra un ejemplo de la paradoja de "Sherman", con los datos de la frecuencia de aparición del síndrome según la generación.

TABLA 1. Variabilidad en la frecuencia de hijos afectados según el estado psíquico del parental portador del síndrome X frágil.

HIJOS	MADRE PORTADORA		PADRE PORTADOR	
<u>Portador</u>	Normal	Retrasada	Normal	Retrasado
Normal	0,12	0	0	0
Retrasado	0,38	0,5	0	0
<u>Portadora</u>				
Normal	0,34	0,22	1	?
Retrasada	0,16	0,28	0	?

síndrome varía según la posición en el árbol genealógico y según las características del progenitor portador lo que se indica en la tabla I. El descubrimiento de las bases moleculares del síndrome del cromosoma X frágil ha permitido resolver la paradoja de Sherman y explicar el fenómeno de la anticipación genética (Sherman y col. 1985).

Para explicar las inusuales características de transmisión de este síndrome se propuso que los varones transmisores normales tendrían una premutación que pasaría sin cambios a sus hijas que serían por lo tanto portadoras obligadas pero sin fenotipo de la enfermedad. El paso de premutación a mutación se daría en la siguiente generación que tendría una probabilidad muy alta de padecer el síndrome (Pembrey y col. 1985). Esta premutación generaría una mutación definitiva sólo cuando se transmitiera por vía materna. La mujer presentaría un reordenamiento submicroscópico en la zona Xq27.3 que generaría un significativo desbalance genético cuando la zona interviniese en un fenómeno de recombinación (Sherman y col. 1985).

Analizando marcadores genéticos flanqueantes a la fragilidad en hijas de portadores normales, se observaban interferencias en los sucesos de recombinación que conducirían a la mutación total X frágil lo que determinaría la aparición del retraso mental (Winter y Pembrey, 1986). Existen evidencias de roturas físicas en los sitios frágiles, demostrándose translocaciones en células somáticas híbridas donde se une la zona frágil a ADN heterólogo (Warren y col. 1987).

Se ha calculado la frecuencia del síndrome X frágil en diferentes poblaciones caucásicas a partir de estudios citogenéticos encontrándose 1 afecto por cada 1500 varones y 1 por cada 2000 mujeres. Se estima la existencia de un varón portador normal por cada 5000 individuos y una frecuencia de portadoras mayor del 0,9% (Rousseau y col. 1994). Recientemente

## **INTRODUCCIÓN**

---

se ha reevaluado la prevalencia del síndrome X frágil, con los resultados de estudios moleculares por análisis del ADN, y se estima una prevalencia de 1 afecto por cada 4000 varones (Turner y col. 1996). El síndrome del X frágil afecta a todas las poblaciones estudiadas con frecuencias similares (Hagerman y Silverman, 1996).

### *1.1 Descripción del síndrome.*

El fenotipo más frecuente en los varones con el síndrome X frágil se caracteriza por retraso mental que puede variar de moderado a severo y algunas características físicas que se resumen en la tabla II. En la tabla III se indican los problemas médicos más frecuentes en los varones con el síndrome.

Estudios bioquímicos en células de pacientes X frágiles muestran una disminución en los niveles de AMPc comparados con grupos controles de individuos con síndrome de Down. Estos resultados sugieren que defectos en la cadena de transducción de señales en las que participa el AMPc pueden contribuir al retraso mental en estos pacientes, pues se conoce que la interrupción de las cascadas mediadas por AMPc produce deficiencias cognitivas (Berry-Kavis y col., 1993).

El fenotipo del síndrome X frágil en mujeres es más sutil que en el caso de los varones. El 85% de las mujeres heterocigotas parecen normales fenotípicamente pero presentan problemas de aprendizaje (Loesch y Hay, 1988). Se ha descrito la existencia de fallo ovárico prematuro en un 13% de las heterocigotas (Kraus y col., 1987, Partington y col. 1996, Vianna-Morgante y col. 1996) y un aumento de la fertilidad así como del número de partos gemelares dicigóticos en las heterocigotas (Turner y col. 1994). Estudios en linfocitos periféricos encuentran que el número de cromosomas X frágiles activos era más alto en mujeres heterocigotas retrasadas que en

TABLA II. Características físicas en los varones con el síndrome X frágil, observadas en grupos de individuos que se caracterizan por presentar el mismo genotipo. (Los datos se indican en porcentaje).

Características físicas	MUTACIÓN TOTAL		MOSAICOS
	Metilación total (n=97)	<50% Metilación (n=5)	(n=29)
<u>Varones prepuberales</u>			
Cara alargada	64	40	63
Orejas prominentes	78	20	86
Paladar hendido	51	100	36
Hiperextensión articular	81	80	86
Crestas palmares simples	26	40	14
Manos callosas	18	20	13
Pies planos	82	80	82
Prolapso de la valvula mitral	16	0	7
Macroorquidismo	54	40	54
Características físicas	MUTACIÓN TOTAL		MOSAICOS
	Metilación total (n=64)	<50% Metilación (n=7)	(n=22)
<u>Varones puberales y postpuberales</u>			
Cara alargada	80	83	71
Orejas prominentes	66	---	36
Paladar hendido	63	---	38
Hiperextensión articular	49	17	50
Crestas palmares simples	22	0	48
Manos callosas	52	0	40
Pies planos	60	17	50
Prolapso de la valvula mitral	29	33	9
Macroorquidismo	92	83	91

\*Adaptada de Hagerman y Cronister (1996)

## INTRODUCCIÓN

---

TABLA III. Problemas médicos más frecuentes en varones que padecen el síndrome X frágil.

PROBLEMAS (N° pacientes)	(%)
Falta de crecimiento (138)	15
Estrabismo (161)	36
Hernias (230)	15
Luxaciones (150)	3
Intervenciones ortopédicas (171)	21
Otitis media (291)	85
Sinusitis (43)	23
Convulsiones (288)	22
Historia de apnea (139)	10
Autismo (211)	20
Tics motores (188)	19
Ideas psicóticas (146)	12

\* Adaptada de Hagerman y Cronister, (1996)

heterocigotas normales (Webb y Jacobs 1990). Se ha indicado también un 8% de muertes súbitas en varones y un 4% en mujeres descendientes de madres portadoras (Davies, 1989).

Se han descrito también dos fenotipos, distintos al más frecuente expuesto anteriormente, que se pueden asociar con el síndrome X frágil. Uno de ellos es muy parecido al síndrome de Prader-willi, que cursa con obesidad extrema, cara redondeada, estatura baja, pies y manos cortos con dedos gordos e hiperpigmentación difusa (Frins y col., 1987; de Vries y col., 1993; Schrandt-stumpel y col., 1994).

El tercer fenotipo descrito asociado al síndrome del X frágil se ha encontrado en 6 pacientes que presentaban: talla alta al nacer, circunferencia craneal grande, crecimiento inusual y gigantismo con anomalías faciales menores. Sin embargo, otros familiares también afectados del síndrome X frágil, presentaban el fenotipo típico indicado anteriormente (Beemer y col., 1986; de Vries y col., 1995).

Recientemente se ha descrito una paciente diagnosticada clínicamente de síndrome de Rett, que por estudios moleculares y citogenéticos resultaba X frágil (Alembik y col. 1995), por lo que los rasgos fenotípicos asociados con el síndrome X frágil pueden ser muy variados y se están ampliando en la actualidad.

En la figura 4 se muestran 5 fotografías de pacientes X frágiles de nuestro estudio en Andalucía, donde pueden observarse algunas características faciales dismórficas.

### *1.1.1 Datos neurológicos y psíquicos en el síndrome X-frágil.*

En los pacientes con el síndrome aparecen alteraciones neuropsicológicas y de comportamiento, deficiencias en la memoria temporal a corto plazo y secuencial así como alteraciones en la



## INTRODUCCIÓN

---



Figura 4. Fotografías de individuos X frágil diagnosticados en el estudio en Andalucía. En la parte superior tres miembros de la familia 1 que se indicará en el apartado E de RESULTADOS, el primero de la izquierda es el tío (III-9) de los dos de la derecha que son primos (IV-3 y IV-6 respectivamente). En la parte inferior a la izquierda el individuo IV-14 de la familia 16 diferentes y III-1 de la familia 7, que se indicarán en el apartado G-4 de RESULTADOS.

habituaación a estímulos sensoriales. En pacientes epilépticos con el síndrome aparece un encefalograma de medio y alto voltaje unilateral o subidas bilaterales en el área temporal durante el sueño, que no suele aparecer en otros retrasos. La causa de las convulsiones podría ser la deficiencia en el vermis cerebelar, al perderse una apropiada inhibición secundaria sobre el cerebelo (Freund y Reiss, 1991).

En estudios neuroanatómicos se ha observado un aumento en el volumen del hipocampo, una disminución del volumen en el gyrus temporal superior y menor tamaño del vermis cerebelar posterior con incremento del tercer ventrículo, comparado con el grupo control (Reis y col., 1994). Estudios con resonancia magnética y morfometría cuantitativa, muestran un incremento del núcleo caudado y un aumento del ventrículo lateral en varones, que se correlacionan con el IQ de los pacientes. También el aumento de volumen en el núcleo caudado se correlaciona con el estado de metilación en el gen FMR-1 (Schapiro y col. 1995).

Los varones X frágiles presentan un IQ entre 35-50, que va disminuyendo con la edad (Hirst y col., 1993). Se observan alteraciones del área cognitiva, con deficiencias en la atención, problemas verbales que afectarían más los niveles de significado del lenguaje que la fonología o sintaxis, además de problemas aritméticos. Se observa que presentan fallos en la tarea de memorizar listas de palabras o números, ligados a factores como falta de atención y ansiedad (Hagerman y Silverman, 1991). Los individuos con el síndrome se caracterizan también por presentar hiperactividad, movimientos estereotípicos, y alteraciones en el habla (Baumgardner y col., 1995). En la tabla IV se resumen las alteraciones psicomotoras más frecuentes en los varones que padecen el síndrome X frágil.

Los resultados obtenidos usando tomografía cuantitativa computarizada y analizando a su vez las tasas metabólicas por

## INTRODUCCIÓN

TABLA IV. Resumen de las alteraciones psicomotoras más frecuentes en los varones que padecen el síndrome X frágil, se estudian en tres grupos establecidos según el genotipo de los individuos. (Los datos que se indican están calculados en porcentaje).

Características psicomotoras	MUTACIÓN TOTAL		MOSAICOS
	Metilación total (n=97)	<50% Metilación (n=5)	(n=29)
<u>Varones prepuberales</u>			
Agitación manual	85	80	89
Golpean con las manos	64	40	42
Hiperactividad	89	60	96
Conportamiento reiterativo	95	60	95
Agresividad	57	60	65
Timidez	60	75	44
Ansiedad	64	75	53
Ataques de pánico	25	50	25
Contacto visual escaso	88	80	87
Ataques de cólera	25	25	28
Defensa táctil pobre	76	25	73
Características psicomotoras	MUTACIÓN TOTAL		MOSAICOS
	Metilación total (n=64)	<50% Metilación (n=7)	(n=22)
<u>Varones puberales y postpuberales</u>			
Agitación manual	81	17	68
Golpean con las manos	64	17	50
Hiperactividad	64	67	82
Conportamiento reiterativo	100	75	91
Agresividad	55	67	47
Timidez	61	100	100
Ansiedad	79	100	91
Ataques de pánico	39	25	22
Contacto visual escaso	98	67	100
Ataques de cólera	42	20	37
Defensa táctil pobre	96	60	80

\*Adaptada de Hagerman y Cronister (1996).

regiones cerebrales, sugieren que las alteraciones estructurales y funcionales del cerebro de los pacientes X frágiles pueden explicar las alteraciones cognitivas y de comportamiento que ocurren en el síndrome. Las alteraciones observadas en la asimetría izquierda-derecha pueden estar asociadas a los cambios en las funciones visuales y verbales que se han encontrado en los pacientes afectados del síndrome X frágil (Shapiro y col. 1995).

Se ha descrito una correlación inversa entre el valor de IQ de las heterocigotas y el porcentaje de fibroblastos con el cromosoma X frágil activo, sugiriendo una selección somática de las células hematopoyéticas pluripotenciales (ES) con un cromosoma X frágil activo (Rocchi y col., 1990). En las mujeres heterocigotas se observa que un 60% presentan un IQ<85, encontrándose alteraciones en las habilidades matemáticas y gráficas, mientras que las habilidades verbales no están muy alteradas (Sobesky y col. 1994 y Loesch y col. 1994).

### *1.2 Diagnóstico del síndrome X-frágil.*

Desde el principio de los años 70 cuando se descubrió la fragilidad como marcador citogenético del síndrome, hasta el descubrimiento en 1991 del gen FMR-1 ligado al sitio frágil y causante de la aparición del síndrome, el estudio cromosómico a partir de células sanguíneas fue el método más utilizado. Poner de manifiesto la fragilidad es un trabajo intensivo que tiene que llevarse a cabo en laboratorios experimentados. Por otra parte, en muchos casos las fragilidades no se expresan, sobre todo en los portadores y portadoras de la premutación (Brown, 1990). Esta metodología presenta además el problema de los falsos positivos debidos a la expresión, en bandas adyacentes a Xq27.3, de otros sitios frágiles. Que sería la fragilidad común llamada FRAXD en Xq27.2, que se expresa en un 4-5% de las metafases de las preparaciones de muestras normales (Zaslav y col. 1991) y los sitios frágiles raros FRAXE y FRAXF en Xq28. En condiciones

## **INTRODUCCIÓN**

---

óptimas el sitio frágil aparece en un 10-40% de las metafases de una preparación de un paciente con el síndrome. Una frecuencia mucho menor se observa en las mujeres portadoras y no aparece en varones transmisores normales (Richards y Sutherland, 1992).

Los sitios frágiles se expresan muy frecuentemente en la población general, aunque algunos sólo se observan bajo condiciones especiales de cultivo. Se encuentran muy conservados en la evolución apareciendo en especies como ratones, caballos o primates lo que sugiere una estructura o función común (Deelen y col. 1994). Se ha sugerido que los sitios frágiles pueden predisponer a la rotura cromosómica por esa zona y conducir a un incremento de intercambio entre cromátidas hermanas o recombinación. Se ha demostrado que más del 50% de roturas cromosómicas ocurridas durante la evolución en los primates se han producido muy cercanas a los sitios frágiles (Knight y col., 1993). En estudios cromosómicos de muestras de mamíferos se expresa una fragilidad en la zona final del brazo largo del cromosoma X que determina un síndrome en las vacas (Ronne y col., 1992) y también se observa una fragilidad en Xq27 en muestras de caballos aunque no parece estar ligada a ninguna patología (Deelen y col., 1994).

Durante un tiempo se usaron también para el diagnóstico marcadores adyacentes a la zona frágil, que se conocían por estudios de ligamiento para realizar mapas genéticos. Así se describió ligamiento del síndrome X frágil, en 6 familias informativas de 18 estudiadas en una población de Cerdeña, con los loci de la deficiencia en la enzima Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y del daltonismo. En este estudio no se encontró ligamiento entre la deficiencia en la enzima y otros retrasos mentales ligados al cromosoma X (Filippi y col., 1983).

En estudios de ligamiento del locus del factor IX con el síndrome X frágil no se encontró recombinación en 17 meiosis de

2 familias estudiadas (Camerino y col. 1983). Por análisis de ligamiento multilocus en 147 familias y usando 4 marcadores flanqueantes a la zona de la fragilidad ligada al retraso mental (FRAXA) se propuso la siguiente situación en el cromosoma X centrómero-(DXS51, F9, DXS98)-FRAXA-DXS52-telómero, reduciéndose así la zona donde buscar alteraciones en el ADN responsables de la fragilidad FRAXA (Brown y col., 1988).

Hasta principio de los años 90 el diagnóstico del síndrome X frágil se realizaba con los datos clínicos que se comprobaban en el laboratorio de citogenética o por pruebas indirectas de análisis de polimorfismos cercanos a la zona frágil. Con el descubrimiento en 1991 del gen implicado en la enfermedad se han podido generar sondas que permiten un análisis directo de la zona (Fu y col. 1991).

## 2. LOCALIZACIÓN DEL GEN FMR-1.

A principios de los 90 se describió un mapa físico del final del brazo largo del cromosoma X cubriendo un total de 12 Mb, situando la zona frágil entre 8 y 8,7 Mb proximal al telómero y marcando un intervalo de 300 a 700 Kb donde se situaría el sitio frágil (Pouskula y col., 1991). En el año 1990, usando un fragmento de 275 Kb de un cromosoma de levadura artificial (YAC) que contenía el sitio frágil, se mapeó la secuencia con técnicas de hibridación "in situ" y se restringió la zona FRAXA a 15 Kb. Se consiguió por digestión con la enzima de restricción EcoRI un fragmento de 5.2 Kb, que contenía la zona donde se encontraba la fragilidad (Yu y col., 1991).

En 1991 se caracterizó un gen que se denominó FMR-1 (retraso mental ligado al sitio frágil 1) en la región ligada a la fragilidad descrita para este síndrome. Se obtuvo un fragmento de 7.4 Kb que contenía una isla CpG (una secuencia de nucleótidos

## INTRODUCCIÓN

---

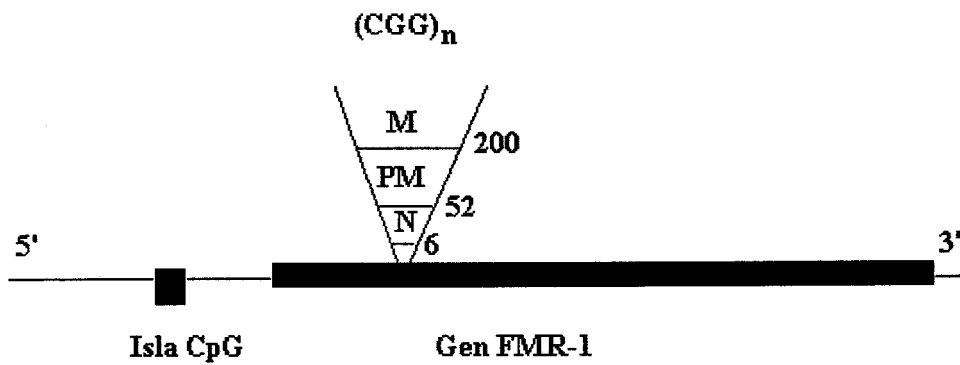


Figura 4. Esquema de la zona FRAXA, donde se indica la situación de la zona de triplete dentro del gen FMR-1, así como la isla CpG reguladora de la transcripción del ARNm.

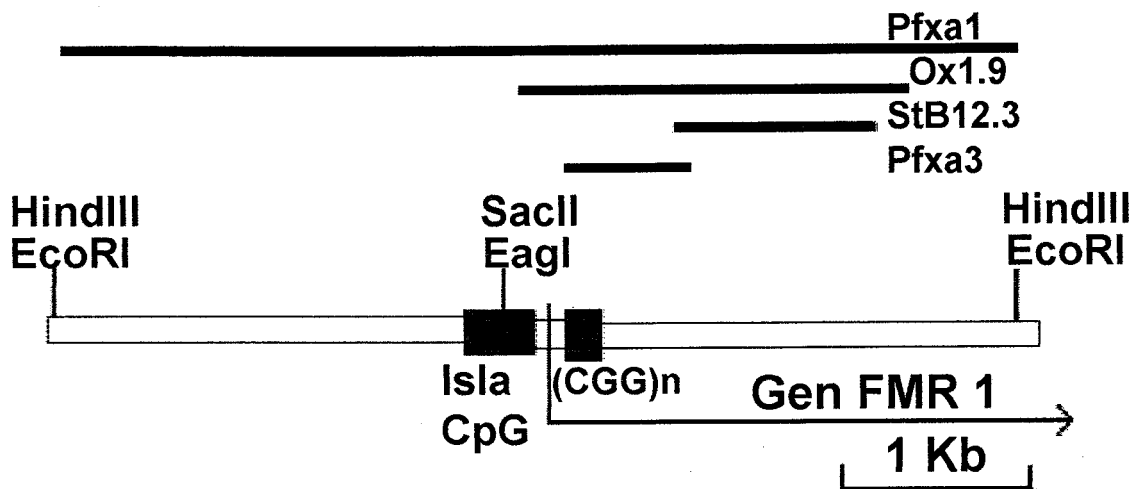
rica en guaninas y citosinas que suele indicar la presencia de un promotor de un gen y suelen encontrarse cerca de secuencias génicas regulando su expresión) y una zona variable de repeticiones CGG/CCG situada a 250 pb de la isla y que se encontraba en el primer exón del gen FMR-1. Se sugirió que la mutación de este gen por aumento en el número de tripletes repetidos es lo que induce la expresión fenotípica del síndrome X-frágil (Verkerk y col., 1991). En la figura 4 se muestra un esquema de la zona FRAXA.

A partir de estos hallazgos se establecieron las bases para el diagnóstico molecular del síndrome X-frágil. Se han obtenido sondas que hibridan en la zona de los (CGG/CCG)<sub>n</sub> como la StB12.3 y la Ox1.9. La sonda StB12.3 (pfxa7) es un fragmento de 1.2 Kb utilizada para el análisis de los polimorfismos de restricción de endonucleasas como EcoRI, HindIII, EagI y SacII (Rousseau y col. 1991). La sonda Ox1.9 es un fragmento de 1.9 Kb que se usa en el mismo tipo de estudios usando las mismas restructasas (Snow y col. 1992). Otras sondas empleadas con menor frecuencia en el diagnóstico del síndrome son la Pfxa1 y la Pfxa3 (Richards y col. 1992 y Warren y col. 1994). En la figura 5 se muestra un esquema de la zona FRAXA con las dianas de restricción de las enzimas más usadas en el diagnóstico del síndrome X frágil y los sitios de hibridación de las sondas más utilizadas.

### 2.1 Estructura del gen FMR1.

Los estudios sobre el gen FMR1 indican que ocupa unas 38 Kb en Xq27.3 y está compuesto por 17 exones y 16 intrones. La zona de repetición de tripletes (CGG/CCG)<sub>n</sub> está en el primer exón pero antes de la fase abierta de lectura, y por lo tanto no codifica para el aminoácido Arginina como se postulaba en un principio (Ashley y col. 1993). La figura 6 muestra un esquema del gen FMR1 indicándose los tamaños de los exones y los intrones, y la localización de la zona de tripletes (CGG/CCG)<sub>n</sub>.





### Zona FRAXA ( X q 27.3 )

Figura 5. Esquema explicativo de las zonas de hibridación de las sondas usadas para el diagnóstico por análisis del ADN del síndrome X frágil, así como las dianas de corte de las enzimas que se emplean más frecuentemente en el estudio de la zona FRAXA.

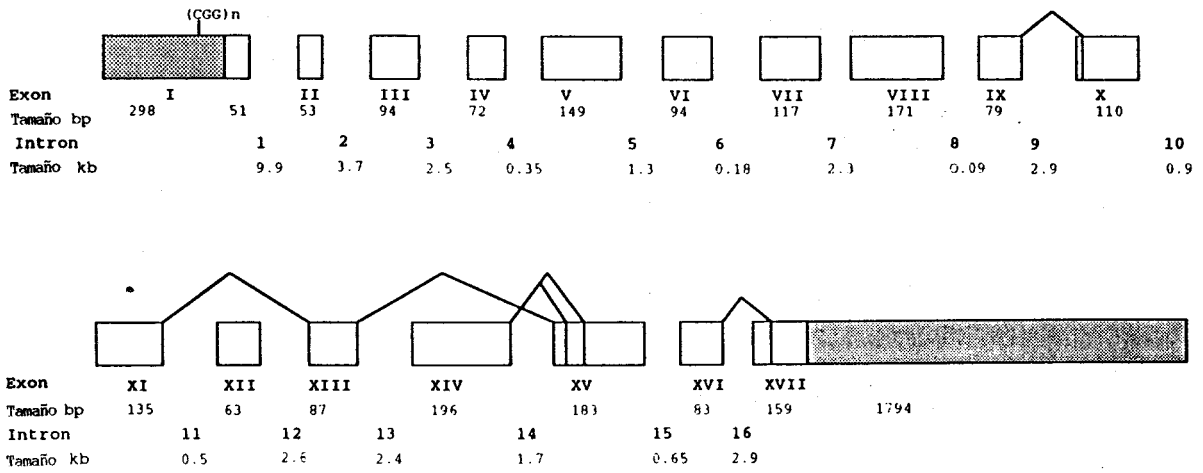


Figura 6. Esquema del gen FMR-1, se indican los exones en números romanos y los intrones que se sitúan entre los primeros en números arábigos, debajo se indica el tamaño en kilobases, las zonas rellenas indican secuencias que no se traducen a proteína y los angulitos superiores entre exones indican lugares de maduración alternativa para la eliminación de intrones. La zona de los tripletes se sitúa en la parte no traducida del primer exón, (adaptada de Eichler y col. 1993).

## INTRODUCCIÓN

---

Se observa que el primer intrón del gen FMR1 es inusualmente largo ocupando 9.9 kb, casi un tercio del total del gen (se estima que sólo un 2% de los genes humanos presentan intrones por encima de 9 Kb), lo que indica que puede ser importante para la regulación transcripcional y la maduración del transcrito como ha podido demostrarse para otros genes con intrones grandes. También es característico el tamaño de la zona no transcrita del primer exón que corresponde a 318 pb. Habitualmente la zona no traducible es menor a la media del tamaño de los exones internos que en el FMR-1 es 112 pb. Se postula que el gen FMR-1 pertenece a un grupo compuesto por menos del 8% de los genes en los vertebrados (Eichler y col. 1993). Debido a su ubicua expresión y a su conservación en la evolución se sugiere que este gen tenga un papel en el mantenimiento general de la célula (gen "housekeeping") (Siomi y col. 1993).

En la figura 7 se muestra la secuencia del gen FMR-1 humano, obtenida a partir del ADNc, indicando la zona inestable de tripletes y los codones de iniciación ATG y de terminación TAA de la traducción. Se muestra un alelo con 30 tripletes en el que se observan dos interrupciones AGG en las posiciones 11 y 21 de las repeticiones. Se indican también las secuencias de las zonas KH y la caja RGG, dominios muy conservados que tienen un papel importante en la función de la proteína (Verkerk y col. 1993).

El dominio KH1 se encuentra en el exón VIII del gen FMR1 y el dominio KH2 se encuentra localizado entre los exones IX y X. Estos dominios están formados por 90 nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos homóloga a los dominios KH que se encuentran en la proteína hnRNP K y en otras proteínas unidoras de ARN (Ashley y col., 1993). Una mutación puntual encontrada en el primer dominio KH produce un fenotipo grave del síndrome lo que apoya la hipótesis de la importancia de esta secuencia en la función de la proteína (Siomi y col., 1994). En el exón XV se sitúa otra zona conservada que presenta homologías con la caja

	GGGTTGCGC	CTCAGTCAGG	CGCTCAGCTC	
CGTTTCGGTT	TCACCTCCGG	TGGAGGGCCG	CCTCTGAGCC	GGCGGCGGGC
CACGGCGAGC	GCGGGCGGGC	GCGGTGACGG	AGGCGCCGCT	GCCAGGGGGC
GTGCGGCAGC	<b>CGGGCGGG</b>	<b>CGGGCGGG</b>	<b>CGGGCGGG</b>	<b>AGGCGGGC</b>
<b>GGCGGGCG</b>	<b>CGGGCGGG</b>	<b>AGGCGGGC</b>	<b>GGCGGGCG</b>	<b>CGGGCGGG</b>
CTGGGCTCG	AGCGCCCGCA	GCCCACCTCT	CGGGGGCGGG	CTCCCAGGCG
TAGCAGGGCT	GAAGAGAAGA	<b>TGGAGGAGCT</b>	GGTGGTGAA	GTGCGGGGCT
CCAATGGCGC	TTTCTACAAG	GCATTTGTAA	AGGATGTTC	TGAAGATTCA
ATAACAGTTG	CATTTGAAAA	CAACTGGCAG	CCTGATAGGC	AGATTCCATT
TCATGATGTC	AGATTCCCAC	CTCCTGTAGG	TTATAATAAA	GATATAAATG
AAAGTGATGA	AGTTGAGGTG	TATTCAGAG	CAAAATGAAA	AGAGCCTTGC
TGTTGGTGGT	TAGCTAAAAGT	GAGGATGATA	AAGGGTGAGT	TTTATGTGAT
AGAAATATGCA	GCATGTGATG	CAACTTACAA	TGAAATTGTC	ACAATTGAAC
GTCTAAGATC	TGTTAATCCC	AACAAACCTG	CCACAAAAGA	TACTTTCCAT
AAGATCAAGC	TGGATGTGCC	AGAAGACTTA	CGGCAAAATG	GTGCCAAAAG
GGCGGCACAT	AAGGATTTTA	AAAAGGCAGT	TGGTGCCTTT	TCGTAACTT
ATGATCCAGA	AAATATCAG	CTTGTCAAT	TGTCCATCAA	TGAAGTCACC
TCAAAGCGAG	CACATATGCT	GATTGACATG	CACTTTCGGA	GTCTGCCAC
TAAGTTGTCT	CTGATAATGA	GAAATGAAGA	AGCTAGTAAG	CAGCTGGAGA
GTTCAAGGCA	GCTTGCCCTG	AGATTTCATG	<b>AACAGTTTAT</b>	<b>CGTAAGAGAA</b>
<b>GATCTAGTGA</b>	<b>GTCTAGCTAT</b>	<b>TGGTACTCAT</b>	<b>GGTGTAAATA</b>	<b>TTGAGCAAGC</b>
<b>TAGAAAAGTA</b>	<b>CCTGGGGTCA</b>	CTGCTATTGA	TCTAGATGAA	GATACCTGCA
CATTTCCATAT	TTATGGAGAG	GATCAGGATG	CAGTGAAAAA	AGCTAGAAGC
TTTCTCGAAT	TTGCTGAAGA	<b>TGTAATACAA</b>	<b>GTTCCAAGGA</b>	<b>ACTTAGTAGG</b>
<b>CAAGTAATA</b>	<b>GGAAAAAAT</b>	<b>GAAAGCTGAT</b>	<b>TCAGGAGATT</b>	<b>GTGGACAAGT</b>
<b>CAGGAGTTGT</b>	GAGGGTGAGG	ATTGAGGCTG	AAAATGAGAA	AAATGTTCCA
CAAGAAGAGG	AAAATATGCC	ACCAAATTC	CTTCCTTCCA	ATAATTCAAG
GGTTGGACCT	AATGCCCCAG	AAGAAAAAAA	ACATTTAGAT	ATAAAGGAAA
ACAGCACCCA	TTTTCTCAA	CCTAACAGTA	CAAAAGTCCA	GAGGGTGTTA
GTGGCTTCAT	CAGTTGTAGC	AGGGGAATCC	CAGAAAACCTG	AACTCAAGGC
TTGGCAGGGT	ATGGTACCAT	TTGTTTTTGT	GGGAACAAG	GACAGCATCG
CTAATGCCAC	TGTTCTTTTG	GATTATCACC	TGAACTATT	AAAGGAAGTA
GACCGTTTGC	GTTTGGAGAG	ATTACAAATT	GATGAGCAGT	TCCGACAGAT
TGGAGTCTAGT	TCTAGACCAC	CACCAAATCG	TACAGATAAG	GAAAAAAGCT
ATGTGACTGA	TGATGGTCAA	GAAATGGGTC	GAGGTAGTAG	ACCTTACAGA
AATAGGGGGC	ACGGCAGACG	CGGTCCTGGA	TATACTTCAG	GAACTAATTC
TGAAGCATCA	AATGCTTCTG	AAACAGAAATC	TGACCACAGA	GACGAACTCA
GTGATTTGGT	ATTAGCTCCA	ACAGAGGAAG	AGAGGGAGAG	CTTCCTGCGC
AGAGGAGACG	<b>GACGGCGGG</b>	<b>TGGAGGGGGA</b>	<b>GGAAGAGGAC</b>	<b>AAGGAGGAAG</b>
<b>AGGACGTGGA</b>	<b>GGAGCTTCA</b>	<b>AAGGAAACGA</b>	CGATCACTCC	CGAACAGATA
ATCGTCCACG	TAATCCAAAG	GAGGCTAAAG	GAAGAACAAC	AGATGGATCC
CTTCAGATCA	GAGTTGACTG	CAATAATGAA	AGGAGTGTCC	ACACTAAAAC
ATTACAGAAT	ACCTCCAGTG	AAGGTAGTCG	GCTGCGCAGC	GGTAAAGATC
GTAACCAGAA	GAAAGAGAAG	CCAGACAGCG	TGGATGGTCA	GCAACCACTC
GTGAATGGAG	TACCCTAAAC	TGCATAATTC	TGAAGTTATA	TTTCTTATAC
CATTTCCGTA	<b>ATTCTTATTC</b>	CATATTAGAA	AACTTTGTTA	GGCCAAAGAC
AAATAGTAGG	CAAGATGGCA	CAGGGCATGA	AATGAACACA	AATTATGCTA
AGAATTTTTT	ATTTTTTGGT	ATTGGCCATA	AGCAACAATT	TTTCTAGTTG
CACAAAAAGA	TACCTTAAAA	TTTGAAACAT	TGCTTTTAAA	ACTACTTAGC
ACTTCAGGGC	AGATTTTGTG	TTTATTTTCT	AAAGTACTGA	CGAGTGATAT
TCTTTGTTAA	TTTGGACCAT	TTTCTGCAAT	TGGGTGATCA	TTTACCAGTA
CATTCTCAGT	TTTTCTTAAT	ATATAGCAAT	TATGGTAATC	ATATTAGACT
TCTGTTTTCA	ATCTCGTATA	GAAGTCTTCA	TGAAATGCTA	TGTCAATTCA
TGTCCTGTGT	CAGTTTATGT	TTTGGTCCAC	TTTTCCAGTA	TTTTAGTGGG
CCCTGAAATG	TGTGTGATGT	GACATTTGTC	ATTTTCAATTA	GCAAAAAAAG
TTGTATGATC	TGTGCCTTTT	TTATATCTTG	GCAGGTAGGA	ATATTATATT
TGGATGCAGA	GTTCCAGGGAA	GATAAGTTGG	AAACACTAAA	TGTTAAAGAT
GTAGCAAACC	CTGTCAAACA	TTAGTACTTT	ATAGAAGAAAT	GCATGCTTTC
CATATTTTTT	TCCTTACATA	AACATCAGGT	TAGGCAGTAT	AAAGAATAGG
ACTTGTTTTT	GTTTTTGTTT	TGTTGCACATG	AAGTTTGATA	AATAGTGTTA
TTGAGAGAGA	TGTGTAATTT	TTCTGTATAG	ACAGGAGAAAG	AAAGAACTAT
CTTCATCTGA	GAGAGGCTAA	AATGTTTTTCA	GCTAGGAACA	AATCTTCTGT
GTCGAAAGTT	AGTAGGATAT	GCCTGCTCTT	TGGCCTGATG	ACCAATTTTA
ACTTAGAGCT	TTTTTTTTTTA	ATTTTGTCTG	CCCCAAGTTT	TGTGAAATTT
TTTCAATTTT	AAATTTCAAGC	TTATTTTTGGA	GAGATAGGAA	GGTCATTTCC
ATGTATGCAT	AATAATCCTG	CAAAGTACAG	GTAATTTGTC	TAAGAAACAT
TGGAAGCAGG	TTAAATGTTT	TGTAAACTTT	GAAATATATG	GTCTAATGTT
TAAGCAGAAAT	TGGAAAAGAC	TAAGATCGGT	TAACAAATAA	CAACTTTTTT
TTCTTTTTTT	CTTTTGTTTT	TTGAAGTGT	GGGGTTTGGT	TTTGTTTTTT
GAGTCTTTTT	TTTTTAAGTG	AAATTTATTT	AGGAAAAATA	TGTGAAGGAC
CTTCACTCTA	AGATGTTTATA	TTTTTCTTAA	AAAGTAACTC	CTAGTAGGGG
TACCACTGAA	TCTGTACAGA	GCCGTAAAAA	CTGAAGTCT	GCCTCTGATG
TATTTTGTGA	GTTTGTCTCT	TTGAAATTTT	ATTTTACAGT	TACTTTTCCCT
TGCATACAAA	CAAGCATATA	AAATGGCAAC	AAACTGCACA	GATATTCATA
AATATAAAAA	AGTCTTTTTAA	AAAGTATTGC	CAACATTAA	TGTTGATTTT

Zona (CGG/CCG)<sub>n</sub>  
Inestable

Dominio  
KH 1

Dominio  
KH 2

Caja  
RGG

Figura 7. Secuencia del gen FMR-1, implicado en la aparición del síndrome X frágil, (tomada de Verkerk y col., 1991).

## INTRODUCCIÓN

---

RGG, implicada en la función unidora de ARNm (Verkerk y col., 1993).

Estudios del gen en distintos grupos animales desde anélidos hasta mamíferos indican que estas zonas se han conservado sin muchos cambios a lo largo de la evolución (Deelen y col., 1994; Price y col.; 1996). Por estudios en "Zooblots" se ha comprobado que este gen está muy conservado a lo largo de la evolución. Se ha estudiado en moluscos, anfibios y mamíferos y su homogeneidad indica, como se ha expuesto anteriormente, un gen implicado en funciones básicas de la célula (Verkerk y col., 1991; Ashley y col., 1993).

### *2.1.1 Inestabilidad de la zona de tripletes.*

El tipo de mutación más frecuente en el síndrome X frágil es la expansión de las repeticiones del triplete CGG/CCG, situado en la zona 5' del gen FMR-1, en el primer exón antes del triplete de iniciación de la traducción. El aumento del número de tripletes y la metilación de la isla CpG próxima al extremo 5' del gen están involucrados en la aparición del fenotipo. El número de repeticiones es variable dentro de la población normal por lo que el locus FRAXA es polimórfico (Kremer y col. 1991).

La frecuencia alélica más alta se acumula en los alelos con 29 y 30 repeticiones CGG/CCG, pero aparecen tamaños entre 6 y 50 tripletes que serían alelos normales. Entre 52 y 200 tripletes se considera que el alelo está premutado aunque hay una zona de incertidumbre en el paso de normal a premutado que se considera entre 35 y 50 tripletes. El alelo está mutado cuando el número de repeticiones supera las 200-230 pudiendo llegar a ser más de 1000 (Fu y col. 1991).

Se demuestra que oligonucleótidos formados por repeticiones (CGG/CCG)<sub>n</sub> forman, en condiciones fisiológicas, estructuras

complejas que semejan tetrahélices de ADN y que la metilación en el nucleótido 5-citosina estabiliza esta estructura. Estas formaciones pueden suprimir la transcripción del gen y la replicación de la zona (Fry y Loeb, 1994).

Estudios de poblaciones indican que el 95% de los alelos encontrados tienen menos de 40 CGG/CCG y un 2% un número de repeticiones por encima de 46. Entre 45 y 55 se establece una "zona gris" en la que los alelos pueden ser premutados (por lo que se heredan de forma inestable) o normales. El límite de los alelos normales se ha establecido arbitrariamente en 54 repeticiones (Hirst y col. 1995).

Estudiando posibles funciones de las repeticiones de tripletes, se encuentra que las secuencias  $(CGG/CCG)_n$  sirven como zona de unión a proteínas nucleares específicas que pueden actuar en la regulación génica. La proteína que se une a este tipo de zona repetitiva se ha llamado proteína unidora a CGG 1 (BP1-CGG), y en la actualidad se estudia si puede tener algo que ver con los mecanismos de expansión de los tripletes (Richards y col. 1993). En extractos nucleares purificados con cromatografía de afinidad para ADN aparece una proteína de 20 kDa que se une a la zona de los tripletes CGG/CCG (Dreissler y col. 1996).

En los individuos X frágiles se encuentran mosaicismos de tamaño en la zona de tripletes en un 40% de los casos, observándose en la misma muestra tamaños premutados y mutados. Comparando grupos de hermanos con muestras independientes no se encuentra predisposición familiar en la aparición del mosaicismo (Nolin y col. 1994).

### *2.1.2 Expansiones y retracciones.*

La inestabilidad de la zona de los tripletes implica en la mayoría de los casos expansiones, sin embargo se han descrito

## **INTRODUCCIÓN**

---

también pequeñas retracciones de los tripletes CGG/CCG que en algunos casos ha supuesto la regresión de un alelo premutado a un alelo normal. Se ha descrito un alelo premutado de 110 repeticiones en la madre que pasó a 44 repeticiones en su hija (Vits y col., 1994). Se ha descrito una reversión de la mutación X frágil a un alelo normal (Antiñolo y col., 1996). También se ha descrito un paciente que habiendo heredado de su madre un cromosoma mutado, presenta un tamaño normal sin metilar y un tamaño mutado y metilado. Este es un ejemplo de mosaicismo con una parte del cromosoma X normal y con manifestación del síndrome (Van-den-Ouweland y col., 1994).

### *2.1.3 Mutaciones puntuales y deleciones.*

En algunos pacientes con un fenotipo claro del síndrome no se ha encontrado sin embargo expansión en los tripletes del gen FMR1. Se ha descrito un caso con una mutación puntual, de un sólo nucleótido en el dominio KH1 del gen, que provoca el cambio de un aminoácido crítico para la función de la proteína. Hasta el momento es la única mutación puntual, con expresión del síndrome, que se ha encontrado en el gen FMR-1 (Deboulle y col., 1993).

Se han presentado también dos casos de síndrome X frágil en dos varones sin expansión de tripletes. En un caso la alteración observada era una deleción "de novo" de un sólo nucleótido y en el otro un cambio heredado de dos pares de bases (Lugenbeel y col. 1995).

Además se han encontrado casos de deleciones de distinto tamaño. Se ha observado una deleción de 250 Kb en un paciente con el síndrome pero sin expresión de la fragilidad (Wohrle y col., 1992) o dos casos de deleciones de 2,6 Mb (Gedeon y col., 1992) y 3.1 Mb respectivamente en las que se ha perdido el locus FRAXA (Tarleton y col., 1992). En otro caso la deleción descrita ocupaba toda la parte final del brazo largo de cromosoma X

incluyendo FRAXA y FRAXE (Albright y col., 1994).

También se ha encontrado una pequeña delección en la zona FRAXA de 100 Kb en un paciente con el síndrome (Trottier y col. 1994). Se han descrito dos pacientes X-frágiles, que no mostraban expansión en la zona de triplete, que tenían en un caso una delección de 660 pb (incluyendo la isla CpG, los CGG y el codón de iniciación) y en el otro se habían perdido 25 Kb (desde la zona inicial hasta el exón 11 del gen FMR-1), (Hirst y col., 1994).

### *2.1.4 El síndrome X frágil y otras patologías.*

El síndrome X frágil se ha diagnosticado en pacientes con otras patologías que pueden modificar el fenotipo típico de la enfermedad, así se han descrito pacientes con el síndrome de Klinefelter (varones XXY) y fragilidad cromosómica en el locus Xq27.3 (Fryns y col., 1988, Wilnut y col., 1990 y Chudley y col., 1991). Se han descrito dos casos de mujeres XXX con el síndrome X frágil (Kahkone y col., 1983; Fuster y col., 1988).

También se han encontrado pacientes síndrome de Down con el cromosoma X frágil en al zona FRAXA (Arinami y col., 1987; Chudley y col. 1988). Se ha descrito un varón con el síndrome X frágil que era mosaico para el cromosoma sexual Y (46XY/47XYY) (Milousky y col., 1993). Se han detectado dos mujeres mosaico 45X/46XX que tenían también expansión en los triplete del gen FMR-1 (Shapiro y col. 1994).

Así mismo se observan pacientes con un fenotipo claro del síndrome X frágil pero que no presentan alteraciones detectables en el gen FMR-1 y tienen expresión normal del ARNm del gen. Por lo que deben existir otras causas aún no encontradas en la manifestación del fenotipo del síndrome (Chiaruzi y col. 1994).



## **INTRODUCCIÓN**

---

### *2.2. Metilación de la isla CpG reguladora del gen FMR-1.*

Se conocía que en las secuencias de nucleótidos genómicas existían zonas donde se observaba una frecuencia mayor de guanina y citosinas por lo que se han llamado islas CpG, se observan que éstas localizadas proximalmente a zonas de genes que se transcriben y regulan su expresión cuando se observa metilación en las citosinas que aparecen delante de una guanina.

A finales de los 80 se propuso que el síndrome X frágil estaba causado por una hipermetilación cromosómica anormal. La mutación conduciría a una inactivación por metilación del gen o genes en el sitio frágil. Esta proposición se justificaba al observarse que la replicación del ADN en la zona frágil era tardía (Laird y col., 1987).

Para la aparición de un alelo mutado, el alelo premutado tiene que pasar a través de una inactivación del cromosoma X (lionización que ocurre para compensar la dosis genica en células con dos cromosomas X) y reactivación posterior al pasar por la oogénesis. Esta inactivación del cromosoma X, ocurriría por metilación en las citosina de las islas CpG a lo largo de uno de los dos cromosomas X de cada célula de una mujer (Laird y col. 1991).

Se ha demostrado que aunque la mutación X frágil se debe a cambios estructurales en la zona Xq27.3, la aparición del fenotipo está asociada a la hipermetilación de la isla CpG próxima a FRAXA. Este hecho apoya la hipótesis propuesta por Laird (1987) de hipermetilación del locus y del doble paso mutacional para la aparición del fenotipo.

El alelo X frágil aparece no metilado en varones transmisores normales e hipermetilado en varones afectados del síndrome. Cuando la expansión de los triplete supera un número

crítico, que se ha propuesto 200 triplete, la isla CpG está hipermetilada, lo que induce la inactivación del gen FMR-1 por inhibición de la transcripción (Oberle y col., 1991).

En estudios de metilación del locus FRAXA se observa una falta de metilación en las vellosidades coriónicas y en la placenta (Luo y col., 1993; Iida y col., 1994). Esto implica que en diagnósticos prenatales a partir de este tipo de muestra, no se puede conocer el estado de metilación del gen FMR-1 del feto, por lo que deberá hacerse un nuevo estudio con líquido amniótico donde se encuentra la isla CpG metilada como en otros tejidos fetales.

Se ha encontrado también mosaicismo de metilación en algunos pacientes X frágiles en los que en células sanguíneas aparecía el alelo expandido metilado y sin metilar, indicando que puede existir algo de transcripción (Merenstein y col., 1994; Feng y col., 1995). Estos pacientes pueden tener un IQ normal pero presentar problemas emocionales y de aprendizaje. Se ha propuesto que la metilación variable en el locus FRAXA es responsable de la diversidad fenotípica del síndrome (McConKei-Rosell y col., 1993; Rousseau y col., 1994).

### *2.3 Otros polimorfismos ligados al gen FMR-1.*

Para investigar el origen de la mutación responsable del síndrome X frágil, se han estudiado varios polimorfismos que flanquean la zona de las repeticiones (DXS548, FRAXAC1, FRAXAC2) o se sitúan dentro del gen FMR-1 (FMRa y FMRb) (Oudet y col., 1993; Zhong y col., 1994). En la figura 8 se muestra un esquema de la zona situando los polimorfismos ligados al gen FMR-1 e indicando las distancias a las que se encuentran.

## INTRODUCCIÓN

---

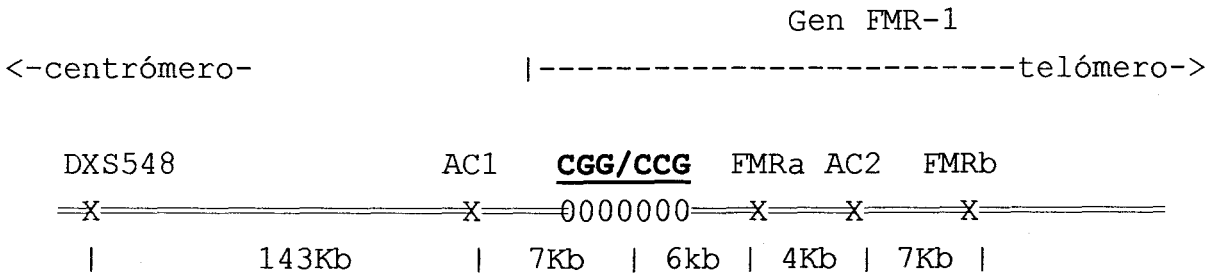


Figura 8. Localización de los polimorfismos ligados al locus FRAXA en la zona Xq27.3.

El polimorfismo DXS548 es un microsatélite de repeticiones (AC/GT)<sub>n</sub> en el que se han descrito 9 alelos distintos que van desde 18 hasta 26 dinucleótidos repetidos. FRAXAC1 es un microsatélite de repeticiones (AC/GT)<sub>n</sub> con 5 alelos distintos de 17 hasta 21 dinucleótidos. FRAXAC2 es un polimorfismo complejo de repeticiones de dinucleótidos con una zona de trinucleótidos, encontrándose 13 alelos diferentes (Oudet y col., 1993). Los polimorfismos FMRa y FMRb muestran dos alelos que se diferencian en un sólo nucleótido (Kunst y col. 1994).

El estudio del locus FRAXA junto a estos otros loci polimorficos, muestra que existe un desequilibrio de ligamiento entre los alelos mutados X frágiles y ciertos alelos de los microsatélites, lo que indica un efecto fundador de la mutación. Los haplotipos encontrados en los individuos con la mutación apuntan a una mutación ancestral y a que unos determinados alelos tienen predisposición a sufrir la expansión en los tripletes CGG/CCG (Oudet y col., 1993; Zhong y col. 1995).

### 2.4 Modelo para explicar la mutación X frágil.

Se postula que la mutación tiene que ver con los mecanismos de impronta genética (que sería la diferencia en los patrones de

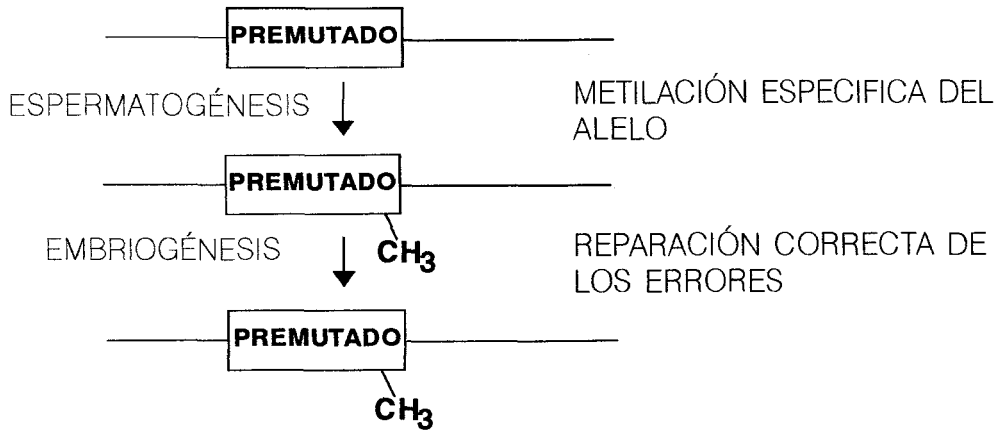
metilación del ADN según el sexo) y con la inactivación de uno de los dos cromosomas X (lionización) las células que tienen dos cromosomas X (Laird y col. 1991). En la figura 9 se muestra un esquema de la hipótesis propuesta para explicar la diferencia observada en el paso de un cromosoma premutado a través de una mujer respecto a lo observado para un varón, determinándose la inestabilidad de la zona de tripletes y su expansión para dar un alelo mutado.

Estudios recientes indican que no es sólo el aumento en el número de tripletes CGG/CCG lo que inestabiliza la región. Diversos estudios demuestran que en los alelos normales, cada 9 o 10 repeticiones CGG/CCG se intercala un triplete AGG/CCT lo que confiere estabilidad al alelo. Mutaciones puntuales producirían la desaparición de las interrupciones y la inestabilidad del alelo (Eichler y col., 1994; Kunst y col., 1994).

El paso de alelo premutado a mutado se ha demostrado por distintos estudios que ocurriría en un momento del desarrollo embrionario temprano, pero posteriormente a la selección de las que serán las células germinales del embrión (Wöhrle y col. 1993). Se observa que en individuos varones afectados del síndrome, en los que aparece la mutación completa en los linfocitos, sólo presentan la premutación en los espermatozoides (Reyniers y col. 1993).

También se ha descrito un caso de dos gemelas monocigóticas discordantes para las repeticiones CGG/CCG. En una de ellas el alelo estaba mutado y en la otra premutado, por lo que la expansión de la zona debió producirse después de la división del cigoto (Kruyer y col., 1994). A partir de estos datos y puesto que la línea celular germinal aparece a partir del día 5 del desarrollo embrionario, se postula que la expansión de las repeticiones ocurriría entre los días 5 y 20 del desarrollo del embrión (Devys y col., 1992; Reyniers y col., 1993).

**A ALELO MATERNO PREMUTADO EN UN VARÓN PORTADOR**



**B ALELO PATERNO PREMUTADO EN UNA MUJER PORTADORA**

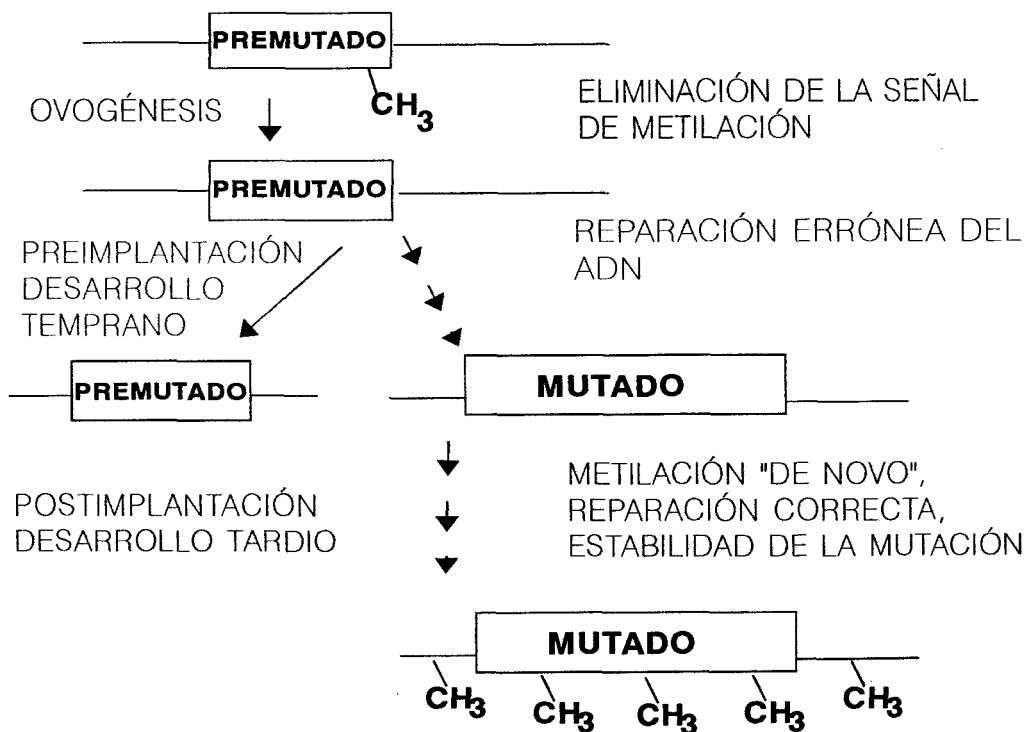


Figura 9. Esquema de la hipótesis del paso de premutación a mutación determinada por el sexo del parental portador (adaptada de Wöhrle y col., 1996).

Asumiendo un modelo de expansión en multipasos, que ocurriría en algunos individuos ancestrales y en el desarrollo embrionario temprano de los individuos que padecerán el síndrome, se ha propuesto que la expansión para dar alelos premutados podría ocurrir tanto en oogenesis como en espermatogenesis, mientras que la expansión a tamaños mutados está restringida a las células somáticas y en los alelos de origen materno (Sherman y col. 1995).

En la figura 10 se muestra un esquema en el que se indica la vía mutacional multipasos que ocurriría en el síndrome X frágil, estableciéndose distintos grupos en los alelos para el locus FRAXA, silvestres, premutados y X frágiles. el paso de primero al siguiente y de este al tercero puede ocurrir por la inestabilidad de los triplete siendo variable la frecuencia de paso de un grupo a otro, desplazándose hacia los alelos X frágiles en unos haplotipos muy infrecuentes en la población normal. También se observan alelos X frágiles como resultado de sucesos únicos en los que no aparece inestabilidad de triplete.

### **3. EXPRESIÓN DEL GEN FMR-1.**

Estudios sobre la expresión del gen FMR-1 a nivel de ARNm indican que en individuos normales se expresa en numerosos tejidos y más abundantemente en cerebro y testículos (Hinds y col., 1993). En los estudios de expresión en familias X frágiles se observa que existe expresión en los portadores pero no en los individuos afectados del síndrome (Pieretti y col. 1991).

Estudios de expresión durante el desarrollo embrionario indican que en un estadio temprano del desarrollo embrionario, se transcribiría en la mayoría de los tejidos. En fetos de 11 semanas la transcripción es ubicua y en fetos de 20 semanas la expresión es más intensa en cerebro, ojos, hígado, músculo esquelético, médula espinal y pulmones manteniéndose la expresión

VIA MUTACIONAL MULTIPASOS EN EL SÍNDROME X FRÁGIL

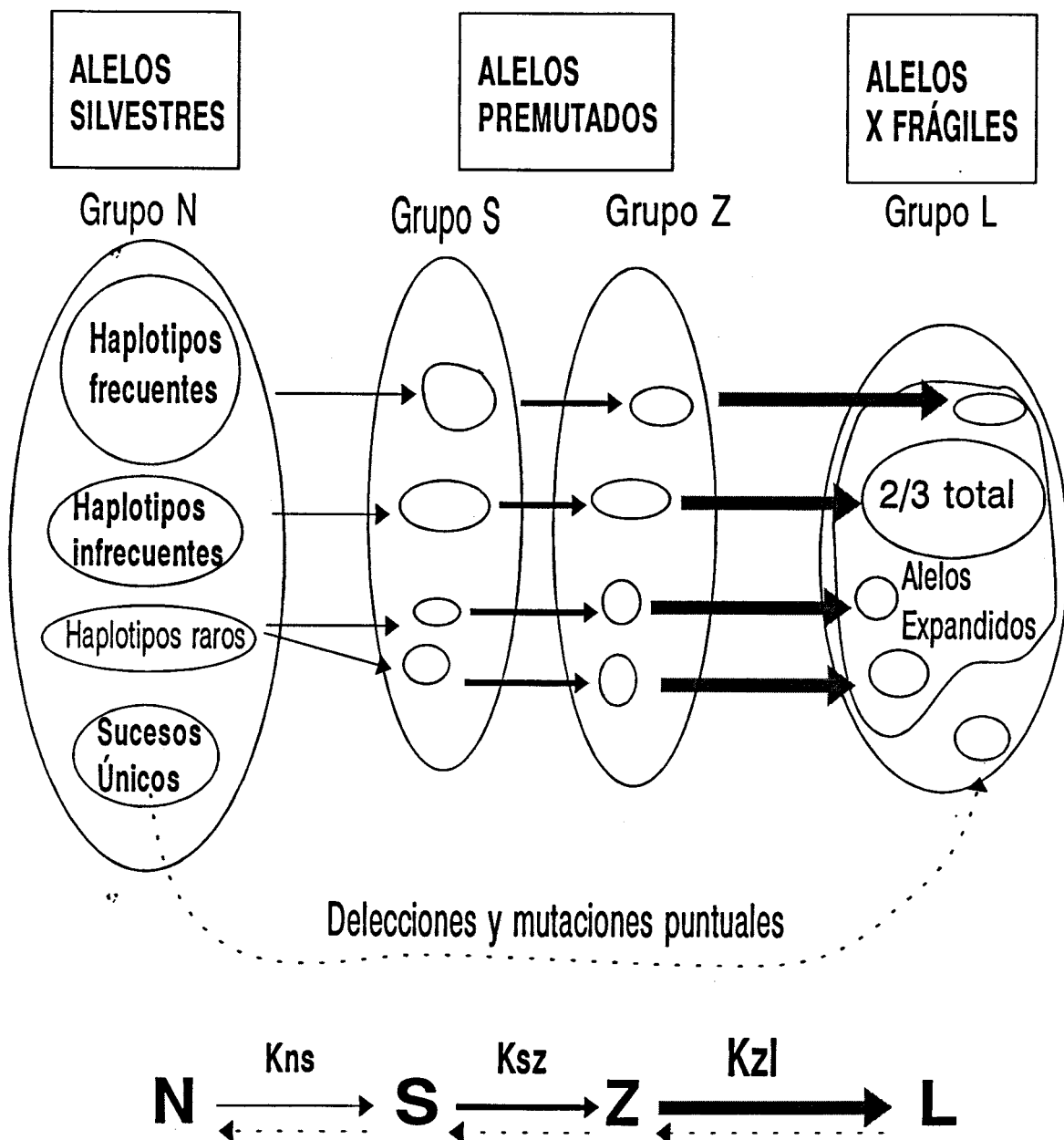


Figura 10. Esquema de la via mutacional multipasos propuesta para el síndrome X frágil, (adaptada de Chiarruzzi y col., 1996).

en el adulto sobre todo en cerebro, linfocitos y gónadas (Hergersberg y col., 1995).

Los trabajos realizados en células con distinto número de repeticiones indican que existe correlación entre la expresión del gen y el número de repeticiones CGG/CCG. Se estudian células con un tamaño normal de tripletes, 7 tipos de expansiones en el rango de premutación, con un número de tripletes de 57, 168, 182, 207, 266, 285 y 285 y una muestra de un varón afecto con 962 repeticiones. Los resultados indican que los niveles de expresión son similares en las células con un tamaño normal y en tamaños premutados inferiores a 100. En las células con 207 tripletes se reducía la expresión al 24% y en las células con 266 triples sólo se encontraba un 12% de expresión. En las células con 285 no se detectaba ARNm, igual que en el tamaño de 962 repeticiones (Feng y col., 1995).

### *3.1 Estudios sobre la proteína FMR-1.*

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen FMR-1 indica que forma parte de la familia de proteínas con capacidad de unión al ARN que tiene dos dominios KH y una caja RGG. Como se dijo anteriormente, se ha descrito un paciente con el fenotipo grave del síndrome X frágil, sin expansión de tripletes CGG/CCG y con una mutación puntual en el primer dominio KH. La sustitución de una Adenina (A) a Timina (T) que conlleva el cambio de una Isoleucina a Asparragina y produce el fenotipo de la enfermedad reafirma la importancia del dominio KH en la función de la proteína (Deboulle y col. 1993).

Utilizando espectroscopía con resonancia magnética nuclear se ha establecido que el dominio KH tiene un pliegue alfa-beta que consistiría en tres hojas beta antiparalelas conectadas por dos hélices alfa, que en algunos dominios KH estarían estabilizadas por una hélice alfa en la zona carboxilo terminal



## **INTRODUCCIÓN**

---

(Castiglione y col., 1995).

En los estudios de expresión a nivel de proteína se han observado diferentes isoformas que vendrían determinadas por maduración alternativa del ARNm entre los distintos exones del gen: IX-X, XI-XIII, XIII-XV, XIV-XV (Verkerk y col., 1993). Con anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína FMR-1 humana se han detectado en el citoplasma de las células de 27 tejidos distintos, varias proteínas de pesos moleculares diferentes. La proporción relativa de cada polipéptido es distinta en cada tejido estudiado, encontrándose una expresión más intensa en animales jóvenes (Khandjian y col., 1995).

Las isoformas de 67-90 kDa tienen el mismo extremo amino terminal que las de 39-41 kDa pero se diferencian en el extremo carboxilo, probablemente como resultado de una proteólisis que elimina el extremo carboxi-terminal. Estas isoformas de menor tamaño no tienen capacidad de unirse a ARN (Verheij y col., 1995). Se ha demostrado que la proteína FMR-1 puede unir su propio ARN mensajero y a un 4% de todos los ARNm celulares, sugiriéndose que tenga alguna función en el metabolismo del ARN (Ashley y col., 1993).

Recientemente se ha observado que la proteína FMRP forma parte de la subunidad 60S de los ribosomas pegados al retículo endoplasmático y de los que están libres en el citoplasma (Willemsn y col., 1996). Se ha determinado que una isoforma de la proteína en la que no existe el exon XIV, se localiza en el núcleo celular donde está asociada a los componentes granulares (Sittler y col., 1996 ; Willemsen y col., 1996).

Se han estudiado los niveles de FMRP en células de individuos con expansiones en el rango de la premutación (285 tripletes) y se observa expresión del ARNm pero que no de proteína, indicando que el aumento en el número de tripletes

puede inhibir la traducción (Feng y col. 1995b).

En la figura 11 se esquematiza una hipótesis para explicar la aparición de fenotipos intermedios en el síndrome X frágil, que dependerían del nivel de proteína FMRP.

Recientemente se han descubierto dos proteínas llamadas FXR1 (70 kDa) y FXR2 (74 kDa) cuyos genes están localizados en los cromosomas 12q13 y 17p13.1 respectivamente, que presentan una secuencia sorprendentemente similar entre ellas y con el gen FMR-1. Tienen dos dominios KH con una identidad del 86% entre FMRP y FXR1 y del 60% con FXR2. Estas proteínas también funcionarían como unidoras de ARNm, sin embargo su expresión es normal en pacientes con el síndrome X frágil.

En estudios "in vitro" se observan interacciones muy fuertes entre este grupo de proteínas, encontrándose homómeros y heterómeros de unas con otras, por lo que se propone que proceden de un grupo de genes relacionados por su estructura y muy posiblemente por su función. Se sugiere una posible regulación de la actividad de la proteína FMR-1 por FXR1 y FXR2 que podrían secuestrar la proteína FMRP y regular su actividad negativamente (Siomi y col., 1995; Zhang y col., 1995).

### *3.2 Modelo animal del síndrome X frágil.*

El consorcio Belga-Holandés para el estudio del síndrome X frágil (1994) ha obtenido un ratón nulo del gen FMR-1 que se está utilizando como modelo animal del síndrome. En el ratón se ha generado una mutación sin sentido en el gen FMR-1 por lo que no hay transcripción ni traducción del gen.

El ratón presenta macroorquidismo aunque muestra una fertilidad normal. No se observa letalidad fetal o baja viabilidad de la descendencia por lo que se postula que el gen

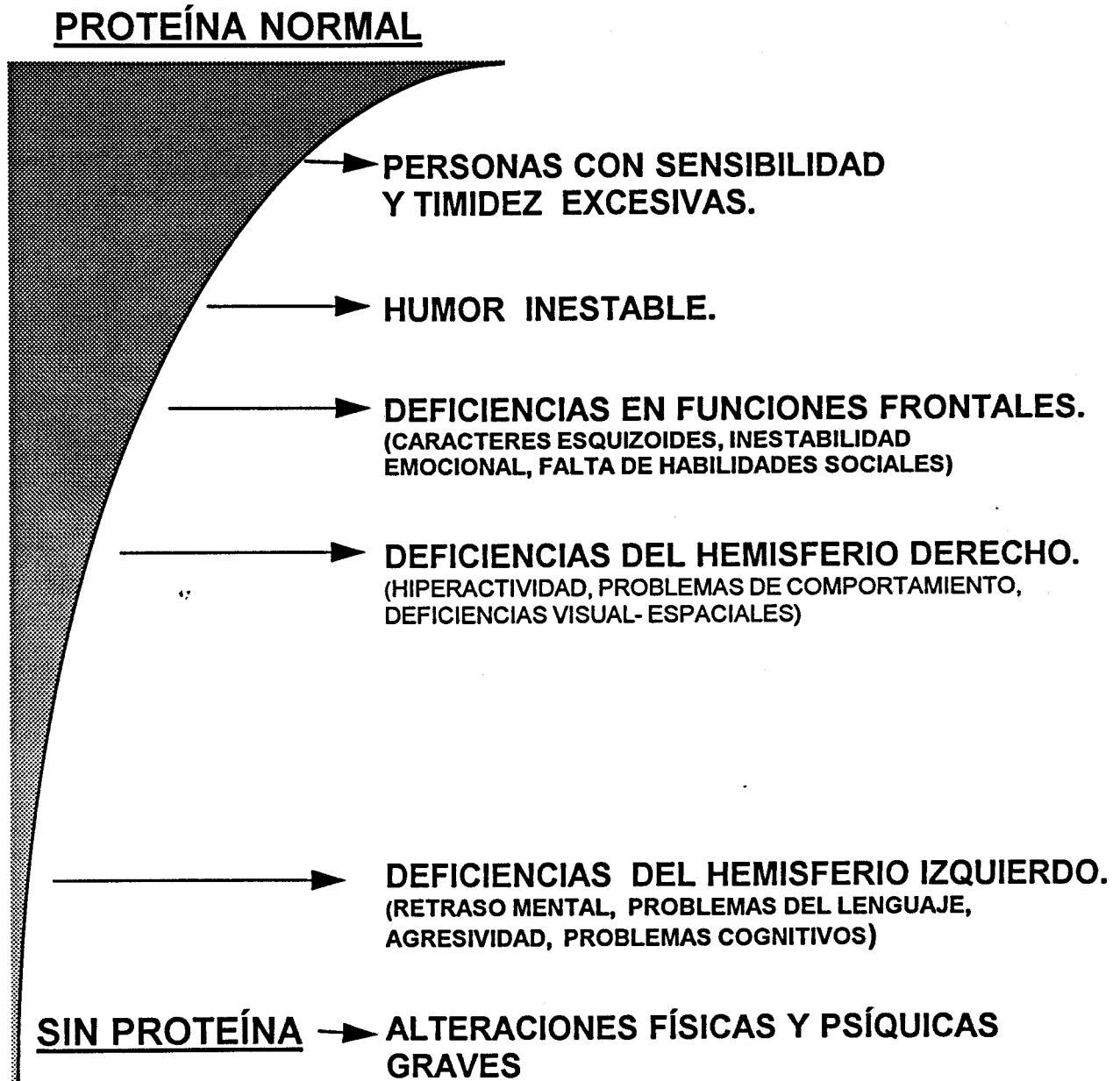


Figura 11. Esquema de la hipótesis que explica la aparición de fenotipos intermedios en el síndrome X frágil, determinado por los niveles de proteína FMRP, (adaptada de Hagerman y Cronister, 1996).

FMR-1 no debe tener un papel esencial en el desarrollo. No se detectan otras alteraciones físicas patentes o graves. Se observa que muestran hiperactividad y deficiencias en el aprendizaje. Se observa una dificultad mayor para aprender los cambios generados en el entorno que los ratones normales (Kooy y col., 1996).

En pruebas bioquímicas midiendo los niveles de AMP cíclico en ratones mutantes no se observa disminución de los niveles con respecto a los controles a diferencia de lo encontrado en plaquetas de pacientes X-frágiles (Godfraind y col., 1996).

#### **4. FRAGILIDADES PRÓXIMAS AL LOCUS FRAXA.**

Durante el diagnóstico citogenético del síndrome X frágil se ha demostrado que aparecen otras dos fragilidades raras distintas a FRAXA en la banda Xq28 en familias que no mostraban expansión de la zona de los tripletes CGG/CCG del gen FMR-1 (Flynn y col., 1993; Hirst y col. 1993). A 500 Kb distal a FRAXA se expresa la fragilidad FRAXE que en algunas familias se encuentra ligada a un retraso mental moderado (Nakaori y col., 1991; Sutherland y Baker, 1992). También se ha descrito la expresión de la fragilidad sin retraso mental (Mulley y col., 1995).

Se ha clonado la zona donde se expresa la fragilidad FRAXE y se ha encontrado un polimorfismo de tripletes ligado a una isla CpG. En individuos normales aparecen de 6 a 25 tripletes CCG/CGG, mientras que en individuos que expresan la fragilidad hay más de 200 tripletes y se asocia a hipermetilación de la isla CpG próxima a FRAXE. En mujeres portadoras se observan expansiones intermedias con un número de tripletes superior a 100 y no expresan la fragilidad ni tienen retraso mental (Knight y col., 1993).

En los casos estudiados de transmisión de un alelo expandido a través de un varón se han observado siempre retracciones en el

## INTRODUCCIÓN

---

a través de un varón se han observado siempre retracciones en el número de tripletes del locus FRAXE, encontrándose también retracciones en los tripletes al pasar de la madre a los hijos (Hamel y col., 1994).

También se ha visto el fenómeno de mosaicismo lo que conduce a una variabilidad en la expresión del fenotipo ligado a locus FRAXE, muy similar a lo encontrado para el síndrome X-frágil (Knight y col., 1994). Se han descrito dos casos de una delección submicroscópica en la región Xq28 en dos pacientes con desordenes del desarrollo y problemas en el habla (Holden y col., 1996). Utilizando la sonda VK21A se han detectado dos ARNm diferentes encontrándose homología cruzada con otras especies lo que indica que se ha conservado durante la evolución (Gedeon y col., 1995).

A mediados de 1996 se ha localizado, a partir de un paciente con una delección en la zona FRAXE, un gen denominado FMR-2 situado distalmente a la isla CpG descrita en la zona y que no se expresa en los pacientes que presentan expansión de los tripletes (CCG/CGG)<sub>n</sub> ligados a esta isla CpG. Se observa que se transcribe en cerebro y placenta y muestra homologías con otras proteínas conocidas (Gecz y col., 1996; Gu y col., 1996).

En estudios poblacionales se determina que la incidencia del retraso mental ligado a FRAXE es muy baja. En un estudio de 396 varones que requerían educación especial (215 con retraso mental profundo) no se encontró ninguno que presentara expansión de los tripletes en el locus FRAXE, aunque se encontró un individuo con una microdelección de 40 pb en la zona de los tripletes (Holden y col., 1996).

En otro estudio no se encuentra ningún alelo expandido del locus FRAXE, en una población de 312 varones y 150 mujeres lo que indicaría una frecuencia muy baja en la población general. En la población normal se observa que 6 alelos representan el 86% de

los cromosomas estudiados, seguido del de 16 triplete que representa el 18% (Meadows y col., 1996).

En España se han encontrado tres familias, entre 70 estudiadas con expresión de fragilidad citogenética en la zona Xq 27-28, que presentan expansión de los triplete GCC/GGC en el locus FRAXE (Carbonell y col., 1996). En estas familias aparecen individuos normales con expansión, individuos con retraso leve y otros con retraso profundo. Esta variabilidad podría explicarse por un mosaicismo de tejidos ya que se ha observado un individuo con retraso mental profundo que presentaba mosaicismo en células de la sangre.

Estudiando el estado de expansión del locus en el esperma de un varón transmisor normal que presenta la mutación total en sangre, y encuentran que sólo presenta la premutación semajante a lo observado en el locus FRAXA. Estudiando las características fenotípicas se observa que, en dos varones con la expansión total y retraso mental, uno muestra hiperactividad y otro macroorquidismo, características infrecuentes en la expansión del locus FRAXE (Carbonell y col., 1996).

Se ha descrito una familia con expansión del locus FRAXE pero sin expresión citogenética de la fragilidad cromosómica en Xq 28. En esta familia dos hermanos tenían una expansión total y metilación de la isla CpG sin embargo uno tenía retraso mental y el otro era clínicamente normal (Murgia y col., 1996). Estos casos ponen de manifiesto la gran variabilidad fenotípica asociada a la expansión de los triplete del locus FRAXE.

Continuando los estudios de familias que presentaban fragilidad citogenética en Xq28, pero que no presentaban expansión en los triplete en el locus FRAXE, usando técnicas de hibridación "in situ" por fluorescencia, se ha localizado a 1.2 Mb distal de FRAXA, un tercer sitio frágil raro que se ha

## **INTRODUCCIÓN**

---

1.2 Mb distal de FRAXA, un tercer sitio frágil raro que se ha denominado FRAXF, proximal al locus GABA- $\alpha$ C y al locus IDS implicado en el síndrome de Hunter's (Hirst y col., 1993).

La expresión de la fragilidad FRAXF no parece estar ligada a ningún retraso mental, aunque se ha demostrado que la fragilidad está asociada a la expansión de una zona de tripletes CGG/CCG que en el rango normal de 6 a 29 repeticiones se transmite de manera estable. En un estudio de 123 cromosomas normales el alelo de 14 tripletes representa el 42% de la frecuencia alélica y se observa una heterocigosidad del 78% (Parrish y col., 1994).

Estudios de poblaciones del locus FRAXF en 500 varones, se han encontrado alelos de 10 a 38 tripletes representando el alelo de 14 tripletes el 53% de la frecuencia alélica. No se ha encontrado ningún alelo premutado o mutado en este estudio lo que indica que en caso de existir expansiones en esta zona la frecuencia es muy baja en la población (Holden y col., 1996).

Se ha descrito que los alelos de 36-38 tripletes pueden tener cierta inestabilidad en la transmisión. La frecuencia alélica se acumula en los alelos de 12, 14, 21, 23 y 24 repeticiones, siendo el resto de los alelos encontrados muy poco frecuentes. Se ha propuesto que los alelos 21-24 procederían de los alelos 12-14 por un error de la polimerasa en la replicación de la zona (Holden y col., 1996).

En la figura 12 se muestra un esquema de la localización de los locus FRAXA, FRAXE y FRAXF que determinan las fragilidades citogenéticas observadas al final del brazo largo del cromosoma X, en la zona Xq27.3-28. Que están debidas a la expansión de los tripletes CGG/CCG que se indican en los tres casos, así como las islas CpG reguladoras de la transcripción de los genes FMR-1 y FMR-2, ligados a FRAXA y FRAXE respectivamente.

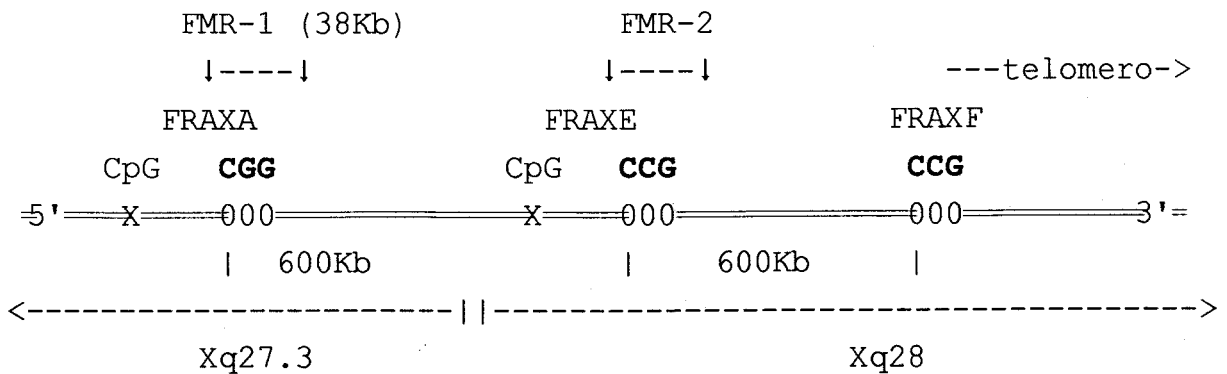


Figura 12. Localización de las zonas inestables de triplete CCG/CCG encontrados en las bandas q27.3-28 del cromosoma X, indicando los genes a los que están ligados en el caso de FRAXA y FRAXE.

En la figura 13 se muestra un esquema del bandeo de un cromosoma X indicando la localización de las fragilidades que se observan en preparaciones citogenéticas. Las denominadas FRAXB; FRAXC y FRAXD son comunes y se expresan en preparaciones normales, no se han asociado con ninguna patología. Las indicadas como FRAXA, FRAXE y FRAXF son las que se denominan raras porque aparecen bajo condiciones especiales de cultivo en medio pobre en ácido fólico.

## 5. EL ADN INESTABLE UN NUEVO TIPO DE MUTACIÓN GENÉTICA.

Con el descubrimiento en el año 1991 de la mutación por inestabilidad de triplete que causaba el síndrome del X frágil, se abrió el camino para encontrar la causa de otras enfermedades en las que también se observaba el fenómeno de la anticipación y de la gran variabilidad clínica. Así en muy pocos años se han localizado otros genes con zonas de repeticiones de triplete donde se genera la inestabilidad que están involucrados en el desarrollo de varias enfermedades (Warren, 1996).



# INTRODUCCIÓN

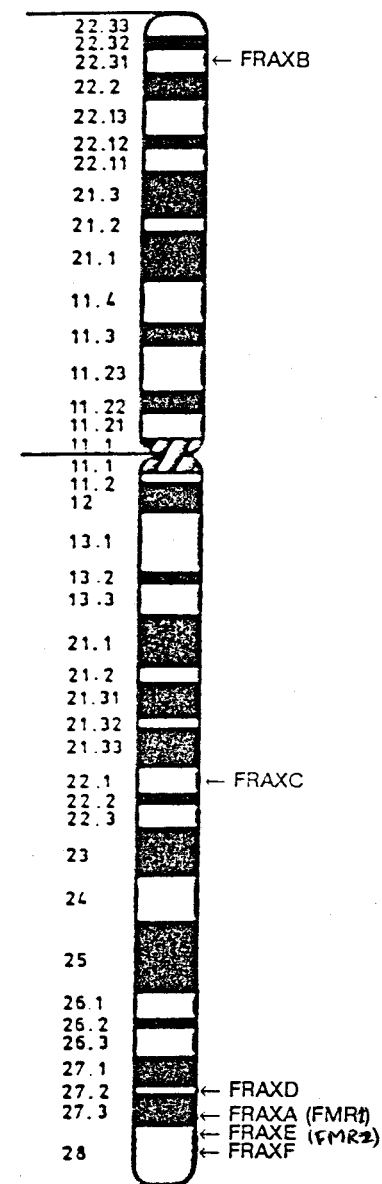


Figura 13. Esquema de bandeo G del cromosoma X con la localización de las fragilidades observadas en estudios

En los últimos 5 años se han encontrado otros 12 loci humanos, donde se observan expansiones en repeticiones de tripletes ligados casi siempre a enfermedades neurológicas. De los tripletes que pueden establecer secuencias repetitivas diferentes, hasta el momento sólo se ha observado la expansión, en tres tipos de tripletes distintos: CGG/CCG, CAG/CTG, GAA/TTC. 5 loci están ligados a la aparición de fragilidades cromosómicas, pero en 7 enfermedades no aparece fragilidad ligada a la zona de expansión (Ross y col., 1993; Warren 1996).

Otras enfermedades en las que se ha observado este tipo de mutación por ADN inestable son: la enfermedad de Kennedy o atrofia bulboespinal hereditaria (CAG/CTG), la enfermedad de Steiner o distrofia miotónica (CTG/CAG), la corea de Huntington (CAG/GTC), la ataxia espinocerebelosa tipo I (CAG/CTG), la enfermedad de Machado-Joseph (CAG/CTG), el síndrome de Haw-River o atrofia dentorrubropalidolusiana (CAG/CTG), el retraso mental ligado al locus FRAXE (CGG/CCG) y la Ataxia de Friedreich (GAA/TTC) (Warren, 1996).

En la tabla V se muestra una relación de las enfermedades por inestabilidad del ADN y los datos que se conocen hasta el momento actual. Las expansiones del triplete CAG/CTG en todas las enfermedades, menos en la distrofia miotónica, se produce en la parte codificante del gen por lo que en la proteína aparece una zona de poliglutamina. En estos casos la patología se produce por ganancia de función, es decir aparece una proteína con propiedades alteradas que determinaría la aparición de la patología. En el resto de enfermedades debidas a expansiones, lo que ocurre es una pérdida de función al inhibirse la transcripción y/o la traducción, y no tener la proteína correspondiente o transcribirse un ARNm defectuoso que no puede madurar como se ha propuesto que ocurre en la ataxia de Friedreich's (Warren, 1996).

## **INTRODUCCIÓN**

---

En los últimos 5 años se han encontrado otros 12 loci humanos, donde se observan expansiones en repeticiones de tripletes ligados casi siempre a enfermedades neurológicas. De los tripletes que pueden establecer secuencias repetitivas diferentes, hasta el momento sólo se ha observado la expansión, en tres tipos de tripletes distintos: CGG/CCG, CAG/CTG, GAA/TTC. 5 loci están ligados a la aparición de fragilidades cromosómicas, pero en 7 enfermedades no aparece fragilidad ligada a la zona de expansión (Ross y col., 1993; Warren 1996).

Otras enfermedades en las que se ha observado este tipo de mutación por ADN inestable son: la enfermedad de Kennedy o atrofia bulboespinal hereditaria (CAG/CTG), la enfermedad de Steiner o distrofia miotónica (CTG/CAG), la corea de Huntington (CAG/GTC), la ataxia espinocerebelosa tipo I (CAG/CTG), la enfermedad de Machado-Joseph (CAG/CTG), el síndrome de Haw-River o atrofia dentorrubropalidolusiana (CAG/CTG), el retraso mental ligado al locus FRAXE (CGG/CCG) y la Ataxia de Friedreich (GAA/TTC) (Warren, 1996).

En la tabla V se muestra una relación de las enfermedades por inestabilidad del ADN y los datos que se conocen hasta el momento actual. Las expansiones del triplete CAG/CTG en todas las enfermedades, menos en la distrofia miotónica, se produce en la parte codificante del gen por lo que en la proteína aparece una zona de poliglutamina. En estos casos la patología se produce por ganancia de función, es decir aparece una proteína con propiedades alteradas que determinaría la aparición de la patología. En el resto de enfermedades debidas a expansiones, lo que ocurre es una pérdida de función al inhibirse la transcripción y/o la traducción, y no tener la proteína correspondiente o transcribirse un ARNm defectuoso que no puede madurar como se ha propuesto que ocurre en la ataxia de Friedreich's (Warren, 1996).

Otros locus donde se ha observado expansión de tripletes pero que no se han asociado a ninguna enfermedad son los sitios frágiles 11B, 16A, FRAXF en los que se expande el triplete (CGG/CCG) (Warren, 1996). En otras muchas proteínas se han encontrado zonas de tripletes repetidos aunque no se han asociado a este tipo de enfermedades como son el receptor  $\alpha_2$  adrenérgico con una zona con 6 GAG que en la proteína serían 6 glutaminas, o una proteína de unión a la caja TATA con 18 CAG que aparecen en la proteína como una región rica en glutamina, o el factor de transcripción TFEB con una región de 10 glutaminas debido una zona de repeticiones CAG (Ross y col. 1993).

En la figura 15 se muestra un esquema de la localización de la zona repetitiva de tripletes en los genes implicados en las patologías descritas como ejemplo de mutaciones dinámicas por ADN inestable.

Se han localizado 100 loci con más de 5 repeticiones AGC/GCT y otras muchas zonas de repeticiones en más de 40 ADNc por lo que el mecanismo de mutación por expansión de zonas inestables puede ser frecuente y ser la causa de enfermedades hereditarias en las que se observan características como la anticipación, transmisión dominante, monogenicidad, variabilidad fenotípica y/o impronta genética (Ross y col. 1993).

Entre las que se postulan como posibles enfermedades por ADN inestable están la esclerosis múltiple, el temblor esencial familiar, la ataxia hereditaria dominante tipo 2, la enfermedad de Fabry, el autismo, la esquizofrenia, la enfermedad maniaco depresiva y muchas otras que posiblemente pronto pasen a aumentar el grupo de enfermedades debidas a mutación por inestabilidad del ADN (Ross y col. 1993).

### *5.1. Mecanismos de expansión de las repeticiones.*

## INTRODUCCIÓN

---

Otros locus donde se ha observado expansión de tripletes pero que no se han asociado a ninguna enfermedad son los sitios frágiles 11B, 16A, FRAXF en los que se expande el triplete (CGG/CCG) (Warren, 1996). En otras muchas proteínas se han encontrado zonas de tripletes repetidos aunque no se han asociado a este tipo de enfermedades como son el receptor  $\alpha_2$  adrenérgico con una zona con 6 GAG que en la proteína serían 6 glutaminas, o una proteína de unión a la caja TATA con 18 CAG que aparecen en la proteína como una región rica en glutamina, o el factor de transcripción TFEB con una región de 10 glutaminas debido una zona de repeticiones CAG (Ross y col. 1993).

En la figura 15 se muestra un esquema de la localización de la zona repetitiva de tripletes en los genes implicados en las patologías descritas como ejemplo de mutaciones dinámicas por ADN inestable.

Se han localizado 100 loci con más de 5 repeticiones AGC/GCT y otras muchas zonas de repeticiones en más de 40 ADNc por lo que el mecanismo de mutación por expansión de zonas inestables puede ser frecuente y ser la causa de enfermedades hereditarias en las que se observan características como la anticipación, transmisión dominante, monogenicidad, variabilidad fenotípica y/o impronta genética (Ross y col. 1993).

Entre las que se postulan como posibles enfermedades por ADN inestable están la esclerosis múltiple, el temblor esencial familiar, la ataxia hereditaria dominante tipo 2, la enfermedad de Fabry, el autismo, la esquizofrenia, la enfermedad maniaco depresiva y muchas otras que posiblemente pronto pasen a aumentar el grupo de enfermedades debidas a mutación por inestabilidad del ADN (Ross y col. 1993).

### *5.1. Mecanismos de expansión de las repeticiones.*

secuencias de tripletes concretas para formar estructuras en cruadruplex que podría actuar dificultando la acción del complejo de replicación (Kettani y col. 1996). También se ha postulado en el síndrome X frágil, que la interrupción periódica de las repeticiones por un tipo distinto de tripletes cada 9-10 tripletes, estabiliza la secuencia repetitiva (Chung y col., 1993; Hirst y col., 1994; Reiss y col., 1994; Snow y col., 1994).

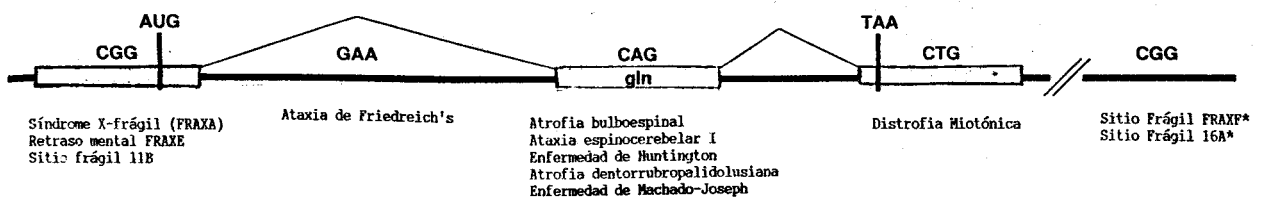
La pérdida de estas interrupciones en determinados alelos induciría la inestabilidad al pasar de una generación a otra. En los alelos premutados, no aparecen o si están solo se encuentran en la zona más centromérica de las repeticiones, apareciendo largas colas de tripletes iguales hacia el telomero. Es en esta zona terminal donde se producen las expansiones, pues la zona más centromérica de las repeticiones, donde están las interrupciones en los alelos premutados se heredan sin cambios. En los alelos mutados las variaciones aparecen en los dos extremos de la zona repetitiva, pudiéndose perder las interrupciones si aparecían en la generación anterior (Zhong y col. 1996).

Se han encontrado en algunos casos retracciones en los alelos mutados que acercan el tamaño de la expansión a la premutación o al tamaño normal, este fenomeno se ha detectado muy raras veces por lo que debe ser poco frecuente. En otras enfermedades por mutación inestable del ADN no se observan interrupciones como ocurre en el retraso mental ligado a FRAXE, en la Corea de Huntington o en la Distrofia Miotónica, lo que indicaría que el fenomeno estabilizador de las interrupciones no es general y debe haber otros fenomenos implidacos en la inestabilidad de la secuencia (Zhong y col. 1996).

## INTRODUCCIÓN

TABLA V. Enfermedades debidas a la expansión de tripletes.

Enfermedad Neurológica	Situación	Triplete	Gen	RANGO			Función
				Normal	Portador	Afecto	
S. X-frágil	Xq27.3	(CGG) <sub>n</sub>	FMR-1 5'UTR	6-52	50-200	>230	perdida
E. Kenedy (A.bulboespinal)	Xq11-12	(CAG) <sub>n</sub>	AR Exón 1	12-34	?	40-62	ganancia
D. Miotónica	19q13.3	(CTG) <sub>n</sub>	PKAMP <sub>C</sub> 3'UTR	5-37	?	>50	ARNm más estable
E. Huntington	4p16.3	(CAG) <sub>n</sub>	IT15 Exón 1	9-37	?	42-200	ganancia
Ataxia espino- cerebelar I	6p22-23	(CAG) <sub>n</sub>	ADCA-1 Exón 1	6-39	?	41-81	ganancia
Retraso mental ligado a FRAXE	Xq28	(CGG) <sub>n</sub>	FMR-2 5'UTR	6-25	100	>200	perdida
A. dentorrubro- palidolusiana	12p12-13	(CAG) <sub>n</sub>	?	7-23	?	49-75	?
Ataxia de Friedreich's	9q13	(GAA) <sub>n</sub>	X25 intrón 1	10-21	?	>200	ARNm sin madurar



## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVOS GENERALES.**

Los objetivos generales de este trabajo son, montar la técnicas para el diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil por análisis del ADN, así como estudiar el síndrome en la población andaluza y calcular la prevalencia de este retraso mental hereditario en nuestra comunidad. El análisis del retraso mental hereditario, con estas técnicas, permite un diagnóstico de certeza para el síndrome X frágil, tanto en individuos afectados como en portadores asintomáticos, que sin padecer el retraso mental pueden pasarlo a las siguiente generación, que si tendrá riesgo de manifestar el síndrome.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

A) Estudiar individuos con retraso mental de etiología desconocida para determinar, si se debe a la expansión de los triplete del gen FMR-1, causante del síndrome X frágil.

B) Estudiar las familias de los individuos diagnosticados como afectados del síndrome X frágil y caracterizar a los varones portadores normales y a las mujeres portadoras, para que puedan pedir consejo genético en el caso de querer tener descendencia.



## **OBJETIVOS**

---

C) Establecer relaciones entre el genotipo y el fenotipo en los individuos con la mutación en el gen FMR-1 por expansión de los triplete, en familias con varias generaciones.

D) Determinar la frecuencia alélica del gen FMR-1, estudiando las variaciones en el número de triplete, en la población normal. Comparándola con otras poblaciones establecer posibles diferencias.

E) Determinar las frecuencias haplotípicas para los loci DXS548 y FRAXA, en la población normal y en la población X frágil, buscando posibles desequilibrios de ligamiento en algún alelo, que apoyen el origen ancestral de la mutación X frágil.

F) Estudiar el mosaicismo en individuos normales con alelos premutados en células sanguíneas, para explicar la manifestación parcial de algunos rasgos del síndrome.

G) Estudiar la secuencia de las zonas de triplete CGG/CCG y adyacentes a las repeticiones del gen FMR-1 para determinar posibles causas que favorezcan la inestabilidad de la zona de los triplete.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para el estudio del síndrome X frágil las muestras que se analizaron fueron células nucleadas de sangre periférica, células del bulbo piloso y células de mucosa bucal.

Las muestras de sangre se obtenían de pacientes de los Servicios de Neuropediatría, Psiquiatría infantil o Citogenética de los siguientes Hospitales: H. Universitario Virgen Macarena de Sevilla, H. Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, H. Juan Ramón Jiménez de Huelva, H. Infanta Elena de Huelva, H. Vázquez Díaz de Huelva, H. de Especialidades Médicas de Jaén, H. Infanta Margarita de Cabra (Córdoba), H. Universitario Puerta del Mar de Cádiz, H. Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. Otras muestras procedían de colegios de educación especial o de integración. Los sujetos a estudiar presentaban retraso mental de moderado a severo de causa desconocida o fragilidades citogenéticas en la zona ligada al síndrome X frágil.

En los casos de diagnóstico positivo del síndrome X frágil se estudiaban otros miembros de la familia. Se ha realizado un diagnóstico prenatal, a partir de líquido amniótico, a petición

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

de la madre que había resultado ser portadora en un estudio familiar previo.

Las muestras de mucosa bucal y de bulbo piloso se obtuvieron de individuos X frágil positivos (afectos o portadores) para estudiar el posible mosaicismo de la mutación, en tejidos con diferente origen embrionario.

### **2. ENZIMAS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.**

Para la extracción de ADN genómico se usaron los siguientes productos químicos siempre de grado molecular o purísimos:

- Dextrano salino al 6%.
- Perclorato sódico 5M.
- EDTA 0,5 M pH:8,0.
- SDS 10%.
- Fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1).
- Cloroformo-isoamil alcohol (24:1).
- Isopropanol.
- Etanol 99%.
- Tampón de lisis de leucocitos (BLL)  
(0,01M Tris-Cl, 0,4M ClNa, 0,002M EDTA).
- Tris-EDTA 10:1 pH:8.0 ( 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA).
- PBS (120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM tampón fosfato salino pH:7,4).
- TENS (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 0,1N NaOH, 0,5% SDS).
- Proteinasa-K 20 mg/ml.

Para el cultivo de bacterias, se usaron los medios y reactivos indicados a continuación:

- Medio "LB Broth", 300 ml (3 g Bacto-agar,

1,5 g de extracto de levadura y 3 g de NaCl), autoclavado.

- Ampicilina 50 mg/ml, se usa a 50 µg/ml.
- Medio de siembra en placas de "petri" (250 ml LB y 3,75 g Bacto-agar), estéril y 100 µg/ml ampicilina.
- Medio líquido " Brain Heart infusion".

Para la purificación de los plásmidos portadores de las sondas, se usaron los siguientes tampones:

- P1 100 µg/ml ARNasa, 50mM Tris-ClH, 10mM EDTA pH:8,0.
- P2 200mM NaOH, 1% SDS.
- P3 3M KaC pH:5,5.
- QBT 750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Etanol, 0,15% tritón X-100, pH:7,0.
- QC 10mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Etanol pH:7,0.
- QF 1.25 NaCl, 50mM tris-ClH, 15% Etanol pH:8,5.

Para las reacciones de digestión se usaron las enzimas siguientes, con sus tampones comerciales correspondientes:

- EcoRI (Promega).
- EagI (Biolabs).
- PstI (Promega).
- HindIII (Promega).
- SacII (Pharmacia).
- MspI (Promega).

Para las Reacciones de amplificación con la polimerasa se usaron las enzimas y los reactivos que se indican a continuación:

- Taq polimerasa (Perkin-Elmer o Promega).

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

- Tth polimerasa (Clontock).
- T4 polinucleótido kinasa (Promega).
- Pfu polimerasa Nativa (Stratagene).
- Pfu polimerasa Clonada (Stratagene).
- Desoxinucleótidos radioactivos, dCTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P], dATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P], dATP [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] (Amersham).
- DMSO 100%.
- Albúmina bovina fracción V grado molecular (Sigma).
- Gelatina 10 mg/ml.
- Aceite mineral (Perkin-Elmer o Sigma).
- Desoxinucleótidos trifosfatos 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- 7-deaza DGTP 10mM y 7-deaza dATP 10mM.
- Cl<sub>2</sub>Mg 25 mM.
- Oligonucleótidos purificados como cebadores (Boehringer-Mannheim y Promega).

Para las electroforesis se usaron los siguientes tampones y reactivos de grado molecular:

- TBE 5X (0,45M tris-borato, 0,01M EDTA pH:8,3).
- TAE 10X (0,4M tris-acetato, 0,01M EDTA pH:8,0).
- Agarosa Seakem GTG (FMC).
- Agarosa LMP Nusieve GTG (FMC).
- Poliacrilamida 19:1 40%.
- Tampón de carga I (Agarosa LMP 1%, 0,025% Azul de bromofenol).
- Tampón de carga II (30% Glicerol, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de Xilene cianol).
- Tampón de carga III ( 95% Formamida, 10mM NaOH, 0,5% azul de bromofenol, 0,5% Xilene cianol).
- Amonio persulfato 10% (Sigma).
- TEMED (Sigma).
- Bromuro de Etidio 10 mg/ml (Sigma).

- Marcadores de peso molecular (PBR322 MspI, 1Kb ladder, PCR Marker,  $\lambda$ -Hind III,  $\phi$ 174 Hae III).
- Urea grado molecular (Sigma).

Para las hibridaciones se usaron los tampones que se indican a continuación:

- Hibridación a 42°C: T. Prehibridación (6x SSPE, 5x Denhardt's, 0,5% SDS, 10  $\mu$ g/ml SSDNA, 40% formamida). T. Hibridación (6x SSPE, 1x Denhardt's, 0,5% SDS, 10  $\mu$ g/ml SSDNA, 40% formamida).
- Hibridación a 60°C: T. Pre/hibridación. (2% SSPE, 8% SDS, 60  $\mu$ g/ml SSDNA, 12% Polietilenglicol).
- Hibridación a 65°C: Tampón comercial (" Rapid hibrid Buffer", Amersham).
- Solución de lavado I: 2x SSC, 0,1% SDS.
- Solución de lavado II: 0,1x SSC, 0,1% SDS.
- Denhardt's 50x (1% Ficoll, 1% polivinilpirrolidona, 1% albúmina bovina fracción V).
- SSC 20x ( 3M NaCl, 0,3M Na<sub>2</sub>-citrato, pH:7,0).
- SSPE 20x (3M NaCl, 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,02M NaEDTA.2H<sub>2</sub>O).
- "SSDNA" sonicado 10 mg/ml (ADN de esperma de Salmón).

### 3. EXTRACCIÓN DEL ADN.

La extracción del ADN se realizó por distintos métodos según el origen de la muestra. Cuando se disponía de 10 ml de sangre se siguió el protocolo de precipitación salina, obteniendo cantidad suficiente de ADN para realizar todas las técnicas que se verán posteriormente. Cuando nos enviaban 2-3 ml de sangre o la muestra estaba parcialmente coagulada se realizaba la extracción con perclorato sódico que requiere menos cantidad de sangre. Para muestras de bulbo piloso, mucosa bucal y líquido

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

amniótico se utilizó la técnica de extracción con fenol. En todos los casos en los que el ADN estaba mal disuelto o se detectaba exceso de proteínas (midiendo la densidad óptica en el espectrofotómetro a 280/360 nm) se realizaba una reextracción con fenol.

### *3.1 Método de precipitación salina.*

Se utiliza 10 ml de sangre heparinizada a los que se añade 2,5 ml de dextrano salino al 6%, se mezcla cuidadosamente y se deja reposar durante 1 hora para que sedimente el dextrano con los hematíes. Se recoge la fase superior y se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm. El precipitado se resuspende en 2 ml de suero salino y se da un choque hipotónico para eliminar los hematíes que no hubieran quedado atrapados en el dextrano. Para ello se añade 6 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril, mezclándose durante un minuto exacto, se restaura la molaridad añadiendo 2 ml de NaCl al 3,5% y se mezcla durante unos segundos (todas las soluciones deben estar a 4°C). Las células nucleadas se obtienen por centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm y se resuspenden en 100 µl de PBS (en este paso se puede guardar las células a -20°C). Para continuar con la extracción, se añade 3 ml de tampón de lisis de leucocitos (BLL), 200 µl de SDS 10% y 35 µl de proteinasa-K (20 mg/ml); después de agitar los tubos durante una hora a 50°C se incuba a 37°C hasta el día siguiente.

Para precipitar las proteínas se añade 1 ml de NaCl 6M, agitando la muestra hasta que esté homogénea. A continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos, pasando el sobrenadante con cuidado a un tubo Falcon de 50 ml; se añade 2 volúmenes (8 ml) de etanol absoluto muy frío (-20°C), mezclando con suavidad hasta que se ve aparecer una medusa que corresponde al ADN precipitado. Se recoge la medusa y se lava con etanol al 70%, dejando que se seque durante unos minutos. Se resuspende en 500 µl de TE 10:1 pH:8,0 y se incuba a 37°C con agitación suave para

que se disuelva totalmente antes, de medir la densidad óptica en el espectrofotómetro.

### 3.2 *Extracción con perclorato sódico.*

Para la extracción de ADN con esta técnica, las células se rompen por congelación-descongelación. La sangre heparinizada se mezcla bien antes de repartirla en alícuotas. Se puede guardar a 4°C hasta 5 días. Se hacen alícuotas de 350 µl en tubos de 1,5 ml etiquetados y se congelan a -20°C hasta que se continúe el protocolo.

Se inicia la extracción de ADN descongelando las muestras en un baño a 37°C durante 2 minutos. Se centrifuga 2 minutos en microfuga (12500 rpm) a temperatura ambiente para sedimentar los núcleos. El sobrenadante se elimina con cuidado de no tocar el precipitado que es muy blando y difícil de distinguir del sobrenadante, se resuspende en 400 µl de la solución A (50mM Tris-Cl pH:8,0; 150mM NaCl; 100mM EDTA), con cuidado sin usar vórtex. Se añade 25 µl de SDS al 20%, se agita y se adiciona 80 µl de perclorato sódico 5M (recién preparado) para precipitar las proteínas; se mezcla bien, invirtiendo el tubo varias veces. Se añade 1 volumen (500 µl) de cloroformo y se mezcla invirtiendo el tubo durante 1-2 minutos.

Se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm y se recoge la fase superior acuosa pasándola a otro tubo donde se añaden 2 volúmenes de etanol 100% muy frío (-20°C) y se mezcla invirtiendo el tubo varias veces hasta que aparezca el ADN precipitado. Se centrifuga 1 minuto a 12000 rpm a temperatura ambiente, se desecha el sobrenadante y el sedimento se seca en "speed-vac" durante 2-3 minutos, resuspendiéndolo en 175 µl de tampón TE 10:1 pH:7,5. Se añaden 17,5µl de 3M acetato sódico pH: 5,2 y 500µl de etanol 100% muy frío, mezclando bien hasta ver el precipitado de ADN. Se centrifuga 1 minuto a 12000 rpm y se elimina el sobrenadante. Se



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

lava dos veces con 500µl de etanol al 80%. El precipitado se seca bien y se resuspende en 100µl de tampón EDTA 0,1 mM pH:8,0. Con este procedimiento se obtiene 40-60 ng/µl, un total de 15-20µg por cada 350µl de sangre inicial.

### **3.3 Extracción con fenol.**

En un tubo eppendorff de 1,5 ml se pone la muestra, 100 µl de sangre, bulbo piloso de 4-5 pelos, mucosa bucal o amniocitos y se añade 500 µl del tampón A (0,01 M Tris-Cl, 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl, 0,039 M DTT, 2% SDS, 20 µg/ml proteinasa-K). Se deja durante una noche a 37°C para digerir las proteínas. A continuación se añade 1 volumen de Fenol:cloroformo:isoamil alcohol (24:25:1) y se mezcla con cuidado, dejándolo en hielo unos minutos. Se centrifuga durante 3 minutos a 12000 rpm y se separan dos fases, la superior se pasa a otro tubo etiquetado, donde se añaden 0,1 volumen de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol absoluto muy frío (-20°C), se mezclan bien y se mantiene en el frigorífico a -20°C durante 2-3 horas. Se centrifuga durante 10 minutos a 12000 rpm en microfuga, desechándose el sobrenadante y lavando el precipitado con etanol 70%, se centrifuga la muestra 2 minutos a 12000 rpm y se desecha el sobrenadante. Se deja secar a temperatura ambiente o en "speed-vacum" 2-3 minutos y se resuspende en 30 µl de TE 10:1 pH:8,0; se deja a 37°C hasta que se disuelva totalmente.

### **4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN.**

Para determinar la concentración de ADN se toma una alícuota de la muestra y se disuelve en agua destilada, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm con cubeta de cuarzo. Una absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La concentración de la muestra se calculará multiplicando el valor de la absorbancia obtenida por 50 y por la dilución, expresándose en µg/ml.

Para conocer el grado de pureza del ADN se determina la concentración de proteínas midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm. La razón de la absorbancia 260/280 debe dar valores comprendidos entre 1,8-2. Cuando el cociente obtenido era inferior a 1.7 se realizaba una reextracción con fenol, disolviendo la muestra de nuevo para, a continuación, medir la concentración de una dilución en el espectrofotómetro.

Para calcular la concentración de ADN de cadena simple (oligonucleótidos) se sigue el mismo procedimiento teniendo en cuenta que un valor de absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 33 µg/ml. También se puede calcular la concentración de ADN, cargando una alícuota de la muestra, en paralelo a una cantidad conocida de un marcador de peso molecular, en un gel de agarosa al 1%, que se tiñe con bromuro de etidio y comparando la fluorescencia de la banda de la muestra con la banda del marcador que tenga un tamaño semejante, de la que se conoce la cantidad de ADN, se puede conocer un valor aproximado de la concentración de la muestra en la dilución. Este procedimiento se utiliza sobre todo para conocer la concentración de ADN en productos de PCR.

### **5. TÉCNICA DE "SOUTHERN-BLOT" PARA EL ESTUDIO DE LOS LOCI FRAXA Y FRAXE.**

#### *5.1 Obtención de las sondas.*

Para realizar la técnica de Southern se utilizaron las sondas StB12.3, cedida por el Dr. J.L. Mandel del INSERM (Estrasburgo); la Ox1.9 y la OxE.20 cedida por la Dra. S. Knight del Hospital John Radcliffe (Oxford). La sonda StB12.3 estaba insertada en un plásmido pBluescript II KS de 2,9 Kb con resistencia a ampicilina e incorporado en bacterias XLI blue KS. El tamaño del inserto era de 1,2 Kb y se obtenía con la enzima de restricción Pst1. La sonda Ox1.9 estaba insertada en un plásmido pUC18 con

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

resistencia a ampicilina incorporado en bacterias E.coli DH1. El tamaño del inserto era de 1,9 kb y se obtenía con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. La sonda OxE.20 de un tamaño de 800 pb, se conseguía tras la digestión del plásmido portador pBluescript recombinante, con las enzimas EcoRI y EagI.

Partiendo del medio sólido en el que nos enviaban las bacterias, se tomó una muestra para crecer en medio líquido "LB Broth" suplementado con ampicilina 50 µg/ml. Se utilizaba un tubo control con el mismo medio y sin bacterias para comprobar la efectividad de la ampicilina. Después de incubar toda la noche a 37°C con agitación se recrecían las bacterias en un volumen de 250 ml de "heart-brain infusión" autoclavado y con ampicilina 50 µg/ml. Así mismo se sembraban varias placas Petri para obtener colonias que pudieran conservarse durante 1 o 2 meses a 4 °C y poder utilizarlas en caso de no conseguir suficiente sonda de la primera extracción.

La obtención del plásmido a partir del cultivo de bacterias se hacía por lisis de las células y posterior separación del ADN cromosómico utilizando las columnas Qiagen y siguiendo el protocolo de la "Maxiprep" indicado por la casa comercial (Qiagen). Para comprobar que el inserto que lleva el plásmido corresponde a nuestra sonda se digieren 10 µl de la solución con la enzima o las enzimas de restricción adecuadas durante 2 horas a 37°C.

Los productos de la digestión y las muestras sin digerir se visualizaban corriendo una electroforesis en gel de agarosa Seakem GTG al 1% a 80 V durante 1-2 h y tiñendo el gel con bromuro de etidio. Se utilizaba el marcador de tamaños "1kb ladder" de Promega para determinar el tamaño de las bandas. La figura 15A muestra los resultados obtenidos de la digestión de los plásmidos portadores de las sondas StB12.3, Ox1.9 y OxE.20 que se usaron para el diagnóstico en nuestro laboratorio.

Del cultivo inicial de las bacterias, antes de romper las células, se toma 800  $\mu$ l y se mezcla con 200  $\mu$ l de glicerol estéril. Las bacterias así tratadas pueden congelarse a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un vial de congelación y volver a crecerlas cuando se necesite más cantidad de sonda. Como se observa en la figura 15A, los tamaños de los fragmentos digeridos corresponden con los esperados para las tres sondas, 1,2 Kb para StB12.3, 1,9 Kb para Ox1.9 y 800 pb para OxE.20. Por ello procedemos a la digestión de todo el plásmido obtenido en la etapa anterior: 50  $\mu$ l del ADN plasmídico, 9  $\mu$ l de solución tampón, 4.5  $\mu$ l del enzima o enzimas correspondientes, en 90  $\mu$ l de volumen de la reacción se incuban durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Los fragmentos de la digestión se separan por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión Nusieve 3:1 al 1% en TBE 1x con 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de bromuro de etidio. La electroforesis se realiza en cámara fría a 20 V durante 20 h aproximadamente lo que se muestra en la figura 15B. Bajo luz ultravioleta se visualizan los fragmentos correspondientes a las sondas, se recortan con un escalpelo y se colocan en un tubo previamente pesado para su posterior purificación.

La eliminación de la agarosa se hacía utilizando el protocolo del Jet Sorb de (Genomed) o el quiaquick de Qiagen. La concentración de la sonda se medió comparando con una banda de un marcador de tamaños con una cantidad de ADN conocida, en gel de agarosa Seakem GTG al 1%, teñido con bromuro de etidio. En la figura 16 se muestra las bandas correspondientes a las sondas después de la purificación que pueden compararse con las del marcador de tamaños  $\lambda$ -HindIII para calcular una concentración aproximada.

### 5.2 Marcaje de la sonda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

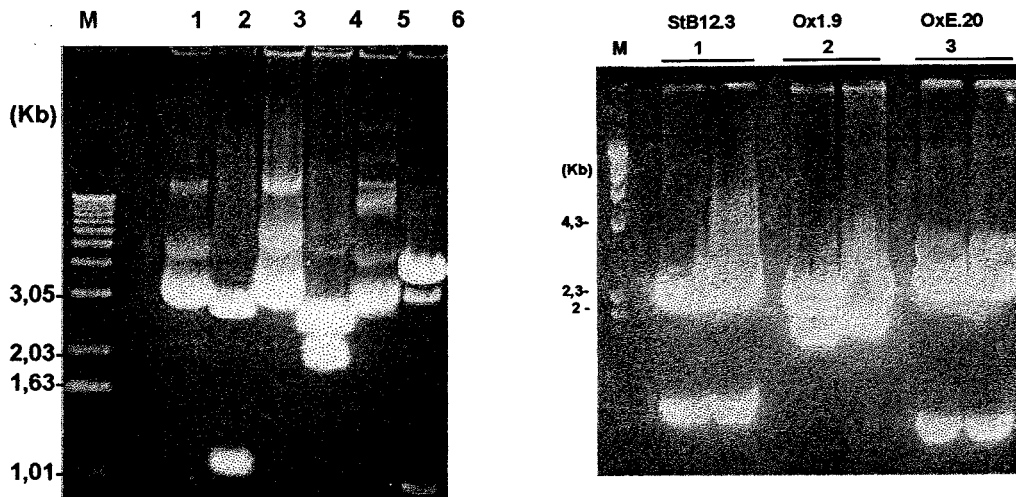


Figura 15. Fotografías de dos electroforesis en agarosa teñidas con bromuro de etidio, A: El primer carril (M) sería el marcador de tamaños "1 Kb leader", el carril 1 es el plásmido con la sonda StB12.3 sin digerir, el carril 2 la muestra 1 ya digerida la sonda sería el fragmento de tamaño 1,2 Kb, el carril 3 sería el plásmido con la sonda Ox1.9 sin digerir, el cuatro la muestra 3 digerida con la sonda de 1,9 Kb, en el carril 5 el plásmido con la sonda OxE.20 y el 6 la muestra 5 digerida esta sonda se ría la más pequeña 800 pb. B: Digestión de un volumen mayor, las bandas con la sonda que se muestran en esta fotografía (fragmentos inferiores) se recortan y purifican para usarlas en las hibridaciones. En este caso el marcador (M) es  $\lambda$ -hindIII.

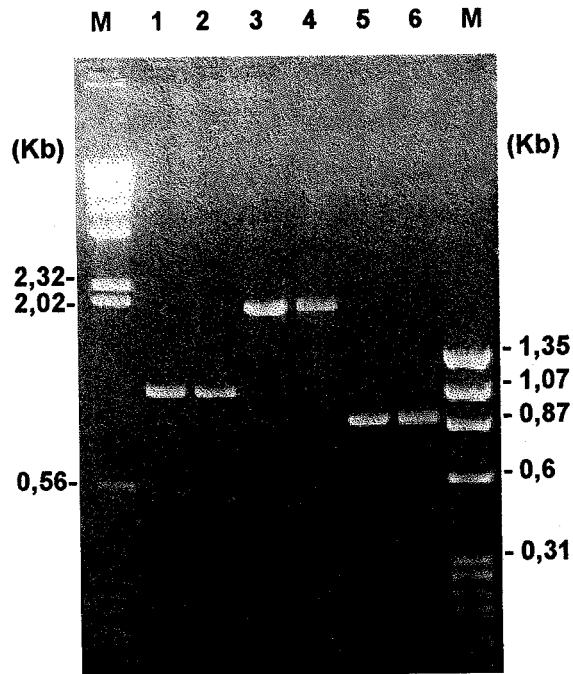


Figura 16. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa de las sondas purificadas. En el primer pocillo se puso 1  $\mu\text{g}$  del marcador de tamaños  $\lambda$ -HindIII, con el que se comparan las bandas de las sondas para calcular la concentración en la solución. En el último pocillo se puso el marcador de tamaños  $\phi$ 174-HaeIII. En los carriles 1 y 2 se muestra la sonda StB12.3, en los carriles 3 y 4 la sonda Ox1.9 y en los carriles 5 y 6 la sonda OxE.20. Se cargaron 5  $\mu\text{l}$  de cada solución. Puede observarse que tienen una concentración similar en los tres casos y de intensidad parecida a la banda de 2,02 Kb del marcador  $\lambda$ -HindIII que tiene 42 ng, con este dato se calcula la concentración en la solución que sería aproximadamente 8ng/ $\mu\text{l}$ .

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

Una vez que se tiene la sonda purificada y se conoce su concentración se procede al marcaje. Se utilizaba el método de incorporación directa de dCTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] con cebadores al azar y el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa. En el método manual se pipeteaba en un tubo de 1,5 ml en el orden indicado, 4  $\mu$ l de agua destilada esteril, 5  $\mu$ l de tampón de marcaje, 2  $\mu$ l de mezcla de dinucleótidos (1.5mM dATP, 1.5mM dTTP, 1.5mM dGTP), 30  $\mu$ l de DNA (50 ng desnaturalizado 10 minutos a 98°C), 2  $\mu$ l de BSA (10 mg/ml), 5  $\mu$ l de CTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y 5 Unidades de DNA polimerasa. Se mezcla bien con la pipeta y se deja a 37°C en estufa entre 4 y 20 horas. Transcurrido el tiempo de marcaje se para la reacción con 50  $\mu$ l de tampón de parada (20  $\mu$ l de SSDNA 10 mg/ml, 20  $\mu$ l de EDTA 0,5 mM pH:8.0, 2  $\mu$ l de SDS 10% y 58  $\mu$ l de agua). Por este procedimiento se marca también, el marcador de peso molecular (generalmente el HindIII) que nos servirá de referencia, para calcular los tamaños de los fragmentos hibridados con la sonda marcada.

Para eliminar el isótopo radiactivo no incorporado, después de parar la reacción de marcaje, se pasa el producto de la reacción por una columna de exclusión molecular Sephadex G-50. Para la preparación del Sephadex se pesa 10 g de resina en polvo y se mezcla con 160 ml de agua destilada, se cambia el agua varias veces para quitar el Sephadex solubilizado y se termina equilibrando la resina con TE 10:1 pH:7,6 y autoclavando durante 20 minutos a 120°C y 1 Kg/cm<sup>2</sup>. Se conserva a temperatura ambiente hasta el momento de usarla. La resina se carga en jeringas de insulina tapadas con fibra de vidrio que se colocan en unos tubos de 10 ml y se centrifugan a 1000 rpm 30 segundos 2-3 veces para quitar parte del tampón TE y compactar la resina.

Cuando la columna está llena y compactada se cambia de tubo y se pipetea 100  $\mu$ l de la reacción de marcaje, se centrifuga 10 minutos a 3000 rpm y las columnas se tiran inmediatamente en un contenedor de radioactividad. La sonda marcada se recoge en el

eluido. Para calcular la radioactividad incorporada se pipetea 1  $\mu$ l de la reacción antes de pasarla por la columna y 1  $\mu$ l del eluido sobre 2 filtros whatman respectivamente. Se mide la radiactividad en un contador B y se determina el % de incorporación.

La actividad específica (AS) de la sonda marcada se calcula:

$$AS \text{ (dpm}/\mu\text{g)} : \frac{\mu\text{Ci} * (2,2 * 10^6) * \% \text{ incorporación} * (10^3)}{D_i + [(1,3 * 10^3) * \% \text{ incorporación} * \mu\text{Ci/S}]}$$

Dividiendo la radiactividad incorporada (medida en dpm o uCi) por la cantidad total de ADN (sonda inicial  $D_i$  + sonda sintetizada por la Klenow) medida en  $\mu$ g, la cantidad sintetizada de ADN es igual a  $(50 \text{ uCi} * 13,2 * \% \text{ de incorporación} / 3000)$ . La radiactividad incorporada es igual a  $50 \mu\text{Ci} * 2,2 * 10^4 * \% \text{ de incorporación}$ . En los marcajes se obtenía una incorporación del 60-80% y una actividad específica del orden de  $10^8$ - $10^9$  dpm/ $\mu$ g.

Se utilizó también un sistema de marcaje comercial "Rediprime DNA labelling system" de la casa Amersham que simplificaba el marcaje. Con este protocolo 30 ng de la sonda se diluye hasta 45  $\mu$ l con agua destilada esteril, se desnaturaliza 10 minutos a 98°C, se centrifuga para recoger las condensaciones del tapón y se añade a la mezcla de marcaje comercial, se añade 5  $\mu$ l de  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ), se mezcla bien con la pipeta y se incuba de 10 minutos a 1 hora a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se para la reacción añadiendo 5  $\mu$ l de 0.2M de EDTA pH:8.0.

### 5.3 Digestión del ADN.

Las endonucleasas de restricción EcoRI (G↓AATTC), HindIII



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

(A↓AGCTT), EagI (C↓GGCCG) y SacII (CCGC↓GG) son las más utilizadas en el diagnóstico por "Southern" del síndrome del X frágil. EagI y SacII son sensibles a metilación y se usan en doble digestión junto con EcoRI o HindIII para conocer el estado de metilación de las islas CpG que se encuentran en la zona reguladora del gen FMR-1 (locus FRAXA) y cercana a la zona de repeticiones de tripletes del locus FRAXE. Las enzimas elegidas para la mayoría de las digestiones fueron EcoRI y EagI, de las marcas comerciales Promega y Biolabs respectivamente. En algunos pocos casos se realizó una digestión simple con EcoRI y en otros doble digestión con HindIII y SacII.

Debido a que los loci estudiados son de copia única en el genoma humano, se digesrían 10 µg de ADN, para que la señal obtenida tras la hibridación tuviera una intensidad adecuada. En un tubo de 1,5 ml se pipetea la muestra de ADN, 6 µl de tampón del enzima o de un tampón compatible cuando es doble digestión, 2-5 unidades/µg de ADN del/los enzima de restricción y TE 10:1 pH:8.0 hasta completar un volumen de 60 µl. Se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 20 horas.

### *5.4 Electroforesis y tratamiento del gel.*

Después de la digestión del ADN se procede a separar los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa Seakem GTG al 0.8%, en tampón TBE 1x. Las muestras se cargan en líquido con un colorante como el azul de bromofenol o en seco añadiendo al tampón de carga agarosa de bajo punto de fusión y dejándola enfriar unos minutos en el frigorífico para que se cuaje en los pocillos. El colorante permite controlar la velocidad a la que se mueven los fragmentos dentro de la agarosa. En el primer pocillo se carga un marcador de fragmentos de tamaños conocidos que sirva de referencia.

La electroforesis se realiza en tampón TBE 1x a 35-40

voltios y el azul de bromofenol se deja correr unos 20 cm. En algunos casos se realizaban electroforesis más cortas para poder ver mejor los fragmentos expandidos de mayor tamaño que podían en algunos casos aparecer como un borrón difuso. Terminada la electroforesis se tiñe el gel con bromuro de etidio y se expone a la luz ultravioleta para comprobar que los ADN están digeridos. La figura 3 muestra una doble digestión de diferentes muestras de ADN, con  $\lambda$ -HindIII como marcador de peso molecular.

### 5.5 *Transferencia y fijación del ADN.*

Para realizar la transferencia del ADN desde gel de agarosa a la membrana de nylon se procede a la desnaturalización y posterior neutralización del gel. Se realizan 2 baños desnaturalizantes de 20 minutos en una solución de 0.5 M NaOH y 1.5M ClNa pH:13.5 con agitación suave. Después de lavar el gel con agua destilada se neutraliza con 2 baños de solución neutralizante (0.5M Tris-ClH y 1.5M ClNa pH:7.5) durante 20 minutos cada uno con agitación suave.

Para la transferencia el método más utilizado fué el de transferencia por vacío en un aparato comercial de la casa Appligene. El tiempo de transferencia era de 1-2 horas y la eficiencia de 70-80% por lo que aventajaba en rapidez y rendimiento a la transferencia por capilaridad. El protocolo era el siguiente: se corta la membrana un poco mayor que el gel, 0.5 cm por cada lado y un papel de filtro Watman de las mismas dimensiones. Se humedecen en una batea con 2x SSC durante 2 minutos y se colocan sobre la capa porosa del aparato de transferencia. Encima se pone un plástico con una apertura para colocar el gel cuyos bordes deben quedar sobre el plástico. El gel se baña con solución de transferencia SSC 20x y se conecta a la bomba de vacío con una fuerza de 50-60 mbar. Transcurrido el tiempo indicado se desmonta el sistema y la membrana se seca 10 minutos a 80°C. Para conocer la eficiencia de la

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

transferencia, el gel se tiñe 20 minutos con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y se observa con luz ultravioleta el ADN no transferido.

La fijación del ADN a la membrana se puede hacer por calor, manteniendo la membrana durante 2 h a  $80^{\circ}\text{C}$ , o con radiación ultravioleta. En la mayoría de los casos se hacía con un aparato comercial "Ultraviolet crosslinker" de la casa Amersham, con lo que la fijación se realiza en unos segundos con una radiación de  $70 \text{ mJ/cm}^2$ . Después de fijar el ADN, la membrana se puede guardar a temperatura ambiente, entre dos hojas de papel de filtro, hasta que se realice la hibridación.

### 5.6 Hibridación con la sonda marcada con dCTP [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ].

Una vez que se tiene la membrana con el ADN fijado se procede a la hibridación con la sonda marcada. La temperatura de hibridación depende del tampón de hibridación y de la sonda. En la mayoría de los casos el tampón de hibridación tenía 40% de formamida por lo que la temperatura de hibridación era de  $42^{\circ}\text{C}$ . Antes de la hibridación la membrana se humedece en  $2\times \text{SSC}$  y se prehibrida en un tampón similar al de hibridación durante 4 h. En otros caso la hibridación se hacía con 50% de polietilenglicol por lo que la prehibridación y la hibridación se hacían a  $60^{\circ}\text{C}$ . En ambos casos la sonda se desnaturaliza antes de añadirla a la solución de hibridación calentando a  $98^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y el tiempo de hibridación era de 16-24 h.

En algunos casos se usó un tampón de hibridación comercial "Rapid-hibrid buffer" de la casa Amersham, que tiene como características reducir el tiempo de prehibridación a 15 minutos, el de hibridación a una hora, no hace falta purificar la sonda con cromatografía después de el marcaje, y la cantidad de sonda empleada es de 2 ng/ml de volumen del tampón. Con lo que se consigue un ahorro de tiempo considerable, que permite realizar

un protocolo entero en tres días ( primer día digestión, segundo día electroforesis y marcaje, tercer día tranferencia e hibridación).

Después de hibridar la membrana se quita el tampón de hibridación y se lava dos veces con una solución SSC 1x, SDS 0.1% a temperatura ambiente 15 minutos cada uno, dos veces más con una solución SSC 0.1x, SDS 0.1% a 60°C durante 30 minutos. En algunos casos se realizaba otro lavado a 65°C durante 15 minutos con la solución utilizada en el sgundo lavado. La membrana se escurre y se mete en una bolsa de plástico que se sella por calor.

### 5.7 Autorradiografía.

La membrana se coloca en un "cassette" de radiografía entre 2 placas radiográficas de alta sensibilidad (Konica o Kodak). El casset se guarda a - 20°C y la primera placa se revela a las 72 horas. Dependiendo de la intensidad de las bandas la segunda placa se revela entre 3 y 8 días más tarde. En la figura 17 se esquematiza la técnica de "Southern-blot" indicando cada paso.

## 6. TÉCNICA DE PCR PARA EL ESTUDIO DE LOS LOCI FRAXA, DXS548 Y FRAXE.

Con la técnica de amplificación de un fragmento de ADN usando una polimerasa termoestable se consigue conocer los tamaños exactos de los polimorfismos estudiados y por tanto conocer el rango en el que se encuentran los alelos de los loci FRAXA y FRAXE, los alelos normales y premutados se amplifican bien por lo que puede medirse el tamaño. El locus DXS548 un microsatelite polimórfico, ligado a fraxa, se usará como prueba complementaria en el diagnóstico de síndrome X frágil.

### 6.1 Selección de los cebadores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

La realización de esta técnica requiere el diseño de dos oligonucleótidos complementarios a una secuencia adyacente a la zona del ADN que se quiere estudiar. Cuando la zona a amplificar está secuenciada, se elige englobando la zona y en la dirección 5' a 3', dos cebadores de 24 a 30 nucleótidos de los indicados en la secuencia, siempre en esa dirección para las dos hebras de ADN, teniendo en cuenta las siguientes reglas, que la proporción de G+C no sea inferior al 60 % para que la temperatura de hibridación o anilamiento no sea muy baja, que los extremos de cada cebador y de los cebadores entre si no sean complementarios y que en la secuencia no se formen palíndromes (por ejemplo CCTTAAGG) que puedan hibridar dentro del cebador, disminuyendo la eficacia de unión a la secuencia complementaria del ADN genómico.

Para el locus FRAXA se eligieron tres pares de cebadores para amplificar zonas cercanas a la región 5' del gen FMR-1 englobando las repeticiones CGG o adyacentes a la secuencia repetitiva. Cebador F1 5' GCT CAG CTC CGT TTC AC TTC CGGT 3', cebador F2 5' AGG GGG CGT GCG GCA GCG CGG CGG CCG3', cebador R1 5' AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA 3', cebador R2 5' CCG CCG CCG CGC TGC CGC ACG CCC CCT 3' y cebador R3 5' TTG TAG AAA GCG CCA TTG GAG CCC 3', tomados de la secuencia publicada por Fu y col., 1991; el par F1-R1 amplifica un fragmento de 309 pb en el alelo más frecuente de 29 repeticiones CGG, el par F2-R1 amplifica un fragmento de 205 pb en el alelo de 29 CGG, con el par F1-R3 se consigue un tamaño de 327 pb para un alelo de 29 CGG, con el par F1-R2 se amplifica un fragmento de 133 pb que será el mismo en todos los alelos porque amplifica una zona adyacente a las repeticiones CGG.

Se estudió el polimorfismo de repeticiones CA/TG del locus DXS548, ligado al locus FRAXA y situado a 150 Kb hacia el centrómero. Los cebadores se tomaron de la publicación de Verkerk y col., 1991. El par de cebadores engloba las repeticiones CA/TG, F 5' AGA GCT TCA CTA TGC AAT GGA ATC 3' y cebador R 5'

GAT CAT TAG AGT CAC CTG TGG TGC 3', el fragmento amplificado puede variar en tamaño desde 192pb a 206 pb, diferenciándose los alelos en sólo dos pares de bases.

Para amplificar la zona de repeticiones de tripletes que aparecen en los loci FRAXE se usó un par de cebadores Fxe-Rxe, que permiten amplificar cada locus respectivo. El primer par se tomo de la publicación de Knight y col., 1993. El fragmento amplificado varía dentro de la población, el más frecuente es de 327 pb para el alelo que tiene 12 repeticiones CCG/CGG. Fxe 5' GCG AGG AGG CGG CGG CAG TGG CAC TGG G 3' y Rxe 5' CCT GTG AGT GTG TAA GTG TGT GAT GCT GCC G 3'.

## 6.2 Condiciones de la reacción

Las condiciones de la reacción de la polimerasa dependen de la zona a amplificar. En el caso de la zona de las repeticiones (CGG/CCG) del locus FRAXA la reacción se realizaba en un volumen de 10 µl con 200 ng de ADN genómico, 10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, 200 µM dTTP, 200 µM dCTP, 200 µM 7-deaza-dGTP, 5 pmol de cada cebador, 10% DMSO, 1 µCi de α-<sup>32</sup>P dCTP y 0.5 U de Taq polimerasa. Cuando se necesitaba visualizar el producto de la PCR con bromuro de etidio se utilizaba la Pfu ADN polimerasa (Stratagene) que amplifica más eficientemente y no necesita la sustitución del 100% del dGTP por 7-deaza-dGTP. Para el locus FRAXE, al ser repeticiones de tripletes CCG/CCG, las condiciones de la reacción fueron iguales a las del locus FRAXA usando los cebadores específicos.

La amplificación del locus DXS548 se realizó en 10 µl con 200-500 ng de ADN genómico, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% de gelatina, 5 pmol de cada cebador, 0,25 mM de dNTPs, 1 µCi de <sup>35</sup>S- dATP y 0,25 U de Taq polimerasa.

Para la amplificación simultánea de los loci FRAXA y DXS548

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

se emplearon las condiciones indicadas para el locus FRAXA al principio, pero incluyendo los dos pares de cebadores específicos de cada loci.

### *6.3 Programa del termociclador.*

Se utilizó el termociclador "ADN termal cycler 480" de la casa Perkin-Elmer. Para escoger el programa adecuado hay que tener en cuenta fundamentalmente la  $T_m$  de los cebadores y la longitud del fragmento a amplificar. En general los programas constan de una etapa inicial de desnaturalización seguida de 30 a 50 ciclos y una etapa final de extensión. Cada ciclo consta a su vez de tres fases, desnaturalización, pegado de los cebadores o alineamiento y extensión.

La temperatura más crítica es la de alineamiento que hay que ajustar conociendo la  $T_m$  de los cebadores y que en general es 4 grados por debajo de la  $T_m$ . En la amplificación del locus FRAXA la temperatura del alineamiento fue de 55°C para la zona de los CGG, para la zona adyacente a las repeticiones la temperatura que se usó fue 60°C. Para el Locus DXS548 fue de 57°C y para el locus FRAXE de 65°C.

### *6.4 Separación de los fragmentos amplificados.*

Cuando la diferencia entre los fragmentos amplificados era pequeña (2-30 pb), se utilizaba siempre un gel de acrilamida al 6%. Si los alelos se diferenciaban en más de 30 pb se separaban en gel de agarosa al 2%. En cualquier caso siempre que se quería calcular con exactitud el tamaño de los distintos fragmentos se separaban en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% con un marcador de secuenciación.

#### *6.4.1 Electroforesis en gel de agarosa.*

Se utilizó este tipo de gel en aquellas reacciones en las que no se sustituyó el dGTP por 7-deaza dGTP por lo que se podía teñir con una solución acuosa de Bromuro de etidio y verlo a la luz ultravioleta, en las amplificaciones en las que los tamaños de los alelos eran muy diferentes, o cuando se hacía una transferencia de los fragmentos amplificados a una membrana de nylon para hibridar con un oligonucleótido marcado con radiactividad.

Se utilizaba agarosa Seakem GTG a concentraciones del 1% al 3% dependiendo del tamaño de los alelos a separar. Se empleaba un marcador de tamaños como referencia para conocer aproximadamente el tamaño de la muestra. En algunos casos la PCR se hacía con radiactividad y el marcador de tamaños se marcaba en el extremo 5' con el isótopo dATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] y con la T<sub>4</sub> Polinucleótido Kinasa.

### 6.4.2. *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Para calcular el tamaño exacto de cada fragmento amplificado se hacía una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante corriendo en paralelo un control de secuenciación o a un marcador de tamaños de referencia adecuados como el PBR322 digerido con MspI. Se utilizaba acrilamida/bisacrilamida 19:1 al 6%, 8M de Urea y 1X TBE en un aparato comercial "Sequi-gen, sequencing cell" de Biorad, con cristales de 40 cm x 21 cm. Los separadores utilizados eran de 0.4 mm con peines de dientes de tiburón para 24 muestras.

La electroforesis se realizaba a 1500-1700 voltios con 50 W de potencia, durante 1 hora para fragmentos de tamaño inferior a 150 pb; 2 horas para fragmentos hasta 350 pb y de 3 horas cuando los fragmentos eran de mayor tamaño. Transcurrido el tiempo de electroforesis se desensambla el aparato, el gel se pega a un papel de filtro "Whatman 3MM" del tamaño del gel, se



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

cubre con un plástico transparente fino y se seca dos horas a 80°C con vacío.

### *6.5 Autorradiografía.*

En los casos en que las muestras de la electroforesis estaban marcadas con radiactividad, las bandas se visualizaban por autorradiografía. El gel perfectamente seco se coloca dentro de un "cassette" para radiografías junto a una placa de alta sensibilidad (Konica o Kodak). La placa se revelaba manualmente o con un aparato automático. Con el sistema manual la placa se pone en líquido de revelado 1 minuto, reacción de paro en ácido acético 1% durante 2 minutos, baño de fijación durante dos minutos y lavado con agua.

### **7. ESTUDIO DEL DESPLAZAMIENTO DE LOS CEBADORES POR LA TÉCNICA DE "DOT-BLOT".**

Para saber si la falta de amplificación en la mayoría de los afectos del síndrome del X frágil se debía al gran tamaño del alelo o a una mala unión de los cebadores, se estudió el desplazamiento de los cebadores marcados radioactivamente por marcadores fríos con la técnica de dot blot. Los productos de la PCR del locus FRAXA se pipeteaban paralelamente sobre dos membranas de "Hybond" N<sup>+</sup> colocadas en un aparato para dot blot. Después de 3 h y 1/2 de prehibridación a 50 °C, se hacía una prehibridación adicional de 6 h en la que a una de las dos membranas se le añadía 200 pmoles del cebador frío. A continuación se hibridaban ambas membranas durante 14 h en presencia de 20 pmoles del cebador marcado con dCTP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] y después de varios lavados se ponían en un cassette con una placa radiográfica para su impresión.

**8. SECUENCIACIÓN DE DISTINTAS ZONAS DEL LOCUS FRAXA.**

Variaciones en la secuencia de la zona 5' del gen FMR-1, tanto en la zona adyacente a los CGG como la correspondiente a las repeticiones pueden ayudar a establecer posibles mecanismos de amplificación de los triplete. Se han secuenciado alelos normales y premutados. Los alelos con un número de triplete superior a 110 no se han secuenciado al no amplificarse por PCR.

**8.1 Secuenciación de la zona de triplete de ADN genómico.**

Se realizaba una primera PCR, para amplificar el fragmento que se iba a secuenciar posteriormente, y así obtener mayor cantidad de templado. La amplificación del locus FRAXA se hacía en un volumen de 25  $\mu$ l, con 10 pmoles de cada cebador F1 y R3, 100 ng de ADN, 1,5 mM de  $Cl_2Mg$ , 1x tampón de reacción, 200  $\mu$ M de desoxinucleótidos trifosfato excepto dGTP que se sustituía por 7-deaza dGTP, 10% de DMSO y 0,5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer o Promega). El programa del termociclador consistía en: desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. El producto de la reacción se purificaba en minicolumnas de cromatografía "Wizard PCR preps" de Promega para eliminar la mezcla de reacción de la PCR y conservar el ADN amplificado.

La concentración de ADN en el eluido se determinaba midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm en microcubetas de cuarzo. La concentración de ADN también se determinaba comparando los productos de la PCR con una cantidad conocida de un marcador de peso molecular, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. En estos casos se sustituía sólo el 25% del dGTP por 7-deaza dGTP, lo que permite que el bromuro de etidio se intercale en la doble hebra de ADN y visualizarse en un transiluminador de luz ultravioleta. Medir la concentración de

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

ADN con exactitud es necesario para poder calcular la cantidad de ADN en la reacción de secuenciación, se ponía de 4-100 fmol.

Para mejorar la primera reacción de PCR se utilizó, en algunos casos, la polimerasa Pfu de la casa Stratagene que tiene menor rango de error que la Taq polimerasa y mayor eficiencia. Para conseguir unas bandas de secuenciación más nítidas se separaban las dos hebras de ADN por el método de la biotina/estreptavidina. Se empleaban 10 pmol de los siguientes cebadores: Pseq-F 5' CGC TAA GCT TGG AAC AGC GTT GAT CAC GTG ACG 3' marcado con Biotina en el extremo 5' y Pseq-R 5'CGG CGA ATT CTT GTA GAA AGC GCC ATT GGA GCC3' en un volumen de 20 µl con 1x del tampón de reacción, 200 µM de dNTPs excepto del dGTP que se sustituía en un 25% por 7-deaza dGTP, 100 ng de ADN genómico, 15% de DMSO y 0,5 U de Pfu polimerasa.

El programa de amplificación consistía en 5 minutos a 98°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 98°C, 1 minuto a 65°C y 2 minutos a 73°C, con una extensión final de 7 minutos a 73°C. El producto de la reacción se cargaba en una electroforesis en agarosa al 1%, corriendo en paralelo un marcador de peso molecular como el "PCR marker" (Promega) o el plásmido PBR322 digerido con MpsI, el gel se teñía con una solución acuosa 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados se visualizaban por fluorescencia y las bandas correspondiente a los alelos que se habían amplificado se cortaban con un escalpelo y se purificaban según el protocolo del "Eluquick" (Quiagen) o del "Wizard PCR preps" (Promega).

La hebra marcada con la biotina, se separa de la otra hebra por medio de unas partículas magnéticas que llevan unidas estreptavidina (Boehringer-Mannheim). El producto de la reacción se incubaba en tampón TEN<sub>100</sub> a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lava dos veces con el mismo tampón. En cada paso las esferas sedimentan por la atracción de un metal magnético. Para

separar las dos cadenas del ADN se añade NaOH hasta una concentración final de 0,1 N, se incuba 2 minutos a 50°C, se deja precipitar las esferas y se toma el sobrenadante donde estará la cadena no marcada con biotina (en este caso la cadena sintetizada a partir del cebador Pseq-R) que se precipita con etanol, resuspendiéndola en 10 µl de agua destilada estéril. Esta cadena se secuencía por el método de terminación de la reacción con los didesoxinucleótidos con incorporación directa de un isótopo radiactivo dCTP [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] o marcando el primer F1 con dATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P].

### 8.1.1 *Marcaje del cebador con dATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P].*

Cuando se obtenía muy poca cantidad de ADN para la secuenciación (40-100 fmoles), se utilizaba el marcaje del cebador con la T<sub>4</sub> polinucleótido Kinasa que incorpora el grupo fosfato terminal del dATP al extremo 5' del cebador. Se mezcla en un tubo de 0,5 ml, 20 pmoles de cebador, 1x del tampón de la enzima, 25 pmoles del isótopo dATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] (4500 Ci/µmol), H<sub>2</sub>O estéril hasta 19 µl y 10 U de la enzima. Se incuba 30 minutos a 37°C y se detiene la reacción incubando 2 minutos a 90°C. Se puede guardar congelado a -20°C durante un mes y no es necesario purificar el cebador después de la reacción de marcaje.

### 8.1.2 *Reacción de secuenciación.*

Se utilizó el método de terminación de la reacción con los didesoxinucleótidos, modificado para productos de PCR de Promega (fmol ADN sequencing kit). El templado era ADN de doble cadena o de cadena simple (separadas con las esferas magnéticas). Para cada muestra se marcan 4 tubos de 0.5 ml con las letras G, A, T, C, donde se añaden 4 µl de la mezcla de terminación correspondiente, compuesta por 150 µM de cada dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza dGTP y 1,5 µM del didesoxinucleótido adecuado, los tubos se guardan a 4°C hasta que se prepare la mezcla de reacción.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

En un tubo se pipetea: 40-100 fmoles de ADN, 1x del tampón de la enzima, 2 pmoles del cebador marcado (cuando se disponía de 200-500 fmoles de ADN se realizaba la secuenciación por el método de incorporación directa con 5  $\mu$ Ci del isótopo dCTP [ $\alpha$ - $^{32}$ P], sin marcar el cebador), 5% DMSO, 5 U de Taq polimerasa grado secuenciación.

Se mezcla con un pulso en la microcentrífuga y se reparte 4  $\mu$ l en los tubos previamente marcados G,A,T,C. Se añade una gota de aceite mineral y se coloca en el termociclador programado con anterioridad y precalentado a la temperatura de desnaturalización. El programa más habitual era el siguiente: 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72 °C, terminando con una elongación de 10 minutos a 72°C. En algunos casos se usó el protocolo de la termosecuensasa de Amersham, que mejora la eficiencia de la polimerasa al incorporar en la reacción una pirofosfatasa termorresistente que impide la acumulación de pirofosfato.

Para conseguir que la polimerasa no se parara en la reacción de secuenciación, por encontrarse estructuras secundarias formadas en la secuencia repetitiva (CGG)<sub>12-60</sub>, se añadió en las reacciones la proteína que estabiliza ADN de cadena simple (proteína SSB, Promega) a una concentración de 1.5  $\mu$ g de proteína SSB/ $\mu$ g de molde, con una etapa final de desproteínización incubando a 65°C durante 20 minutos con 0.1  $\mu$ g de proteinasa-K, con lo que se mejoraba la lectura de la secuencia al desaparecer los errores de parada de la polimerasa que eran frecuentes en las reacciones.

Una vez terminada la reacción, se añade 3  $\mu$ l de tampón de carga de secuenciación (95% formamida, 20mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% Xylene cianol) y las muestras se cargan en una electroforesis en gel de poliacrilamida (19:1), 6% 8M de urea. En ocasiones se realizaba el gel con 40% de formamida para evitar

la compresión en las bandas. Se conecta el aparato de electroforesis vertical de secuenciación (Bio-rad) a una fuente de corriente con una potencia de 50W, durante 3 horas a una temperatura de 50 °C. Tras la electroforesis se fija el gel en una solución de 10% metanol/acético durante 20 minutos, se seca en secador de vacío a 80°C durante 1 hora y se expone a una placa autorradiográfica durante 15-48 horas.

### 8.2 *Secuenciación de los tripletes de ADNc de rata.*

El ADNc de rata se obtuvo por transcripción inversa del ARN total de distintos tejidos del animal por un compañero de nuestro laboratorio, se realizó una reacción de amplificación del locus FRAXA por RT-PCR con el par de cebadores F1-R1 antes descrito, por el protocolo anterior con Polimerasa Pfu y un 25% de 7-deaza dGTP sustituyendo al nucleótido dGTP. Se cargo en una electroforesis en agarosa al 1% y tras cortar la banda obtenida (250 pb) del gel, se purifico con el protocolo ya indicado (Wizard PCR preps. Promega).

100 fmol del producto se secuenciaron con los cebadores F1 y R1 marcados en el extremo 5' con dATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] por el protocolo de la polimerasa termosecuencia y la enzima pirofosfatasa. Se cargó 4µl de la reacción en gel de poliacrilamida al 6%, desnaturizante con 40% de formamida. Las condiciones de la electroforesis descritas anteriormente.

### 8.3 *Secuenciación de la zona adyacente a los tripletes.*

La zona adyacente se amplificó por PCR con el par de cebadores F1-R2, purificándose el producto con minicolumnas de cromatografía Quiaquick (Quiagen), se calculó la concentración midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a  $\lambda = 260$  nm, con una dilución de 5 µl en 150 µl de agua destilada, con microcubetas de cuarzo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

Se secuenció 100 fmol del fragmento amplificado (133 pb) con el cebador R2 marcado en el extremo 5' con dATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P], y el enzima Taq polimerasa grado secuenciación (fmol. Promega). Los fragmentos se separaron en una electroforesis en poliacrilamida (19:1) desnaturalizante, con las condiciones ya descritas.

## RESULTADOS

En el presente trabajo se ha estudiado el síndrome X frágil, con técnicas de biología molecular, en 357 muestras enviadas por pediatras, neurólogos infantiles, psiquiatras y citogenetistas de diferentes provincias de Andalucía. Se ha analizado el tamaño de las repeticiones CGG/CCG en los alelos normales, premutados y mutados, así como el estado de metilación de la isla CpG reguladora del gen FMR-1 (locus FRAXA). También se ha analizado la zona polimórfica de repeticiones CA/TG del locus DXS548 ligada al gen FMR-1, situada 150 Kb hacia el centrómero.

En una serie de muestras que resultaron normales, para el locus FRAXA, pero que presentaban fragilidad citogenética o retraso mental ligado al cromosoma X (individuos con antecedentes familiares maternos de retraso mental), se ha analizado la expansión de la zona de tripletes del locus FRAXE, otro polimorfismo que sufre inestabilidad y determina retraso mental leve con expresión de una fragilidad cromosómica rara en Xq28, este locus se encuentra muy cercano al locus FRAXA, localizado 0.5 Mb hacia el telómero (Albright y col., 1994).

Para establecer posibles mecanismos de la inestabilidad de los tripletes, se ha secuenciado la zona polimórfica del locus FRAXA y la zona adyacente a las repeticiones.



## **RESULTADOS**

---

### **A) DETECCIÓN DE SUJETOS AFECTOS Y PORTADORES DEL SÍNDROME X FRÁGIL CON LA TÉCNICA DE "SOUTHERN BLOT".**

Para la determinación genotípica del locus FRAXA, en individuos afectados de retraso mental o sus familiares, se han analizado los polimorfismos de restricción del ADN genómico, por la técnica de "Southern-blot", hibridando con sondas intragénicas del FMR-1. Este gen está implicado en la aparición del retraso mental ligado a la fragilidad FRAXA, localizada en la banda Xq27.3. Esta técnica permite distinguir con claridad los alelos de tamaño normal y los alelos expandidos.

El análisis se puede realizar empleando digestión simple (con una enzima de restricción) o digestión doble (con dos enzimas) una de ellas sensible a metilación. Para este estudio se emplearon las enzimas de restricción EcoRI, EagI, HindIII y SacII. La figura 18 muestra un esquema de la zona objeto de estudio indicando las zona de expansión de los triplete y la isla CpG reguladora del gen FMR-1, situando los puntos de corte de las enzimas utilizadas y la zona de hibridación de las sondas StB12.3 y Ox1.9 usadas en este estudio.

#### **1. DIGESTIÓN CON EcoRI.**

Para el análisis general de las muestras se utilizó la endonucleasa de restricción EcoRI, que reconoce una diana ampliamente distribuida en el ADN genómico cuya secuencia es GAATTC/GAATTC. EcoRI corta la doble cadena de ADN y da extremos cohesivos. El locus FRAXA tiene dos centros de restricción para EcoRI que engloban las repeticiones CGG/CCG y genera un fragmento de un tamaño de 5,2 kb en muestras normales.

En la figura 19 se muestran dos digestiones con EcoRI. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa y se sometieron a electroforesis horizontal durante 10 h (fig. 19 A) o 20 h (fig.

**LOCUS FRAXA, ZONA Xq27.3**

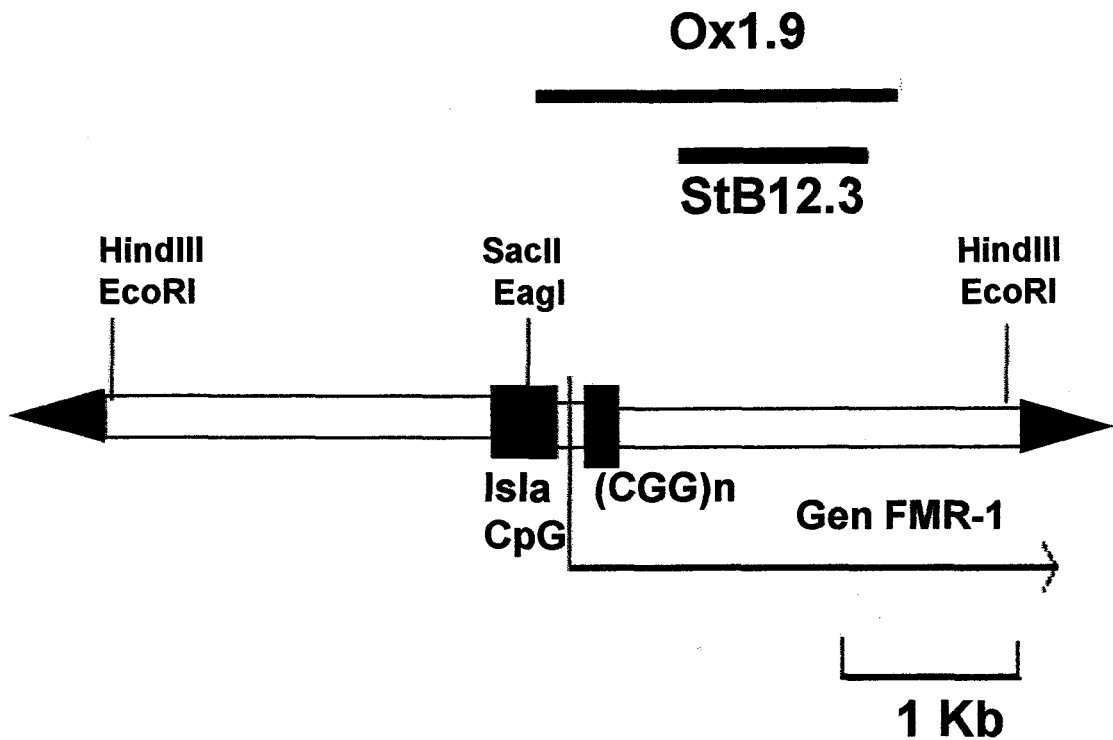


Figura 18. Esquema del locus FRAXA situado en Xq27.3. Se indican la zona de tripletes (CGG/CCG)<sub>n</sub>, la isla CpG, las dianas de restricción para las endonucleasas HindIII, EcoRI, SacII y EagI, y las zonas de hibridación de las sondas StB12.3 y OX1.9.

## RESULTADOS

---

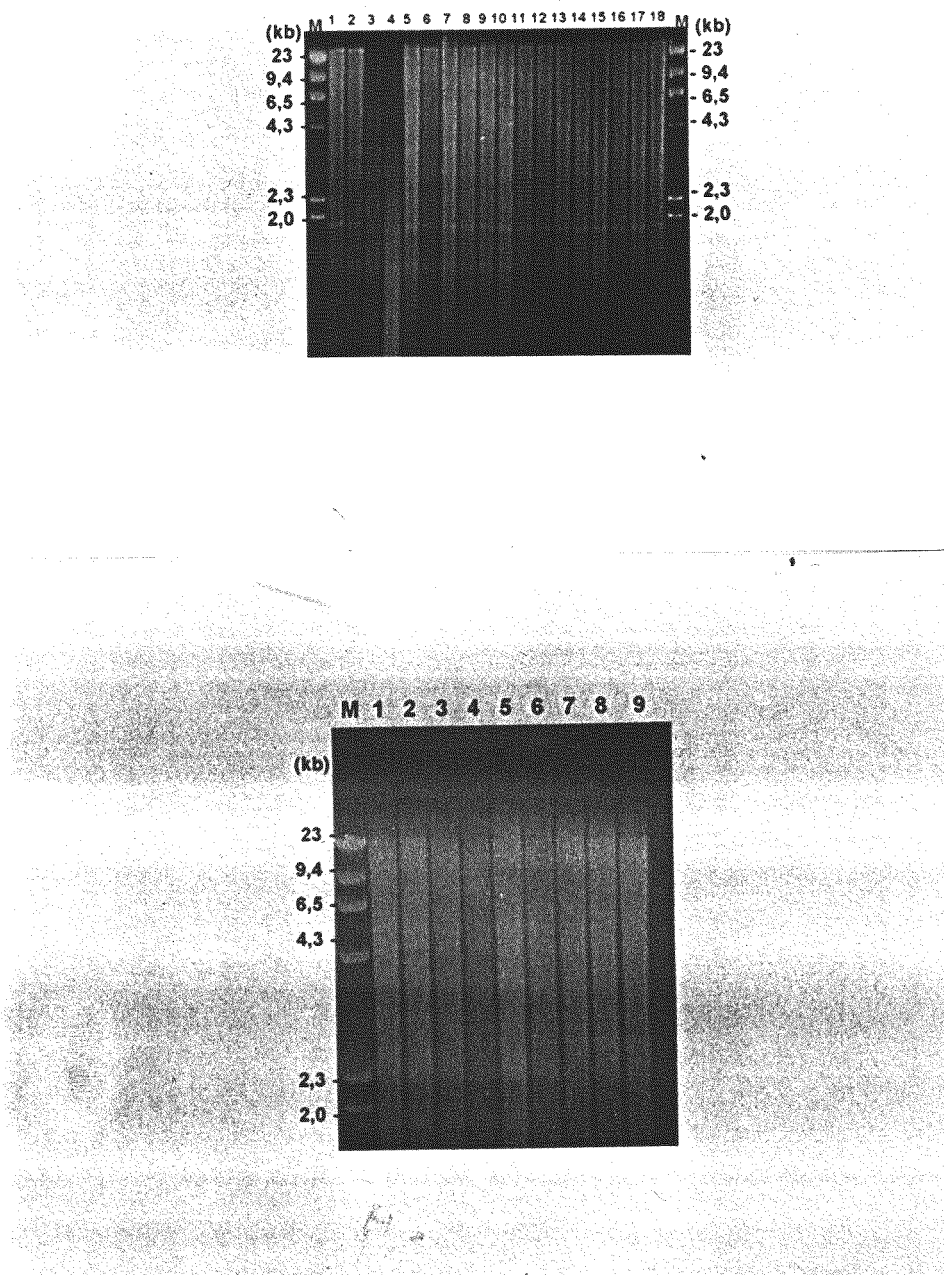


Figura 19. Digestión de ADN genómico con EcoRI y electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio. A: electroforesis corta de 10 h a 35 V. B: electroforesis de 20 h a 35 V. En ambas electroforesis se utilizó 1  $\mu$ g del marcador de tamaños  $\lambda$ -HindIII.

19 B). Las electroforesis cortas se utilizan para visualizar mejor las bandas difusas en los individuos afectados. En el primer pocillo se carga un marcador que sirve de referencia para determinar los tamaños de las bandas obtenidas después de la hibridación y que en nuestro ejemplo corresponde al  $\lambda$ -HindIII. Cuando la digestión es completa los fragmentos se distribuyen homogéneamente a lo largo del carril, por lo que la separación de los distintos tamaños será adecuada para la detección posterior en la hibridación.

### *1.1 Hibridación con la sonda StB12.3.*

En los estudios de "Southern" se ha utilizado principalmente la sonda StB12.3, con la que se detectan fragmentos de 5,2 Kb en los alelos normales (6-52 CGG/CCG) y de 5,3-5,6 kb en los alelos premutados ( $\approx$ 55-200 CGG/CCG). En los alelos con una expansión en el rango de mutación completa ( $>$ 200 CGG/CCG), el patrón es muy variable con bandas desde 5,7 Kb a 8 Kb que en muchos casos son difusas ("smear"). La figura 20 muestra un esquema de la zona indicando las dianas de las enzimas usadas y los patrones de restricción de individuos normales, portadores y afectados. El esquema es similar para la hibridación con la sonda Ox1.9.

En algunas muestras aparecen varios fragmentos de distinto tamaño, que corresponden a individuos mosaicos en los que hay variaciones del número de triplete desde el rango de premutación hasta la mutación completa. Las bandas obtenidas con la digestión simple e hibridación con la sonda StB12.3 nos indica el tamaño de los tripletes CGG/CCG del locus FRAXA, pero no se obtiene información acerca del estado de metilación de la isla CpG, reguladora de la expresión del gen FMR-1. En las mujeres normales las bandas suelen ser más intensas que en los varones, por la acumulación de fragmentos del mismo tamaño correspondientes a los dos cromosomas X.

**RESULTADOS**

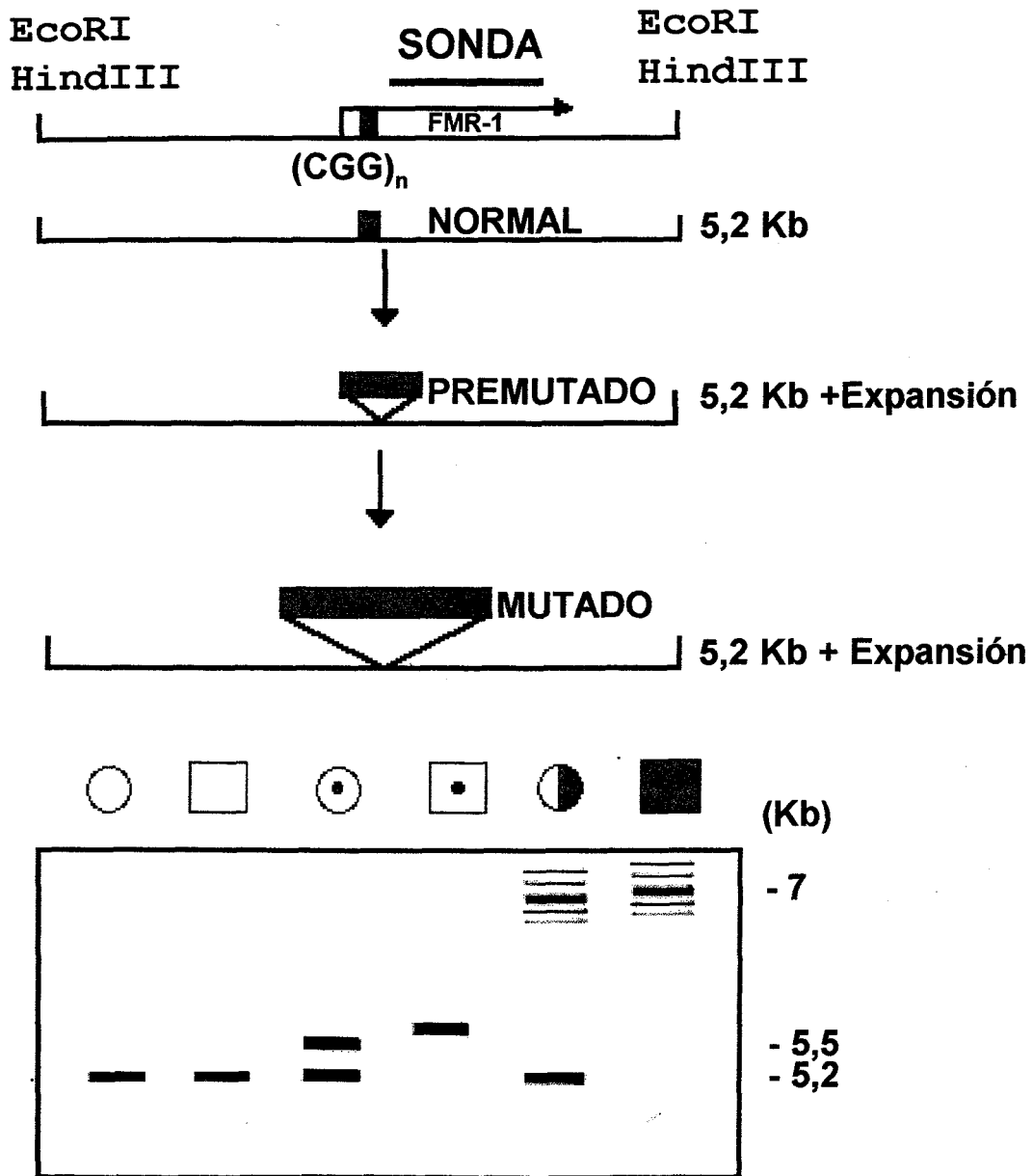


Figura 20. Esquema de la digestión con EcoRI de la zona FRAXA. Se indican los distintos patrones que pueden encontrarse. Muestras normales (vacío), premutadas (con un punto) y mutadas (relleno).

En la figura 21 se muestran dos ejemplos de los resultados obtenidos en la digestión simple, al hibridar con la sonda StB12.3 marcada radiactivamente. Se puede observar el patrón normal, con una única banda de 5,2 kb tanto en varones como en mujeres (carriles 1, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 de la figura 21A y carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la figura 21B). También se muestra el patrón encontrado en mujeres portadoras de un alelo premutado, con una banda en 5,2 Kb y otra de un tamaño superior (carriles 1, 2 y 3 de la fig. 21 B), y el patrón en individuos afectados con bandas superiores a 5,8 Kb (carriles 2 y 3 de la fig. 21 A).

### *1.2 Hibridación con la sonda Ox1.9*

El patrón de hibridación con la sonda Ox1.9 es similar al que se observa con la sonda StB12.3, cuando se utiliza el mismo enzima de restricción (Ver la figura 20 donde se indican los patrones más frecuentes). En la figura 22 se muestra un ejemplo de una hibridación con la sonda Ox1.9. Encontramos muestras normales de 5,2 Kb (carriles 1, 4, 6 y 9), muestras premutadas de 5,4 Kb (carriles 3, 7 y 8) y muestras con mutaciones completas de 6,5 y 6,2 Kb (carriles 2 y 5 respectivamente).

## **2. DIGESTIÓN DOBLE CON EcoRI Y EagI.**

En el estudio del síndrome X frágil, además de conocer el tamaño de la expansión de los tripletes CGG/CCG, es importante conocer el estado de metilación de la isla CpG, reguladora de la expresión del gen y que va a determinar en gran medida, si el gen se está transcribiendo. Para ello se utiliza una enzima de restricción sensible a la metilación de las citosinas, con una diana en la isla CpG próxima al gen FMR-1 (ver esquema de la fig. 18). En la mayoría de los casos se utilizó la enzima EagI, una endonucleasa con una diana de restricción CGGCGG/CCGCCG en la isla CpG, siempre usándola en una doble

## RESULTADOS

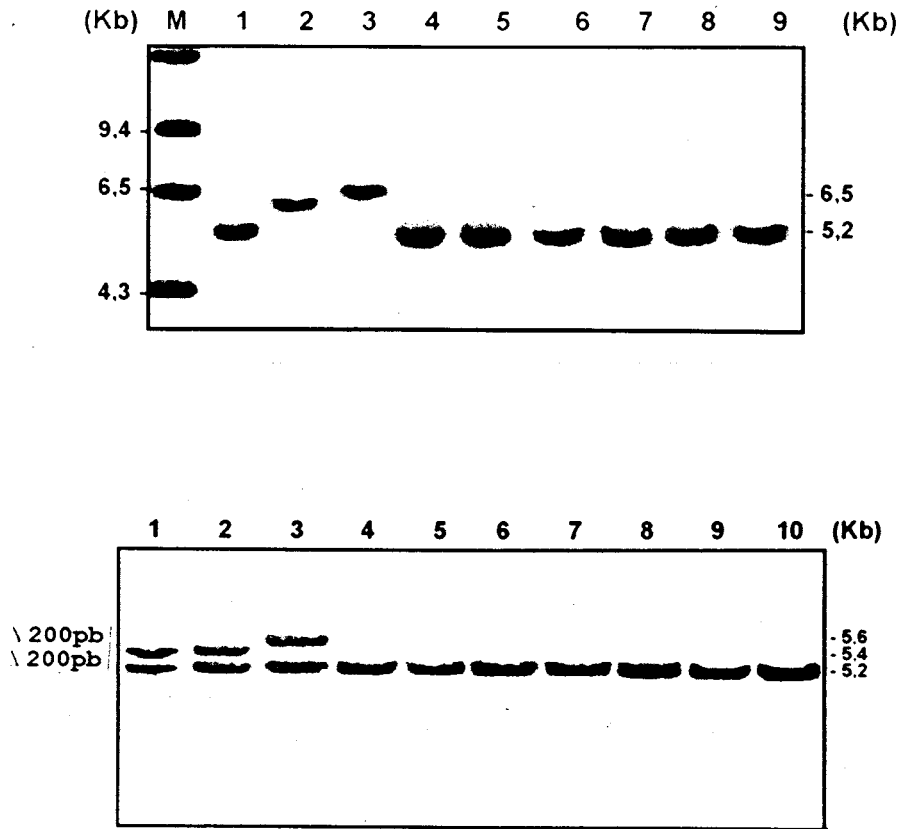


Figura 21. Autorradiografías de hibridaciones con la sonda StB12.3, en una digestión con EcoRI. Se observan muestras normales (5.2 Kb), muestras premutadas (ligeramente superior a 5.2 kb) y muestras mutadas (por encima de 5.8 Kb). En A se muestran los resultados de una electroforesis corta y en B de una electroforesis larga.

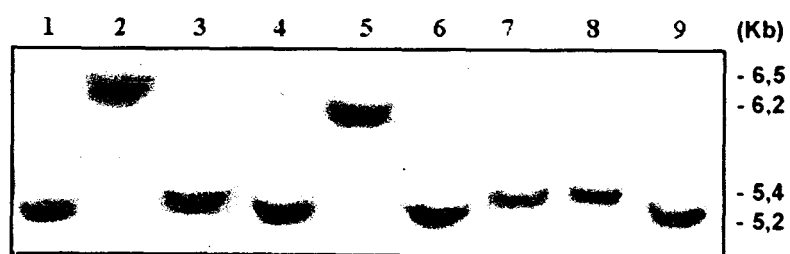


Figura 22. Autorradiografía de una digestión con EcoRI e hibridación con la sonda OX1.9 en una electroforesis de 20 h.



## RESULTADOS

---

digestión con la enzima EcoRI.

Con este protocolo de digestión y la posterior hibridación con la sonda adecuada, se detecta además del tamaño de las repeticiones CGG/CCG, el estado de metilación de la zona reguladora que nos indica si el alelo es activo o inactivo.

En la figura 23 se muestra un ejemplo de doble digestión con EcoRI y EagI. En los carriles primero y último se observa el marcador  $\lambda$ -HindIII que nos permite comparar el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la hibridación.

### *2.1 Hibridación con la sonda StB12.3.*

El patrón de restricción, utilizando doble digestión e hibridación con la sonda StB12.3, de individuos normales, portadores y afectados se muestra esquemáticamente en la figura 24. Puede observarse como en las mujeres normales aparecen dos bandas, una de 2,8 y otra de 5,2 correspondientes al cromosoma X activo e inactivo respectivamente. También puede apreciarse como las amplificaciones en el rango de mutación se encuentran metiladas.

En la figura 25 se muestran dos ejemplos de los resultados obtenidos en una doble digestión hibridando con la sonda StB12.3. A corresponde a una electroforesis de 20 horas. Los varones normales tienen una banda de 2,8 Kb (carriles 2 y 9) y las mujeres una de 2,8 Kb y otra de 5,2 Kb (carriles 1, 5 y 7).

También se puede observar un varón portador con una banda de 3 Kb (carril 6) y un varón con la mutación completa con un patrón mosaico de tamaño y metilación (carril 8). Por último se muestran dos mujeres portadoras de una premutación sin metilar (carriles 3 y 4) que tienen una banda de 3.2 Kb y otras dos de

2.8 Kb y 5.2 Kb respectivamente. Estas dos ultimas bandas corresponden al cromosoma normal, que en parte de sus células está metilado y en otra parte sin metilar.

En estas hibridaciones las señales en las mujeres son de menor intensidad debido a que la cantidad de ADN total se divide entre las dos bandas correspondientes al cromosoma X activo y al cromosoma X inactivo.

En B se muestran los resultados obtenidos realizando una electroforesis de 10 h. Se observan mujeres normales (carriles 1 y 9), varones normales (carriles 2, 4, 7 y 8), varones portadores (carriles 5 y 6) y un varón con la mutación completa (carril 3) que presenta un patrón mosaico de tamaño.

Como se ha indicado anteriormente las bandas correspondientes a mutaciones completas se visualizan mejor en electroforesis de 10 horas. La figura 26A muestra los resultados obtenidos en una electroforesis corta de una digestión doble EcoRI/EagI, en varones afectados (carriles 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 11) y mujeres portadoras (carriles 2, 8, 9 y 12), en el carril 13 se observa la banda correspondiente a un varón normal (2.8 Kb).

Entre la población estudiada se han encontrado dos mujeres portadoras de la mutación completa (>200 CGG/CCG) en las que el alelo estaba sin metilar, en una de ellas el número de tripletes era 235 y en la otra 260 aproximadamente (carriles 8 y 9 respectivamente de la fig. 26A). También se encontraron dos varones afectados que presentaban un patrón mosaico con bandas de diferentes tamaños entre las que se observaba una amplificación por encima de 300 repeticiones sin metilar (carriles 3 y 4 fig. 26A). Tamaños por encima de 400 repeticiones CGG/CCG se han encontrado siempre metilados (carriles 1, 5, 6, 7, 10 y 11 de la fig. 26A).

## RESULTADOS

---

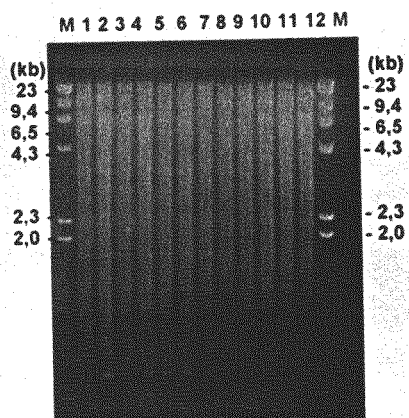


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio de una doble digestión con las enzimas EcoRI y EagI. La electroforesis corrió durante 10 h a 35 V. En el primer pocillo y en el último se cargó el marcador de tamaños  $\lambda$ -HindIII.

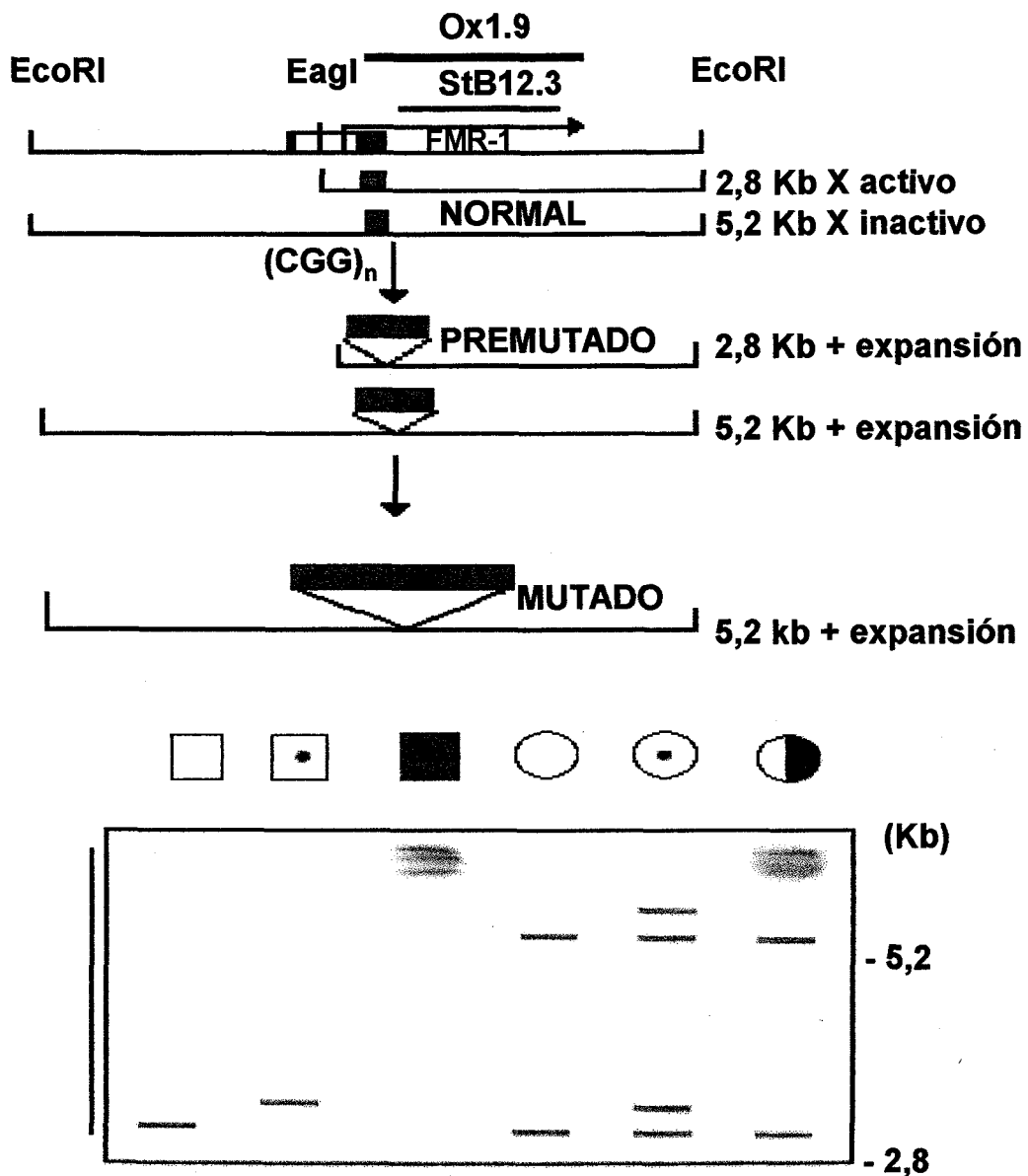


Figura 24. Esquema de la zona FRAXA con las dianas de las enzimas EcoRI y EagI. Se indican los patrones que pueden obtenerse tras la hibridación con las sondas StB12.3 u Ox1.9 en muestras de varones y mujeres normales (vacío), premutados (punto) y mutados (relleno).

**RESULTADOS**

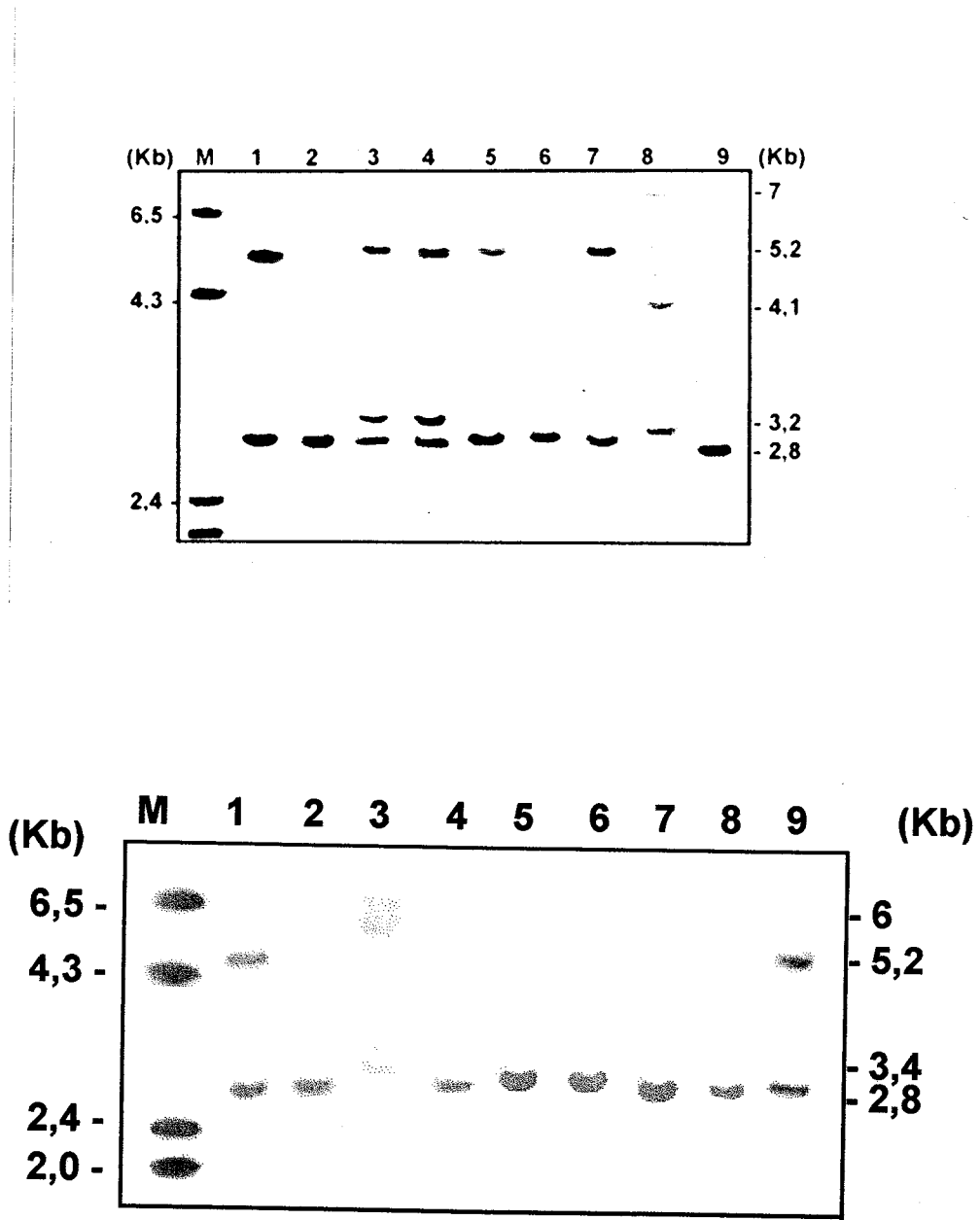


Figura 25. Autorradiografía de una doble digestión con EcoRI/EagI al hibridar con la sonda StB12.3. En el primer carril se observa el patrón del control de tamaños  $\lambda$ -hindIII. En A se muestran los resultados de una electroforesis de 20 h y en B los resultados de una electroforesis de 10 h. En el texto se especifican los tipos de patrones que se observan y las muestras analizadas.

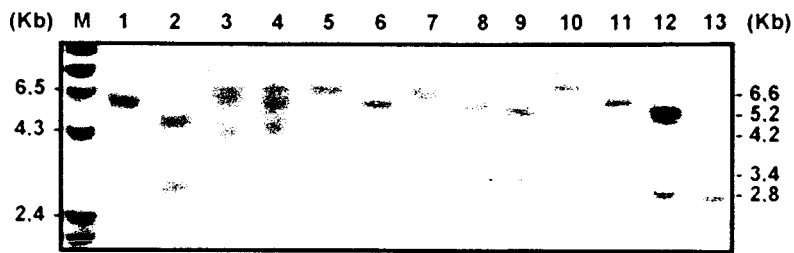
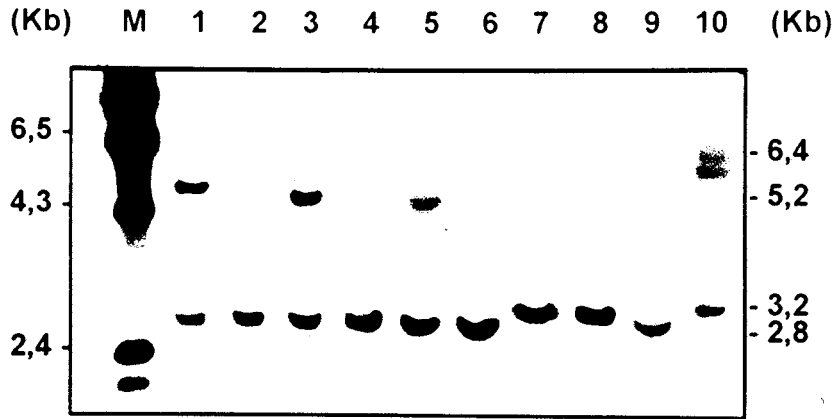


Figura 26. A: Autorradiografía de una doble digestión con las enzimas EcoRI/EagI y la sonda StB12.3 en una electroforesis corta. Se muestran varones afectados del síndrome X frágil y sus madres portadoras. B: Autorradiografía de una doble digestión con EcoRI/EagI y la sonda Ox1.9 en una electroforesis larga. En ambas electroforesis se muestra en el primer carril, el control de tamaños  $\lambda$ -hindIII.

## **RESULTADOS**

---

### *2.2 Hibridación con la sonda Ox1.9.*

La hibridación con la sonda Ox1.9 determina el mismo patrón que con la sonda StB12.3, cuando se utilizan las mismas enzimas de restricción (ver fig. 24). En la figura 26B se muestra un ejemplo de hibridación con la sonda Ox1.9 en una digestión doble con EcoRI/EagI. Se pueden observar varones normales (carriles 2, 4, 6 y 9), mujeres normales (carriles 3 y 5), varones portadores (carriles 7 y 8) con un incremento de 200 pb (90 CGG/CCG), una mujer portadora (carril 1) con un incremento de 300 pb (120 CGG/CCG). También se observa un individuo afecto (carril 10) que corresponde a un varón mosaico con tamaños premutados sin metilar (expansión de 400 pb) y tamaños mutados metilados (expansiones de 1000 pb a 1200 pb).

### **3. DIGESTIÓN DOBLE CON HindIII y SacII.**

En el diagnóstico del síndrome X frágil y para realizar algunos estudios se usaron las enzimas HindIII/SacII en una doble digestión (siendo SacII la enzima sensible a metilación). Sus dianas de restricción son AAGCTT/AAGCTT y CCGCGG/CCGCGG respectivamente. Los patrones de restricción son similares a los observados cuando se utilizan EcoRI y EagI.

#### *3.1. Hibridación con la sonda StB12.3.*

En la figura 27 se muestra el esquema de la zona a estudiar con los centros de restricción de las enzimas utilizadas y un esquema de los patrones de restricción que se detectan tras la hibridación. Como puede observarse son similares a los encontrados cuando se digiere con EcoRI/EagI, pues las dianas están muy próximas en la secuencia de ADN del locus FRAXA. En la figura 28 se muestra un ejemplo de la electroforesis en gel de agarosa de una digestión de ADN con las enzimas HindIII y SacII, teñida con bromuro de etidio.

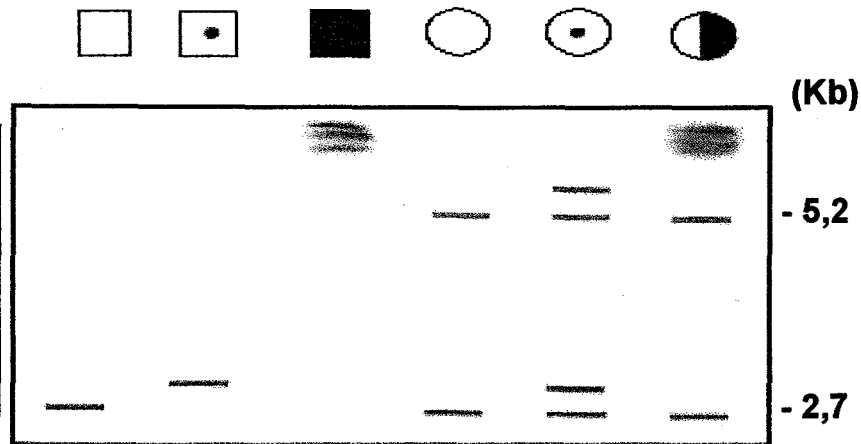
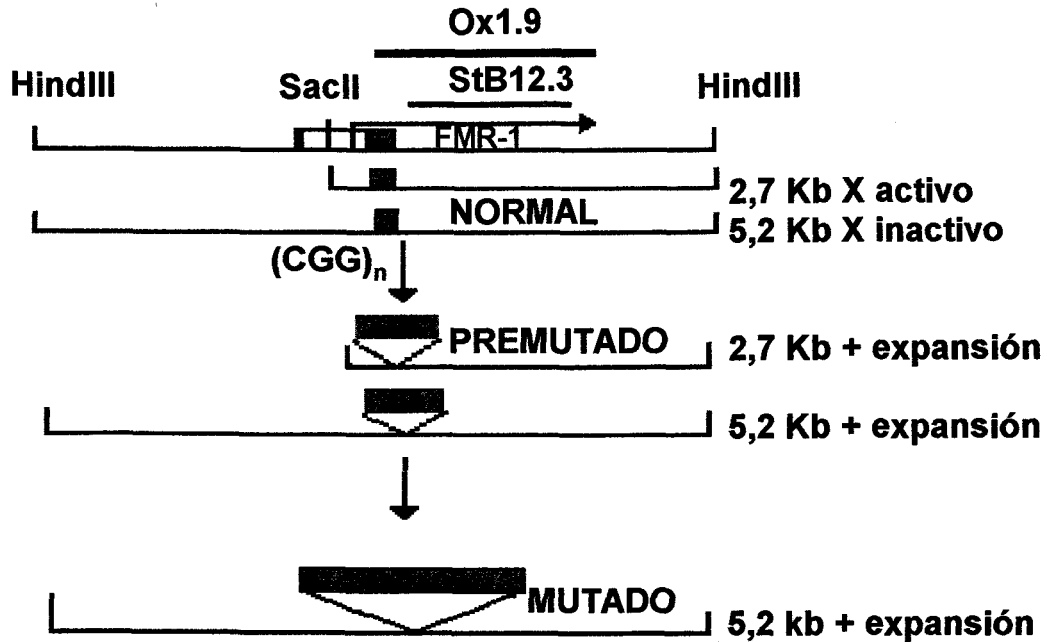


Figura 27. Esquema de la zona FRAXA con las dianas para las enzimas HindIII y SacII. Se indican los fragmentos posibles y los patrones de hibridación en las distintas muestras, que pueden ser normales (vacías), premutados (punto) y mutadas (rellenas).



## RESULTADOS

---

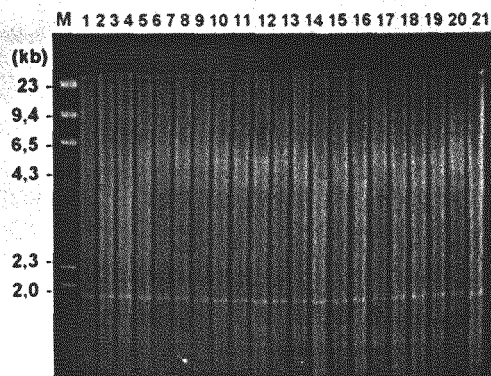


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio, que ha corrido 20 h a 35 V. Las muestras están digeridas con las enzimas HindIII y SacII. Se observa en el primer carril el marcador de tamaños  $\lambda$ -hindIII.

En el primer carril se observa el marcador  $\lambda$ -HindIII que nos permite calcular el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la hibridación. La figura 29 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en una digestión doble con HindIII/SacII e hibridación con la sonda StB12.3. Se observa una banda de 2,7 kb en los varones normales (carriles 1, 8 y 11) y una banda de 2,7 kb correspondiente al cromosoma X activo y una de 5,2 kb correspondiente al cromosoma X inactivo, en las mujeres normales (carriles 3, 4, 7 y 10). También se pueden ver muestras de mujeres que tienen un alelo normal y otro premutado pudiendo estar, cualquiera de los dos, metilados o sin metilar según el patrón de inactivación del cromosoma X (carriles 2 y 9). En el carril 5 se observa un patrón mosaico de un varón afecto, con tamaños premutado de 3,1 Kb y mutado de 6,5 kb, y en el carril 6 se muestra una mujer, hermana del paciente anterior portadora de una mutación total metilada y con retraso mental.

**4. RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.**

A continuación se relacionan los resultados obtenidos con esta técnica para cada muestra estudiada. Se indica el Sexo: ♂ = varón, ♀ = mujer. Tipo: (RM)= individuo retrasado mental. (RL) individuo retrasado leve. (N)= individuo no retrasado. (P)= individuo portador/a. (RM-FRAX)= individuo retrasado con el síndrome X-frágil. (RD, FRAG)= retraso en el desarrollo y fragilidad en la zona Xq27-28. (RM-KF)= individuo Klinefelter con retraso mental.

MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN	MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN
1.1	♂	(RM)	3kb	(EagI- EcoRI)	1.7	♂	(RM)	"	"
1.2	♂	(RM)	2.8kb	"	1.8	♂	(RM)	"	"
1.3	♂	(RM)	"	"	1.9	♂	(RM)	"	"
1.4	♂	(RM)	"	"	1.10	♂	(RM)	"	"
1.5	♂	(RM)	"	"	2.1	♀	(RM)	2.8-5.2kb	"
1.6	♂	(RM)	"	"	2.2	♀	(RM)	"	"

## RESULTADOS

MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN	MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN
2.3	♂	(RM)	2.8kb	"	6.3	♀	(N)	2.8-5.2kb	"
2.4	♂	(RM)	"	"	6.4	♂	(RM)	2.8kb	"
2.5	♀	(RM)	2.8-5.2kb	"	6.5	♂	(RM-FRAX)	7kb	"
2.6	♀	(RM)	"	"	6.6	♂	(N)	2.8kb	"
2.7	♀	(RM)	"	"	6.7	♂	(N)	2.8Kb	(EcoRI-EagI)
2.8	♂	(RM)	2.8kb	"	6.8	♀	"	2.8-5.2kb	"
2.9	♀	(RM)	2.8-5.2kb	"	6.9	♀	"	"	"
2.10	♂	(RM)	2.8kb	"	7.1	♂	(RM)	2.8kb	"
3.1	♂	(RM)	2.8kb	"	7.2	♂	(RM)	"	"
3.2	♂	(RM)	"	"	7.3	♂	(RM)	"	"
3.3	♂	(RM)	"	"	7.4	♂	(RM)	"	"
3.4	♂	(RM)	"	"	7.5	♂	(RM-FRAX)	banda difusa	"
3.6	♀	(RM)	2.8-5.2kb	"	7.6	♂	(RM)	2.8kb	"
3.7	♀	(RM)	"	"	7.7	♂	(RM)	"	"
3.8	♂	(RM)	2.8kb	"	8.1	♀	(RL-P)	2.8-6.2kb	"
3.9	♀	(RM)	2.8-5.2kb	"	8.2	♂	(RM-FRAX)	7kb	"
3.10	♀	(RM)	"	"	8.3	♀	(P)	3.5-5.2kb	"
4.1	♀	(RM)	"	"	8.4	♂	(N)	2.8kb	"
4.2	♀	(RM)	"	"	8.5	♀	(P)	2.8->6kb	"
4.3	♂	(RM)	2.8kb	"	8.6	♂	(N)	2.8kb	"
4.4	♂	(RM)	"	"	8.7	♀	"	2.8-5.2kb	"
4.5	♂	(RM)	"	"	8.8	♂	(RM-FRAX)	7kb	"
4.6	♀	(N)	2.8-5.2kb	"	8.9	♀	(P)	2.8-3.1-5.2kb	"
4.8	♂	(RM)	2.8kb	"	8.10	♂	(RM)	2.8kb	"
4.9	♂	"	"	"	8.11	♀	(RM)	2.8-5.2kb	"
4.10	♀	(N)	2.8-5.2kb	"	8.12	♂	(RM)	2.8kb	"
5.1	♀	(N)	"	"	9.1	♀	(N)	2.8-5.2kb	"
5.2	♀	(N)	"	"	9.2	♂	(RM)	2.8kb	"
5.3	♀	"	2.8-3.6-6kb	"	9.3	♀	(N)	2.8-5.2kb	"
5.4	♂	(RM)	banda difusa	"	9.4	♀	"	"	"
5.5	♂	(RM)	"	"	9.5	♂	"	2.8kb	"
5.6	♀	(N)	5.2-5.4kb	(EcoRI)	9.6	♀	(RL)	2.8-5.2kb	"
5.7	♀	"	"	"	9.7	♂	(RM)	2.8kb	"
5.8	♀	"	5.2-5.5kb	"	9.8	♂	(RM)	"	"
5.9	♂	"	5.2kb	"	9.10	♀	(N)	2.8-5.2kb	"
5.10	♂	(RM)	"	"	10.1	♀	(RL)	"	"
6.1	♀	(RL-P)	3-5.2kb	(EagI-EcoRI)	10.2	♀	(RL)	"	"
6.2	♂	(RM-FRAX)	6.5kb	"	10.3	♀	(N)	"	"

## RESULTADOS

MUESTRAS	SEXO TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN	MUESTRAS	SEXO TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN
10.4	♀ (RM)	"	"	13.6	♂ (RM-FRAX)	6kb	"
10.5	♀ (N)	"	"	13.7	♂ (RM-FRAX)	Banda difusa	"
10.6	♂ (RM)	2.8kb	"	13.8	♀ (P)	5.2-5.5Kb	(EcoRI)
10.7	♀ (N)	2.8-5.2kb	"	13.9	♂ (N)	5.2 Kb	"
10.8	♀ "	"	"	13.10	♀ (P)	5.2-5.5 Kb	"
10.9	♀ (RM)	2.8Kb	(EcoRI-EagI)	13.11	♂ (RM-FRAX)	8 Kb	"
10.10	♀ "	"	"	13.12	♂ (RM)	2.8 Kb	(EcoRI-EagI)
10.11	♂ "	2.8kb	"	14.1	♀ (P)	5.2-5.7 Kb	(EcoRI)
10.12	♀ "	2.8-5.2kb	"	14.2	♂ (RM-FRAX)	banda difusa	"
10.13	♂ "	2.8kb	"	14.3	♀ (N)	5.2 Kb	"
10.14	♀ "	2.8-5.2kb	"	14.4	♂ "	5.2 Kb	"
10.15	♀ "	"	"	14.5	♀ "	5.2 Kb	"
10.16	♂ "	2.8kb	"	14.6	♂ "	5.2 Kb	"
11.1	♂ (RM)	5.2kb	(EcoRI)	14.7	♀ "	5.2 Kb	"
11.2	♀ (N)	"	"	14.8	♂ "	5.2 Kb	"
11.3	♀ "	"	"	14.9	♂ "	5.2 Kb	"
11.4	♂ (RM)	"	"	15.1	♂ (RM)	2.8 Kb	(EagI-EcoRI)
11.5	♀ (RM)	"	"	15.2	♂ "	"	"
12.1	♀ (P)	3-5.2kb	(EcoRI-EagI)	15.3	♂ "	"	"
12.2	♂ (P)	3.1kb	"	15.4	♂ (N)	"	"
12.3	♂ (P)	3kb	"	15.5	♀ (P)	2.8-5.6 Kb	"
12.4	♂ (N)	2.8kb	"	15.6	♂ (RM)	5.2 Kb	"
12.5	♂ (P)	3.1kb	"	15.7	♂ "	"	"
12.6	♂ (RM)	2.8kb	"	15.8	♂ "	"	"
12.7	♂ (P)	3kb	"	15.9	♂ "	"	"
12.8	♀ (N)	2.8-5.2kb	"	15.10	♂ "	"	"
12.9	♀ (P)	2.8-5.6kb	"	16.1	♂ "	"	"
12.10	♂ (N)	2.8kb	"	16.2	♂ "	"	"
12.11	♀ (P)	2.8-5.5kb	"	16.3	♂ "	"	"
12.12	♂ (RM-FRAX)	4-6-7kb	"	16.4	♂ "	"	"
12.13	♀ (P)	2.8-5.2-6kb	"	16.5	♂ (N)	"	"
12.14	♀ (P)	2.8-5.2-6.7kb	"	16.6	♀ "	"	"
12.15	♀ (N)	2.8-5.2kb	"	16.7	♂ (RM)	"	"
13.1	♂ (P)	5.4kb	(EcoRI)	16.8	♂ "	"	"
13.2	♂ (N)	5.2kb	"	16.9	♂ "	"	"
13.3	♀ (P)	2.8-5.3kb	(EcoRI-EagI)	17.1	♂ "	"	"
13.4	♂ (RM-FRAX)	6.4kb	"	17.2	♂ "	"	"
13.5	♂ (N)	2.8kb	"	17.3	♂ "	"	"

## RESULTADOS

MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN	MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN
17.4	♂	(N)	"	"	21.2	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
17.5	♀	"	"	"	21.3	♂	"	2.8 Kb	"
17.6	♂	(RM)	"	"	21.4	♂	"	"	"
17.7	♂	(RM-FRAX)	6.5 Kb	"	21.5	♂	"	"	"
17.8	♀	(RD,FRAG)	2.8-5.2 Kb	(EcoRI-EagI)	21.6	♀	"	2.8-5.2 Kb	"
17.9	♂	"	2.8 Kb	"	21.7	♀	"	"	"
18.1	♂	(RM)	"	"	21.8	♂	(RM)	2.8 Kb	"
18.2	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	(EcoRI-EagI)	21.9	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
18.3	♀	"	"	"	21.10	♂	(RM)	2.8 Kb	(EcoRI-EagI)
18.4	♂	"	2.8 Kb	"	22.1	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
18.5	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"	22.2	♂	(RL)	2.8 Kb	"
18.6	♀	"	"	"	22.3	♂	"	"	"
18.7	♀	(RM)	"	"	22.4	♂	(RM)	"	"
19.1	♂	"	2.8 Kb	"	22.5	♀	(RL)	2.8-5.2 Kb	"
19.2	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"	22.6	♂	(N)	2.8 Kb	"
19.3	♂	(RM)	2.8 Kb	"	22.7	♂	(RM-FRAX)	6 Kb	"
19.4	♂	"	"	"	22.8	♂	(RM)	2.8 Kb	"
19.5	♂	"	"	"	22.9	♂	(RM-P)	3.1 Kb	"
19.6	♂	"	"	"	22.10	♂	"	"	"
19.7	♂	"	"	"	22.11	♂	(RM)	2.8 Kb	"
19.8	♂	"	5.2 Kb	(EcoRI)	23.1	♂	"	"	"
19.9	♂	(N)	"	"	23.2	♂	"	"	"
19.10	♀	"	"	"	23.3	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
19.11	♂	"	"	"	23.4	♂	"	2.8 Kb	"
19.12	♀	"	"	"	23.5	♀	(P)	2.8-5.5 Kb	"
20.1	♂	(RM)	2.8 Kb	"	23.6	♀	(P)	"	"
20.2	♂	"	"	"	23.7	♂	(N)	2.8 Kb	"
20.3	♂	"	"	"	23.8	♀	(P)	2.8-5.5 Kb	"
20.4	♂	"	"	"	23.9	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
20.5	♀	(N)	"	"	23.10	♂	(RM-KF-P)	3.1-5.2 Kb	"
20.6	♀	"	5.2 Kb	"	24.1	♂	(RM)	2.8 Kb	"
20.7	♀	(RM)	"	"	24.2	♂	"	"	"
20.8	♂	(N)	"	"	24.3	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
20.9	♀	"	2.8-5.2 Kb	(EcoRI-EagI)	24.4	♂	(RM)	2.8 Kb	"
20.10	♂	(RM)	2.8 Kb	"	24.5	♂	"	"	"
20.11	♂	"	"	"	24.6	♂	"	"	"
20.12	♂	"	"	"	24.7	♂	"	"	"
21.1	♂	"	"	"	24.8	♂	(RM-FRAX)	6.3 Kb	"

## RESULTADOS

MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN	MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN
24.9	♂	(RM)	2.8 Kb	"	28.8	♂	"	"	"
24.10	♂	"	"	"	28.9	♂	"	"	"
25.1	♂	"	"	"	28.10	♂	(RM-P)	3 Kb	"
25.2	♂	"	"	"	29.1	♂	(RM)	2.8 Kb	"
25.3	♀	"	2.8-5.2 Kb	"	29.2	♂	(RM-FRAX)	6.3 Kb	"
25.4	♂	"	2.8 Kb	"	29.3	♂	(RM-FRAX)	6.2 Kb	"
25.5	♂	"	"	"	29.4	♂	(RM)	2.8 Kb	"
25.6	♀	"	"	"	29.5	♂	(RM)	"	"
25.7	♂	"	"	"	29.6	♂	(RM)	"	"
25.8	♂	(RM)	2.8Kb	(EcoRI-Eagl)	29.7	♂	(RM)	"	"
25.9	♂	"	"	"	29.8	♂	(RM)	2.8Kb	(EcoRI-Eagl)
25.10	♂	"	"	"	29.9	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
26.1	♂	"	"	"	29.10	♀	(RL)	2.8-5.2-6Kb	"
26.2	♂	"	"	"	30.1	♂	(RM)	2.8 Kb	"
26.3	♂	"	"	"	30.2	♂	(N)	"	"
26.4	♂	"	"	"	30.3	♂	(RM)	"	"
26.5	♂	"	"	"	30.4	♀	(RL)	2.8-5.4 Kb	"
26.6	♂	"	"	"	30.5	♀	(RM)	2.8-5.2 Kb	"
26.7	♂	"	"	"	30.6	♀	(P)	2.8-3-5.2 Kb	"
26.8	♂	"	"	"	30.7	♀	(P)	2.8-3-5.2 Kb	"
26.9	♂	"	"	"	30.8	♀	(P)	2.8-3-5.2 Kb	"
26.10	♀	"	2.8-5.2 Kb	"	30.9	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
27.1	♀	"	"	"	30.10	♂	(N)	"	"
27.2	♂	"	2.8 Kb	"	31.1	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
27.3	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"	31.2	♀	(P)	2.8-3-5.2 Kb	"
27.4	♀	"	"	"	31.3	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
27.5	♂	(RM)	2.8 Kb	"	31.4	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
27.6	♂	"	"	"	31.5	♂	(RM)	2.8 Kb	"
27.7	♂	"	"	"	31.6	♂	(RM)	2.8 Kb	"
27.8	♂	"	"	"	31.7	♂	(RM)	2.8 Kb	"
27.9	♂	"	"	"	31.8	♂	(RM)	2.8 Kb	"
28.1	♀	"	2.8-5.2 KB	"	31.9	♂	(RM)	2.8 Kb	"
28.2	♂	(RM)	2.8 Kb	"	31.10	♂	(RM)	2.8 Kb	"
28.3	♂	"	"	"	32.1	♂	(RM)	2.8 Kb	"
28.4	♂	"	"	"	32.2	♂	(RM)	2.8 Kb	"
28.5	♀	"	2.8-5.2 Kb	"	32.3	♂	(RM-FRXA)	2.9-4-6 Kb	"
28.6	♂	"	2.8 Kb	"	32.4	♀	(RM-FRXA)	2.8-3.4-5.2 Kb	"
28.7	♂	"	"	"	32.5	♂	(RM)	2.8 Kb	(EcoRI-Eagl)

## RESULTADOS

MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN	MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑO	DIGESTIÓN
32.6	♀	(P)	2.8-3.2-5.2 Kb	"	34.1	♂	(RM)	2.8 Kb	"
32.7	♂	(RM-FRXA)	4-6.3 Kb	"	34.2	♂	"	2.8 Kb	"
32.8	♀	(RM-FRXA)	2.8-6 Kb	"	34.3	♀	(N)	2.8-3.1-5.2 Kb	"
32.9	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"	34.4	♂	(RM)	2.8-3.1 Kb	"
32.10	♂	(N)	2.8 Kb	"	34.5	♀	(N)	2.8-3.1-5.2 Kb	"
33.1	♂	(RM)	"	"	34.6	♂	(N)	2.8 Kb	"
33.2	♀	(P)	2.8-3.2-5.2-5.6Kb	"	34.7	♂	(N)	2.8 Kb	"
33.3	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"	34.8	♀	(N)	2.8-3.2-5.2 Kb	"
33.4	♂	"	2.8 Kb	"	34.9	♀	(N)	2.8-4-6 Kb	"
33.5	♂	(RM)	"	"	34.10	♂	(RM)	6.5 Kb	"
33.6	♂	(RM-FRXA)	6.3 Kb	"	34.11	♀	(N)	2.8-5.2 Kb	"
33.7	♂	(RM)	2.8 Kb	"					
33.8	♂	(RM)	2.8 Kb	"					
33.9	♂	(N)	2.8 Kb	"					

### 5. MOSAICISMO EN CÉLULAS SANGUÍNEAS.

En la población estudiada se han observado individuos afectados del síndrome X frágil, en los que se encuentra un patrón de hibridación con fragmentos de diferentes tamaños, que indican la existencia de mosaicismo celular. En nuestro estudio se ha observado un 17% de individuos varones X frágiles que presentaban mosaicismo. Estos individuos tenían fragmentos con tamaños en los rangos de premutación y de mutación completa, que se explican por inestabilidad en la zona de repeticiones del locus FRAXA.

La figura 30 muestra los resultados, del análisis de los polimorfismos de restricción, de una familia con mosaicismo de tamaño y metilación. También se muestra un varón, al que no se estudió la familia, en el que se observan nítidamente las distintas bandas correspondientes a tamaños premutados y mutados. La muestra 1 pertenece a un varón afecto de retraso mental X frágil, en el que se observa un bandeo difuminado a lo largo del carril, la muestra 2 pertenece a su

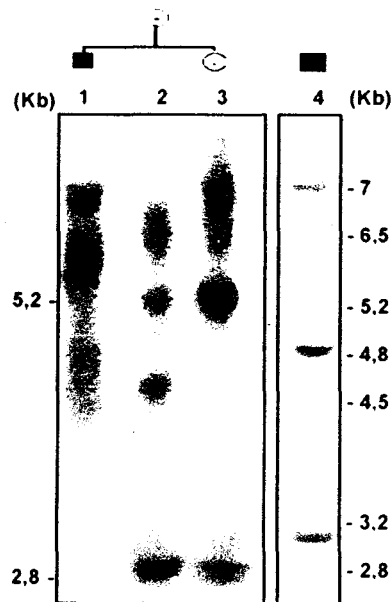


Figura 30. Autorradiografía de un "Southern-blot" de muestras con patrones mosaicos de tamaños y metilación en varones (1 y 4) y mujeres (2 y 3). Se utilizó la sonda StB12.3 y la doble digestión EcoRI/EagI.



## RESULTADOS

---

madre que es portadora de una mutación completa, en la que aparecen fragmentos metilados de 6.5 Kb y sin metilar de 4.5 Kb, apareciendo el cromosoma X normal repartido entre una banda de 2.8 Kb más intensa (activo) y otra banda de 5.2 Kb más débil (inactivo). La muestra 3 pertenece a la hermana del paciente que es portadora de una mutación completa metilada, con un bandedo entre 6 y 7 Kb para el cromosoma X frágil lo que indica mosaicismo de tamaño, y bandas de 2.8 y 5.2 Kb correspondientes al cromosoma X normal, apareciendo la banda de 5.2 Kb mucho más intensa que la de 2.8 Kb. Esto indica que el cromosoma normal está inactivo en la mayor parte de las células sanguíneas contrario a lo que se observa en su madre, en la que el cromosoma normal se encuentra preferentemente activo. En la muestra 4, se observa un varón afecto del síndrome X frágil que presenta mosaicismo de tamaño y metilación. La banda de 3.1 Kb corresponde a una premutación sin metilar, la banda de 4.8 Kb a una mutación no metilada, también se observa una banda de 7 Kb correspondiente a una mutación completa metilada. El tamaño de los fragmentos que aparecen sin metilar en las muestras 2 y 4 está por encima de 4 Kb lo que corresponde a un tamaño >400 triplete. Se encontró mosaicismo en tres casos más que no se muestran en la radiografía.

Otro caso estudiado en este trabajo es un varón con retraso mental profundo, enviado por presentar expresión citogenética de fragilidad cromosómica en la banda Xq27.3. Con la técnica de "Southern-blot" se detectaron tamaños en el rango normal y premutado sin metilar. Su madre y su hermana son portadoras de una premutación.

En la figura 31 se muestran los resultados de esta familia. La muestra 1 corresponde a la madre que es portadora de una premutación sin metilar de 3.2 Kb lo que corresponde a 133 triplete. La muestra 2 pertenece al varón retrasado mental con dos fragmentos uno de 2.8 Kb y otro de 3.2 Kb.

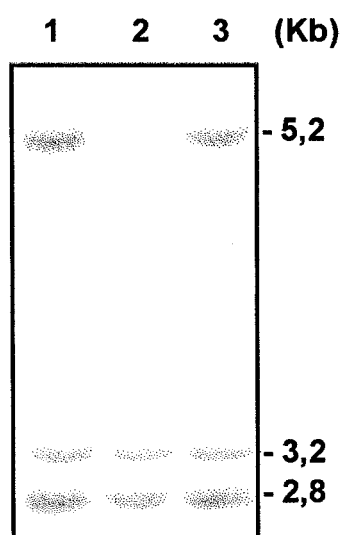


Figura 31. Autorradiografía de los patrones de restricción en una familia X frágil (ver en apartado G-4.1 la familia 11). El carril 1 corresponde a la madre portadora, el 2 al varón afecto y el 3 a una hermana portadora. En todas las muestras se observa un alelo normal y una premutación no metilada.

## **RESULTADOS**

---

En el carril 3 se observa el patrón de restricción de su hermana, que es igual al de su madre. La existencia de fragilidad citogenética y retraso mental junto con la premutación podría sugerir la existencia de un mosaicismo que en otros tejidos, por ejemplo el sistema nervioso, diera lugar a una mutación completa y a la manifestación del síndrome. Sin embargo no se puede descartar una simple coincidencia.

### **B) DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TRIPLETES DEL LOCUS FRAXA.**

Tras la secuenciación del gen FMR-1 a finales de 1991, se han podido diseñar cebadores que permiten la amplificación específica de la zona de repeticiones CGG/CCG por la técnica de PCR y con ello poder calcular el número exacto de tripletes en los alelos normales y premutados. Las expansiones grandes no pueden amplificarse por lo que el tamaño se calcula de forma aproximada a partir de los resultados obtenidos con la técnica de "Southern" como se ha expuesto en el apartado anterior.

#### **1. AMPLIFICACIÓN DE LOS TRIPLETES DEL LOCUS FRAXA.**

La amplificación específica de la zona de repeticiones CGG/CCG se hizo por PCR utilizando dCTP- $\alpha^{32}$ P para visualizar el producto de la PCR según el protocolo descrito en "MATERIAL Y MÉTODOS". Los alelos de tamaño normal o premutados se amplifican con facilidad y se separan en electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 6% desnaturalizante.

Cuando el número de repeticiones es muy grande la amplificación del fragmento es más difícil porque las repeticiones (CGG/CCG) $_n$  forman estructuras secundarias que paran la reacción de la polimerasa. En muchos casos los fragmentos amplificados son de varios tamaños, dependiendo del punto de interrupción de la amplificación por la polimerasa y aparecerán como un borrón a lo largo del carril de la muestra.

En la figura 32 se muestran dos ejemplos de amplificación de alelos normales donde se puede observar un claro polimorfismo entre los distintos individuos estudiados, con tamaños desde 20 hasta 38 tripletes. El tamaño exacto de los distintos alelos encontrados en nuestra población se determina corriendo en paralelo un control de secuenciación del plásmido M13mp18 o los marcadores pBR322 (digerido con MspI) o  $\Phi$  174 (digerido con HaeIII) como se muestra en otras radiografías.

En algunos casos la polimerasa es capaz de amplificar alelos expandidos relativamente grandes, pero no pueden ser visualizados en una electroforesis en gel de poliacrilamida, porque el tamaño de los fragmentos está fuera de la resolución de la acrilamida al 6% y se quedan en los pocillos. En estos casos los productos de la PCR se cargan en una electroforesis de agarosa al 2%, en la que se pueden detectar tamaños en un rango más amplio que en la electroforesis en acrilamida, si bien las bandas aparecen mucho más difusas.

La figura 33 muestra dos ejemplos de amplificación de alelos normales y expandidos en una electroforesis en gel de agarosa. Se utiliza el marcador "1kb ladder" como referencia de tamaños. Los alelos de 29 tripletes CGG/CCG corren a la vez que el tamaño de 309 pb del marcador. Los distintos alelos normales detectados corren según su número de repeticiones (carriles 1, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 16, 17 y 18 de la fig. 33A y 2, 3, 6, 10, 14 y 15 de la fig. 33B). Los alelos premutados pueden aparecer como una sola banda o como un pequeño borrón (carriles 2, 8 y 14 de la fig. 33A y 1, 4, 5, 8, 11, 13, 17 y 18 de la fig. 33B). Los alelos mutados con un número de tripletes por encima de 600 pb o bien no se amplifican y el carril aparece vacío (carriles 9, 10, 15 de la fig. 33A y carriles 7, 9 y 16 de la fig. 33B), o aparecen como un borrón ocupando todo el carril (muestra 12 de la fig. 33B).

## RESULTADOS

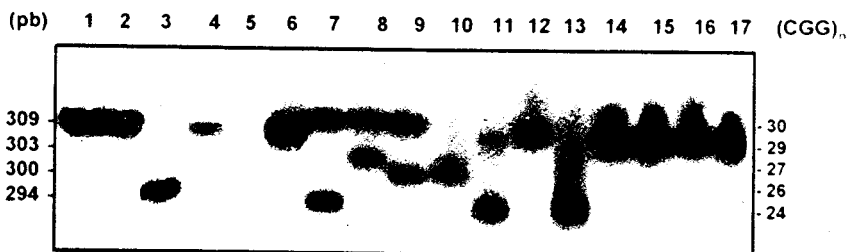
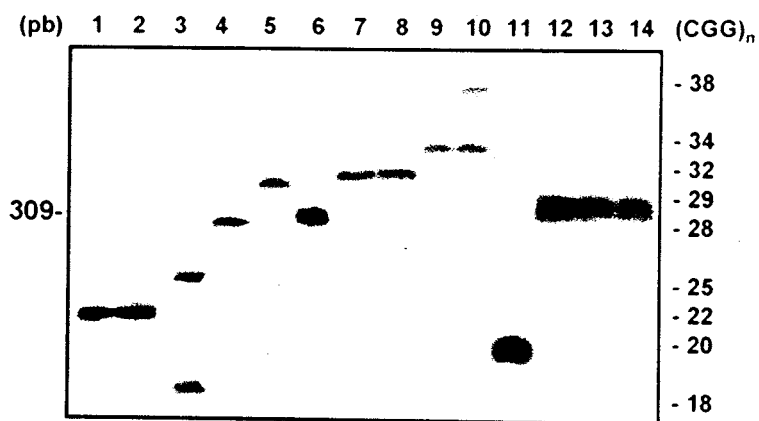


Figura 32. Autorradiografías de los resultados obtenidos con la técnica de PCR aplicada a la amplificación del locus FRAXA en individuos normales, en los que se observa un claro polimorfismo de tamaño indicativo de la variabilidad en el número de triplete.

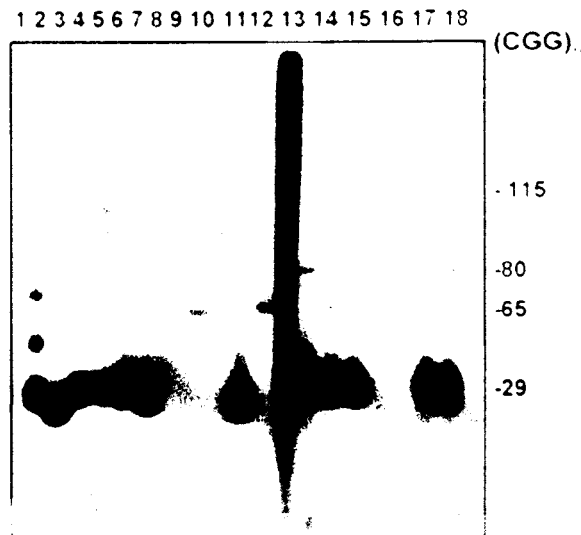
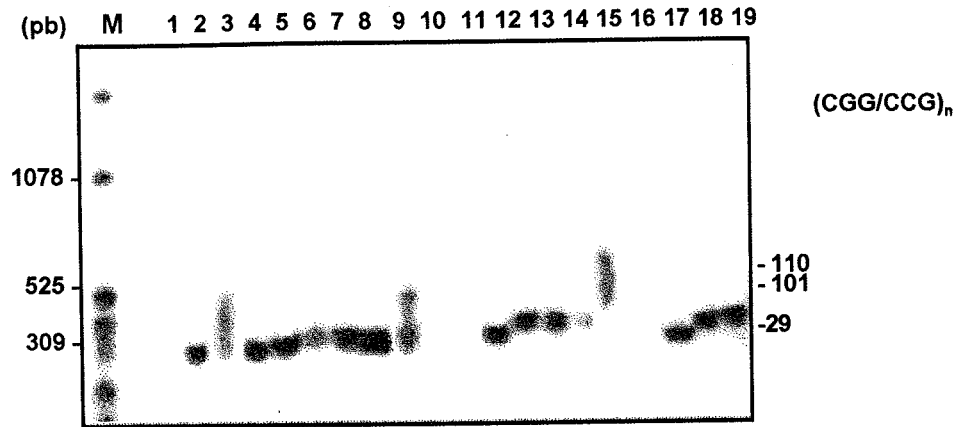


Figura 33. Autorradiografías de dos geles de agarosa desecados en un sistema de vacío, donde se muestran los resultados de una PCR del locus FRAXA para muestras normales, premutadas y mutadas. En la figura 33A se muestra en el primer carril el marcador de tamaños "1Kb ladder" marcado con radiactividad.

## RESULTADOS

---

Otro método utilizado para poner de manifiesto estos alelos consistía en realizar una PCR no radiactiva, separar los productos de PCR en una agarosa al 2%, transferirlos a una membrana de nylon e hibridar con un oligonucleótido radiactivo (ver "MATERIAL Y MÉTODOS").

En la figura 34 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con esta técnica. Los alelos normales (carriles 1, 6, 8, 9 y 10) y premutado (carril 2) se visualizan muy bien, sin embargo los alelos mutados pueden aparecer como bandas difusas (carriles 4 y 7) o no se amplifican y aparecen los carriles vacíos (carriles 3 y 5). Esta técnica puede usarse para conseguir una idea del tipo de muestra que se analiza pero no se puede calcular el tamaño exacto de las repeticiones, por lo que se empleó poco en el diagnóstico del síndrome x frágil, siendo más usada la técnica de electroforesis en acrilamida.

### *1.1 Desplazamiento de los cebadores.*

Para conocer si la causa de que no se amplificasen algunos alelos del locus FRAXA, se debía a la falta de hibridación de los cebadores o si era debido al porcentaje elevado de CGG en el fragmento a amplificar, se estudió el desplazamiento de los cebadores con la metodología expuesta en "MATERIAL Y MÉTODOS". Se utilizaron muestras de individuos normales como control (2, 8 y 10), premutados (1, 3, 5 y 9) y mutados (4, 6 y 7) que se habían estudiado previamente por Southern y PCR.

En la figura 35 se muestra la señal de la membrana hibridada con el cebador marcado (A) y la señal de la membrana prehibridada con el cebador sin marcar (B). En todos los casos se observa una disminución de la radiactividad, sugiriendo que los cebadores hibridan adecuadamente con el ADN molde y que sería el gran tamaño de la expansión de los tripletes del alelo mutado lo que hace imposible su amplificación.

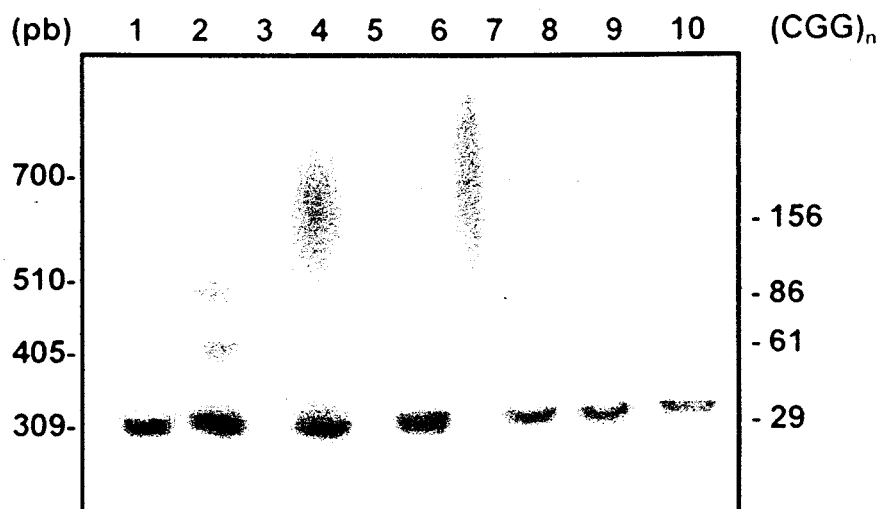


Figura 34. Autorradiografía en la que se muestra el producto de una PCR que tras una electroforesis en agarosa se ha transferido a una membrana, y después se ha hibridado con el oligonucleótido (CGG)<sub>5</sub> marcado con radiactividad. Se indican los tamaños en pares de bases y el número de repeticiones aproximado.



## RESULTADOS

---

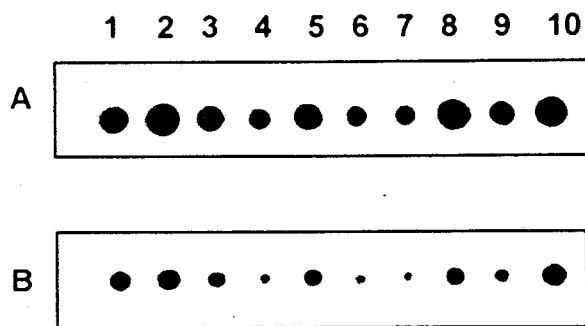


Figura 35. Autorradiografía del "dot-blot" que muestra el desplazamiento del cebador marcado. A: membrana no prehibridada, B: membrana prehibridada con el cebador sin marcar. PCR de muestras normales, premutadas y mutadas.

**2. RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.**

Para cada muestra estudiada de la población se relacionan a continuación los resultados obtenidos con la técnica de PCR:

MUESTRA	SEXO	PCR (pb)	N° CGG	MUESTRA	SEXO	PCR (pb)	N° CGG
1.1	♂	banda difusa	?	7.4	♂	318	32
1.4	♂	309	29	7.5	♂	banda difusa	>200
1.5	♂	"	"	7.6	♂	306	28
3.3	♂	318	32	7.7	♂	315	31
3.6	♀	309	29-29	8.1	♀	309-?	29->200
3.8	♂	318	32	8.2	♂	banda difusa	>200
3.9	♀	318	32-32	8.3	♀	309-?	29->200
3.10	♀	309-318	29-32	8.4	♂	309	29
4.6	♀	309-315	29-31	8.5	♀	309-?	29->200
5.1	♀	306-309	28-29	8.6	♂	309	29
5.2	♀	"	"	8.7	♀	282-309	20-29
5.3	♀	318-?	32->200	8.8	♂	banda difusa	>200
5.4	♂	banda difusa	>200	8.9	♀	282-460	20-81
5.5	♂	"	"	8.10	♂	309	29
5.6	♀	345-549	42-109	8.11	♀	309	29-29
5.7	♀	309-?	29->200	8.12	♂	312	29
5.8	♀	348-?	43->200	9.1	♀	306-309	28-29
5.9	♂	348	43	9.2	♂	309	29
5.10	♂	309	29	9.3	♀	290-309	23-29
6.1	♀	309-552	29-110	9.4	♀	"	"
6.2	♂	?	>200	9.5	♂	309	29
6.3	♀	309	29-29	9.6	♀	309-312	29-30
6.4	♂	309	29	9.7	♂	309	29
6.5	♂	?	>200	9.8	♂	"	"
6.6	♂	309	29	9.10	♀	290-309	23-29
6.7	♂	"	"	10.1	♀	303-315	27-31
6.8	♀	309-312	29-30	10.2	♀	300-315	26-31
6.9	♀	309	29-29	10.3	♀	300-303	26-27
7.1	♂	315	31	10.4	♀	290-306	23-28
7.2	♂	"	"	10.5	♀	306-309	28-29
7.3	♂	"	"	10.6	♂	290	23

## RESULTADOS

MUESTRA	SEXO	PCR (pb)	N° CGG	MUESTRA	SEXO	PCR (pb)	N° CGG
10.16	♂	290	23	14.6	♂	280	20
11.1	♂	306	28	14.7	♀	289-309	23-29
11.2	♀	306	28-28	14.8	♂	309	29
11.3	♀	"	"	14.9	♂	"	"
11.4	♂	306	28	15.1	♂	"	"
11.5	♀	306-312	28-30	15.2	♂	"	"
12.1	♀	309-438	28-72	15.3	♂	"	"
12.2	♂	525	101	15.4	♂	268	16
12.3	♂	405	61	15.5	♀	309-?	29->200
12.4	♂	281	20	15.6	♂	309	29
12.5	♂	525	101	15.7	♂	333	36
12.6	♂	306	28	15.8	♂	309	29
12.7	♂	498	92	15.9	♂	"	"
12.8	♀	309-351	29-43	15.10	♂	"	"
12.9	♀	281-?	20->200	16.1	♂	"	"
12.10	♂	351	43	16.2	♂	"	"
12.11	♀	309-?	29->200	16.3	♂	"	"
12.12	♂	510-560-?	Mosaico	16.5	♂	309	29
12.13	♀	309-510	29-96	16.6	♀	309-333	29-36
12.14	♀	268-411	16-61	16.7	♂	309	29
12-15	♀ (feto)	281-309	20-29	17.1	♂	309	29
13.1	♂	465	81	17.2	♂	306	28
13.2	♂	309	29	17.3	♂	309	29
13.3	♀	309-387	29-51	17.4	♂	"	"
13.4	♂	?	>200	17.5	♀	309-312	29-30
13.5	♂	309	29	17.6	♂	286	22
13.6	♂	?	>200	17.7	♂	?	>200
13.7	♂	"	"	17.8	♀	309	29-29
13.8	♀	309-?	29->200	17.9	♂	309	29
13.9	♂	309	29	18.1	♂	"	"
13.10	♀	309-?	29->200	18.2	♀	"	29-29
13.11	♂	?	>200	18.3	♀	315	31-31
13.12	♂	298	26	18.4	♂	309	29
14.1	♀	289-?	23->200	18.5	♀	252-309	10-29
14.2	♂	?	>200	18.6	♀	270-309	16-29
14.3	♀	289-298	23-26	18.7	♀	306	18-18
14.4	♂	298	26	19.1	♂	309	29
14.5	♀	309-315	29-31	19.2	♀	309	29-29

## RESULTADOS

MUESTRA	SEXO	PCR (pb)	N° CGG	MUESTRA	SEXO	PCR (pb)	N° CGG
19.3	♂	309	29	23.2	♂	312	30
19.4	♂	312	30	23.3	♀	327-348	35-43
19.5	♂	309	29	23.4	♂	327	35
19.6	♂	315	31	23.5	♀	315-561	31-113
19.7	♂	309	29	23.6	♀	315-?	31->200
19.8	♂	"	"	23.7	♂	309	29
19.9	♂	258	12	23.8	♀	315-?	31->200
19.10	♀	258-309	12-29	23.9	♀	309-315	29-31
19.11	♂	252	10	23.10	♂	285-390	22-86
19.12	♀	258-309	12-29	24.1	♂	312	30
20.4	♂	309	29	24.2	♂	309	29
20.5	♀	312	30-30	24.3	♀	"	"
20.6	♀	291-312	23-30	24.4	♂	348	43
20.7	♀	291-309	23-29	24.5	♂	309	29
20.8	♂	309	29	24.6	♂	312	30
20.9	♀	"	29-29	24.7	♂	272	20
20.10	♂	"	29	24.8	♂	?	>200
20.11	♂	"	"	24.9	♂	309	29
20.12	♂	"	"	24.10	♂	312	30
21.4	♂	309	29	25.2	♂	272	20
21.5	♂	"	"	25.3	♀	272-309	20-29
21.6	♀	"	"	25.4	♂	348	43
21.7	♀	309-348	29-43	25.5	♂	309	29
21.8	♂	309	29	25.6	♂	"	"
21.9	♀	309-312	29-30	25.7	♂	272	20
21.10	♂	309	29	25.8	♂	315	31
22.1	♀	252-309	10-29	25.9	♂	309	29
22.2	♂	309	29	25.10	♂	"	"
22.3	♂	339	39	26.1	♂	"	"
22.4	♂	306	28	26.2	♂	"	"
22.5	♀	309-336	29-38	26.4	♂	"	"
22.6	♂	312	30	26.5	♂	"	"
22.7	♂	?	>200	26.6	♂	350	42
22.8	♂	309	29	26.7	♂	341	39
22.9	♂	420	65	26.8	♂	326	34
22.10	♂	"	"	26.9	♂	280	20
22.11	♂	309	29	26.10	♀	309-350	29-42
23.1	♂	309	29	27.1	♀	309-329	29-36

## RESULTADOS

MUESTRA SEXO	PCR (pb)	N° CGG	MUESTRA SEXO	PCR (pb)	N° CGG
27.2 ♂	315	31	31.1 ♀	306-309	28-29
27.3 ♀	280-315	20-31	31.2 ♀	260-?	16->200
27.4 ♀	309-315	29-31	31.3 ♀	309	29-29
27.5 ♂	291	23	31.4 ♀	306-309	28-29
27.6 ♂	350	42	31.5 ♂	306	28
27.7 ♂	312	30	31.6 ♂	309	29
27.8 ♂	309	29	31.7 ♂	315	31
27.10 ♂	"	"	31.8 ♂	318	32
28.1 ♀	280-309	20-29	31.9 ♂	309	29
28.2 ♂	280	20	31.10 ♂	300	26
28.3 ♂	309	29	32.1 ♂	312	30
28.4 ♂	"	"	32.2 ♂	300	26
28.5 ♀	312	30-30	32.3 ♂	?	>200
28.6 ♂	309	"	32.4 ♀	309-?	29->200
28.7 ♂	341	39	32.5 ♂	309	29
28.8 ♂	309	29	32.6 ♀	291-?	23->200
28.9 ♂	"	"	32.7 ♂	?	>200
28.10 ♂	375	51	32.8 ♀	309-?	29->200
29.1 ♂	309	29	32.9 ♀	309	29-29
29.2 ♂	?	>200	32.10 ♂	309	29
29.3 ♂	?	>200	33.1 ♂	"	"
29.4 ♂	309	29	33.5 ♂	309	29
29.5 ♂	312	30	33.6 ♂	?	>200
29.6 ♂	309	29	33.7 ♂	306	28
29.7 ♂	326	35	33.8 ♂	309	29
29.8 ♂	309	29	33.9 ♂	309	29
29.9 ♀	309-?	29->200	34.1 ♂	312	30
29.10 ♀	280-309	23-29	34.2 ♂	300	26
30.1 ♂	309	29	34.3 ♀	309-312	29-30
30.2 ♂	270	20	34.4 ♂	309	29
30.3 ♂	312	30	34.5 ♀	309-?	29->200
30.4 ♀	309-?	29->200	34.6 ♂	291	23
30.5 ♀	300-309	26-29	34.7 ♂	"	"
30.6 ♀	260-?	16->200	34.8 ♀	291-?	23->200
30.7 ♀	260-?	16->200	34.9 ♀	309-?	29->200
30.8 ♀	260-?	16->200	34.10 ♂	?	>200
30.9 ♀	309	29-29	34.11 ♀	291-309	23-29
30.10 ♂	"	29			

### **3. AMPLIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS LOCI FRAXA y DXS548.**

Durante el estudio del síndrome X frágil en la población retrasada se puso a punto un protocolo de PCR para amplificar los loci DXS548 y FRAXA en la misma reacción, consiguiéndose un ahorro de tiempo considerable, así como la reducción del gasto de enzimas y reactivos. En la figura 36 se muestra una autorradiografía en la que se observan los dos polimorfismos. Se utiliza como marcador el PBR322 digerido con MspI. El DXS548 corre entre los tamaños de 190-204 pb y el locus FRAXA cercano a la banda de 309 pb por lo que pueden separarse perfectamente en la acrilamida.

El pocillo 1 (M) corresponde al marcador de tamaños. Las muestra 1-6, 8, 10-14, 17 y 18 corresponden a individuos con alelos de tamaño normal. En algunos casos como en los carriles 7, 15 y 16 se amplifica el locus DXS548 pero no el locus FRAXA. Estos resultados indican que la reacción ha funcionado bien pero que posiblemente el tamaño del alelo de FRAXA era demasiado grande y no se puede amplificar.

Esta asunción fue confirmada por estudios de "Southern-blot" ya que en las tres muestra se observaron expansiones en el rango de mutación. En el carril 9 no se observan fragmentos en ninguno de los dos loci posiblemente por algún problema en la reacción de amplificación, pues la muestra como pudo comprobarse por "Southern-blot" era normal. Puede concluirse que la amplificación simultanea de los dos loci sirve también como control interno para comprobar que la reacción de PCR ha funcionado correctamente.

### **4. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL LOCUS FRAXA.**

El número de tripletes CGG/CCG es variable en la

## RESULTADOS

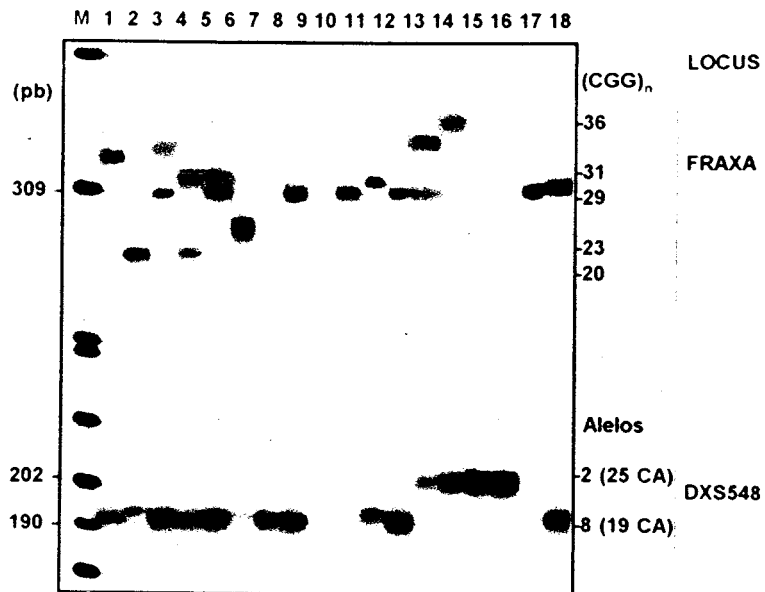


Figura 36. Autorradiografía de una PCR simultánea de los loci FRAXA y DXS548. El segundo locus sirve de control interno de la reacción de amplificación.

normal (Fisch y col. 1994), con una distribución de frecuencias que es característica de cada población. En nuestro estudio se han observado 23 alelos distintos, con un número de triplete CGG/CCG desde 10 hasta 43 repeticiones. En la figura 37 se muestran en un diagrama de barras las frecuencias absolutas de cada alelo en el rango normal, calculados a partir de los individuos no relacionados de la muestra. El alelo más frecuente para el locus FRAXA, en nuestra población es el de 29 triplete (46%), seguido de los de 30, 28 y 31. Estos 4 alelos representan el 69% de la frecuencia acumulada. Con un pico menor en los alelos de 23 y 32 repeticiones (5% cada uno). Si se dividen los alelos normales en pequeños (<35 CGG/GGC) y grandes (>35 CGG/CCG), la frecuencia se acumula en un 88,44% en los alelos pequeños, representando los alelos normales grandes sólo el 11,56%. En estos alelos grandes se sitúa una zona gris debido a que en algunos son estables y otros inestables. En estudios en otras poblaciones se calculan valores similares en la frecuencia de los alelos en la zona gris, se indica un 11,26% en el trabajo de Snow y col., (1993) y un 12,1% en el trabajo de Zhong y col., (1995).

### **5. ESTUDIO PRENATAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL.**

Debido a que no existe tratamiento para el síndrome X frágil, el diagnóstico prenatal en mujeres portadoras junto con el consejo genético a las familias X frágiles, es el único método disponible en la actualidad, para disminuir la incidencia de esta enfermedad hereditaria.

#### *5.1. Ejemplo de un diagnóstico por PCR.*

Se realizó el diagnóstico prenatal en una paciente, portadora de una premutación (individuo V-2 de la familia 2, apartado G de RESULTADOS), en el segundo mes de gestación, utilizando una muestra de ADN de amniocitos. Se utilizaron



## RESULTADOS

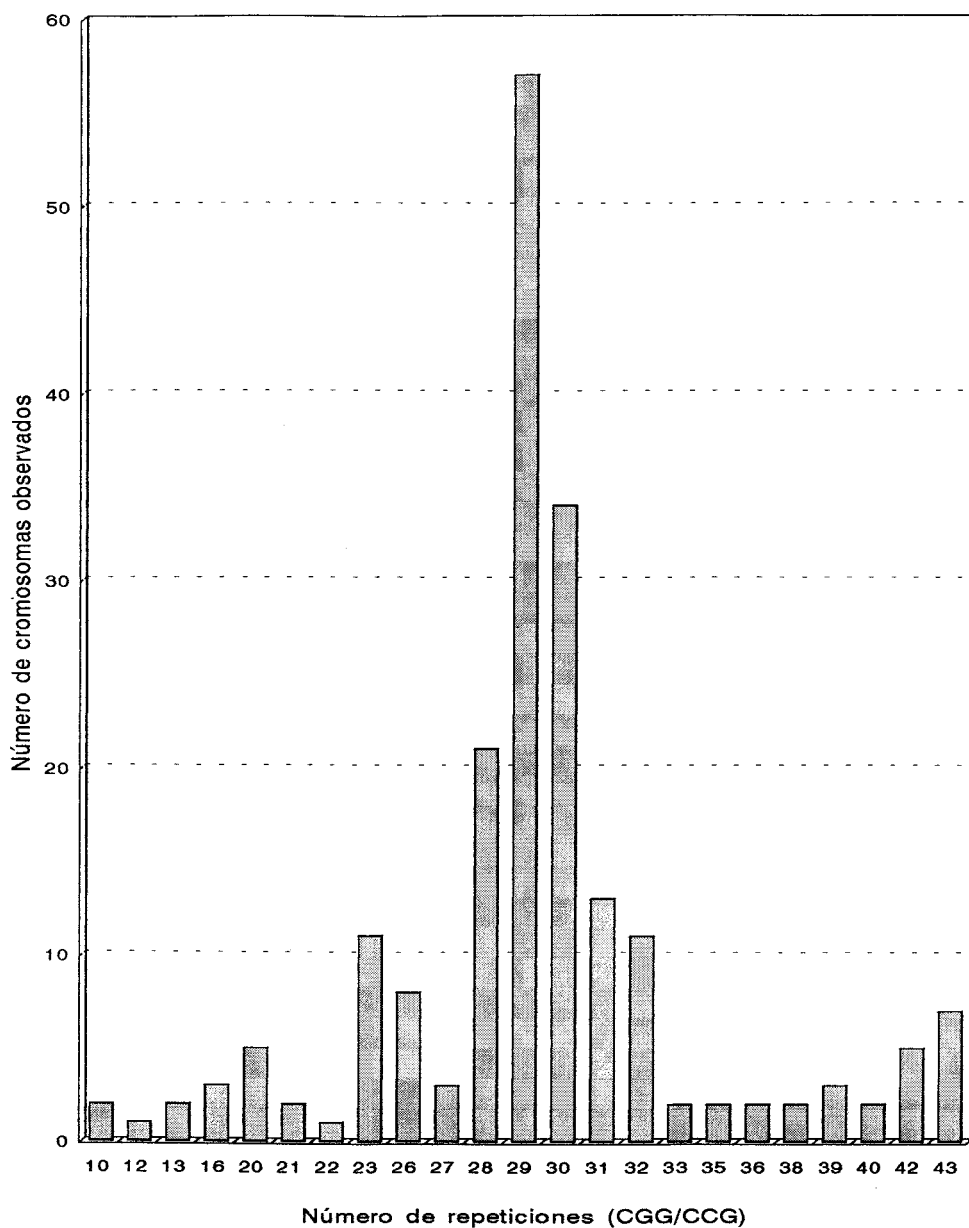


Figura 37. Diagrama de barras de las frecuencias absolutas de los distintos alelos encontrados en nuestra muestra. Se observa que los alelos más frecuentes en nuestra población son los de 29 y 30 triplete.

también muestras de ADN de células blancas de la sangre de la madre IV-2 portadora de una premutación, de una hija portadora de una mutación completa (este individuo, V-I se había diagnosticado previamente, y se utilizó de referencia para conocer el alelo paterno) y del abuelo materno portador de una premutación (individuo III-2 de la familia 2).

Se amplificaron los tripletes CGG/GGC del locus FRAXA y las repeticiones CA/TG del locus DXS548 por PCR utilizando dATP[ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]. Los alelos se separaron en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% desnaturalizante. La figura 38 muestra una autorradiografía del gel con los resultados obtenidos de la amplificación de ambos loci.

En el carril 1 se observa el alelo del abuelo materno portador de una premutación de 92 tripletes. La madre (carril 2) tiene un alelo normal de 29 repeticiones y un alelo premutado de 92 repeticiones. El carril 3 corresponde a una hija portadora diagnosticada previamente por "Southern blot" en el que podemos ver el alelo normal de 20 repeticiones, heredado por vía paterna. El carril 4 corresponde a la muestra del "index" y como puede observarse tiene 2 alelos normales, uno de 29 CGG/CCG heredado de su madre y otro de 20 CGG/CCG heredado de su padre, por lo que el genotipo del feto es el de una niña normal para el locus FRAXA.

Para corroborar los resultados obtenidos, se estudió el locus DXS548 que cosegrega con el locus FRAXA. A la derecha de la radiografía, puede observarse que el alelo mutado de FRAXA va ligado al alelo 2 (204 pb), según la nomenclatura propuesta por Macpherson y col., (1994) para el locus DXS548, que aparece en las muestras del abuelo materno (carril 1), de la madre (carril 2) y de la hija portadora (carril 3). Sin embargo, el probando (carril 4) tiene solo el alelo 7 (194 pb) que en esta familia está ligado al cromosoma normal concluyendo que es

## RESULTADOS

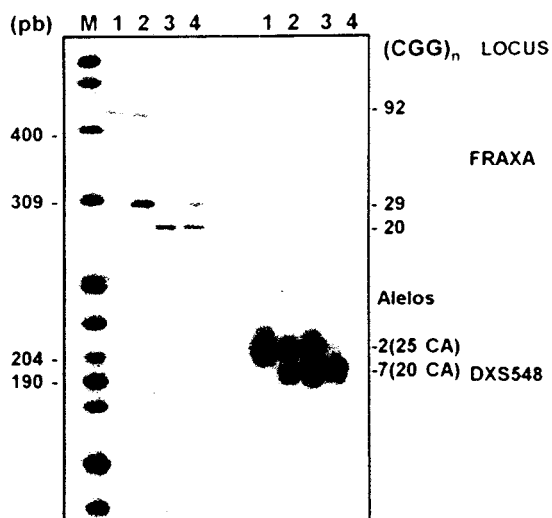


Figura 38. Autorradiografía de los resultados de la PCR de los loci FRAXA y DXS548 en un diagnóstico prenatal. En el primer carril (M) se observa el control de tamaños PBR322/MspI marcado con radiactividad.

homocigota para este locus. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el feto presenta un genotipo normal para el locus FRAXA, por lo que el riesgo de padecer el síndrome X frágil, por expansión en los triplete CGG/CCG, es nulo.

Para comprobar la ausencia de contaminación de células maternas en el líquido amniótico se estudiaron a su vez tres loci polimórficos de repeticiones CA/TG, y no se detectó contaminación.

### **C) POLIMORFISMO (CA/TG)<sub>n</sub> DEL LOCUS DXS548.**

El locus DXS548 se caracteriza por ser un polimorfismo de repeticiones CA/TG, por lo que el número de dinucleótidos será variable en la población. La cercanía del locus DXS548 y el locus FRAXA permite un claro ligamiento durante la meiosis, encontrándose una frecuencia de recombinación muy baja, entre 0% (Verkerk y col., 1991) y 0,15% (Dreesen y col., 1994). Por ello este locus ha sido muy utilizado como complemento en el diagnóstico de familias X frágiles junto con las pruebas directas del gen FMR-1, analizadas en los apartados anteriores. En la actualidad se utiliza como prueba complementaria en el diagnóstico y para estudiar el posible efecto del cromosoma fundador observado en el síndrome X frágil.

#### **1. LOCUS DXS548 EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.**

La Figura 39 (A Y B) muestra dos ejemplos de la amplificación por PCR del locus DXS548. Se utiliza para determinar el tamaño de los alelos el control de secuenciación M13pm18 y el marcador de tamaños PBR322/MspI. Se observa fragmentos de diferentes tamaños debido al polimorfismo del locus. Se han descrito 9 alelos diferentes denominados según propone Macpherson y col., (1994) como 9 (18 CA/TG), 8 (19 CA/TG), 7 (20 CA/TG), 6 (21 CA/TG), 5 (22 CA/TG), 4 (23 CA/TG),

**RESULTADOS**

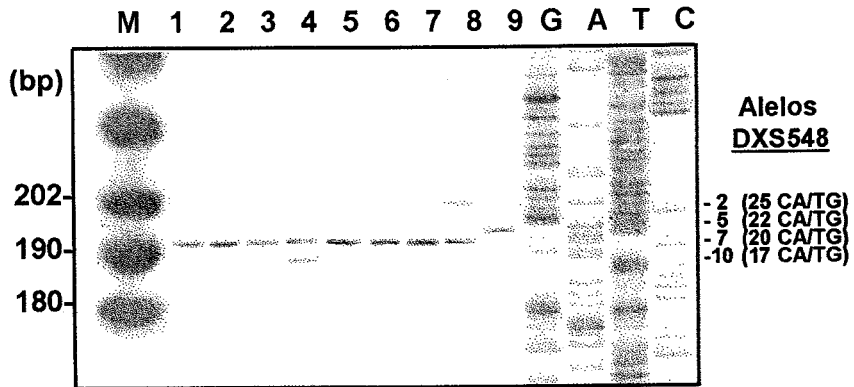
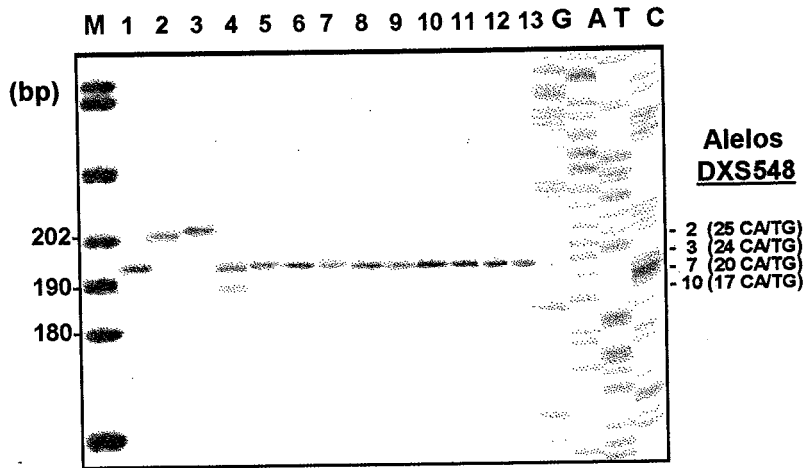


Figura 39. Autorradiografías de la amplificación por PCR del locus DXS548. En el primer carril se observa el marcador de tamaños PBR322/MspI y en los cuatro últimos un control de secuenciación del plásmido M13mp18.

3 (24 CA/TG), 2 (25 CA/TG) y 1 (26 CA/TG). Hemos estudiado las frecuencias alélicas para el locus DXS548 en los individuos no relacionados y normales para el locus FRAXA. En la tabla VI se muestra un estudio comparativo de las frecuencias alélicas encontradas en distintas poblaciones. Se observa que en nuestra población aparece un alelo nuevo, no descrito anteriormente, que hemos denominado 10 (con 17 repeticiones CA/TG; carriles 4 de la fig. 39 A y B). También hemos encontrado el alelo 9 que es muy poco frecuente, descrito sólo en Italia (Chiurazzi y col., 1996) y en la población belga-holandesa (Buyle y col., 1993).

Se observa también el alelo 5 que se ha encontrado en 4 poblaciones de las 8 mostradas en la tabla VI. El resto de los alelos encontrados han aparecido con anterioridad en la mayor parte de las poblaciones estudiadas, aunque las frecuencias alélicas son diferentes. En las poblaciones mediterráneas los tres alelos más frecuentes son el 2, el 6 y el 7 que representan el 90% de la frecuencia acumulada total, mientras que en Andalucía, siendo también los más frecuentes, sólo representan el 74,8%. Esto indica que hay una mayor dispersión de frecuencias en nuestra población, lo que apoya la hipótesis de una mayor diversidad genética.

## **2. ESTUDIO HAPLOTÍPICO.**

Se estudiaron las frecuencias haplotípicas para los loci DXS548 y FRAXA en 146 cromosomas no X frágiles y en 19 cromosomas X frágiles (ver tabla VII). En la población no X frágil, el haplotipo más frecuente es 7-29 (19,1%), seguido del 6-29 (6,1%), el 7-28 (4,1%), el 7-30 (4,1%) y el 7-31 (4,8%). En la población caucásica estudiada por Zhog y col., (1994) los 13 haplotipos más frecuentes cubren el 77% de la frecuencia acumulada, mientras que en nuestra población sólo cubren el 66,8%, observándose por lo tanto mayor dispersión haplotípica.

## RESULTADOS

TABLA VI: Distribución alélica del locus DXS548 en diferentes poblaciones.

Alelos DXS548 (a)	ANDALUCÍA	EEUU	GRAN BRETAÑA	BÉLGICA HOLANDA	FRANCIA	ITALIA	GRECIA CHIPRE	CAMERÚN	CHINA
1 (26 CA)	8	3	8	4	2	4	1	.	.
2 (25 CA)	14	15	12	14	15	10	6	1	.
3 (24 CA)	7	7	.	1	1	.	.	9	.
4 (23 CA)	2	.	.	2	1	.	1	3	1
5 (22 CA)	3	2	.	.	.	3	.	4	3
6 (21 CA)	26	18	28	14	23	30	3	12	30
7 (20 CA)	72	139	138	98	117	162	56	44	183
8 (19 CA)	13	6	2	.	3	4	3	1	10
9 (18 CA)	2	.	.	1	.	2	.	.	.
10 (17 CA)	2	.	.	.	.	.	.	.	.
TOTAL	149	190	188	134	162	215	70	74	227

(a) Alelos DXS548 nombrados como Macpherson y col. (1994).

Se indica el número absoluto de cromosomas no X frágiles.

TABLA VII: Haplotipos DXS548-FRAXA en las muestras estudiadas de Andalucía.

Alelos FRAXA (CGG/CCG) <sub>n</sub>	DXS548 alleles									
	10 17 CA	9 18 CA	8 19 CA	7 20 CA	6 21 CA	5 22 CA	4 23 CA	3 24 CA	2 25 CA	1 26 CA
10									2	
12									1	
16				2						
20	1		1	3	1					
21				1						
23				4	1			1	1	
26				5	1			1		
27				1	1					
28	1			6	2	1			1	
29		1	5	28	9	2	1	2	5	2
30			1	6	3		1		1	1
31		1		7	1			2		2
32			1	1	2			1		
35				1	1					
36				2						
39			1	1					1	
40				1						
42				2	1					
43				1	3				2	
NO X FRÁGIL	2	2	13	72*	26*	3*	2	7	14*	5
X FRÁGIL				5*	3*	1*			10*	

\*Cromosomas no X frágiles comparados con los X Frágiles.  $X^2=19.4$   $P=0,0002$  (df)=3. Alelos DXS548 nombrados según Macpherson y col. (1994).



**RESULTADOS**

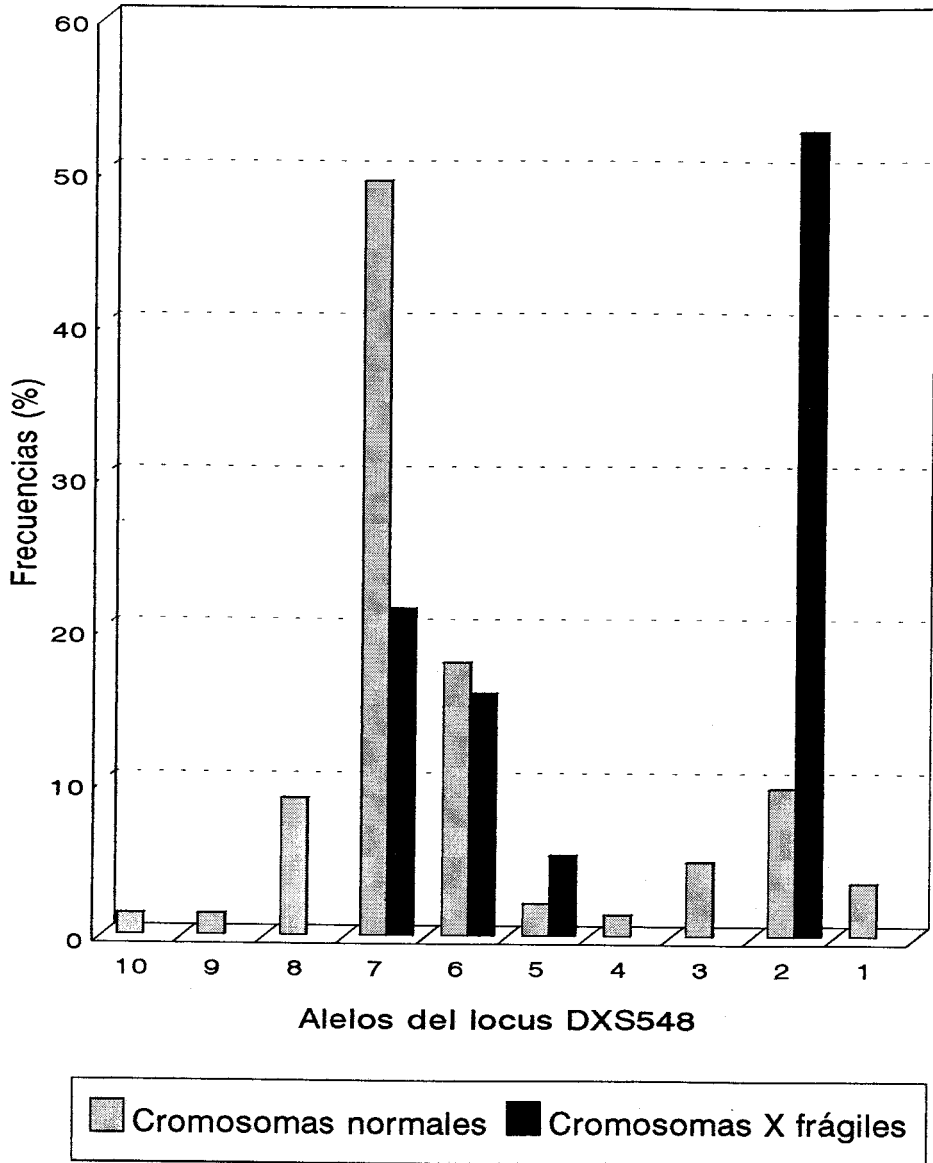


Figura 40. Diagrama de barras donde se representan los valores de frecuencias (%) de los alelos del locus DXS548 en la población no X frágil (gris) y en la población X frágil (negro). Puede observarse el desequilibrio de ligamiento en el alelo 2.

En la Tabla VII se muestran las frecuencias absolutas de los haplotipos DXS548-FRAXA encontrados en la población no X frágil. Se puede observar también los haplotipos DXS548-FRAXA en los 19 cromosomas X frágiles no relacionados de nuestra muestra. La figura 40 muestra las frecuencias alélicas del locus DXS548 en la población andaluza no X frágil (N=146) y en la población X frágil (N=19). Se observa que el alelo 7 (20 CA) es el más frecuente en la población no X frágil (49,3%). En la población X frágil (cromosomas X mutados no relacionados) el alelo más frecuente es el 2 (25 CA), (52,6%), sin embargo es muy poco frecuente en los cromosomas no X frágiles (9,6%). Se establece que existe un desequilibrio de ligamiento entre los dos marcadores estudiados. Empleando el test de  $\chi^2$  para comparar los alelos encontrados en la población X frágil con los valores de estos alelos en la población no X frágil, se calcula un valor de  $\chi^2= 19,4$  (P=0,0002, con 3 grados de libertad). Estos datos apoyan la hipótesis del cromosoma fundador en el síndrome X frágil en Andalucía, como se ha propuesto en otras poblaciones estudiadas (Zhong y col., 1994; Chiurazzi y col., 1996a). Se ha postulado que el antecesor común habría surgido en África donde se ha encontrado el mismo desequilibrio de ligamiento (Chiurazzi y col., 1996b).

#### **D) SECUENCIACIÓN DE DISTINTAS ZONAS DEL LOCUS FRAXA.**

La causa inicial que origina la inestabilidad y amplificación de las repeticiones CGG/GGC del locus FRAXA no se conoce. Estudios recientes postulan que la pérdida de interrupciones AGG/CCT en una secuencia de más de 10 repeticiones CGG/GGC puede ser la causa de la inestabilidad de esos alelos (Zhong y col., 1995; Kunst y Warren, 1994). Por otra parte la secuencia descrita para las zonas adyacentes a las repeticiones CGG/GGC por Verker y col., (1991) difieren de la descrita por Kremer y col., (1991) y se desconoce si esta región es variable en la población y/o si tiene alguna

## **RESULTADOS**

---

influencia sobre la inestabilidad de los tripletes CGG/GGC.

### **1. SECUENCIACIÓN DE LOS TRIPLETES.**

En la actualidad se postula que alelos con una secuencia de tripletes por encima de 36 CGG/CCG sin ninguna interrupción AGG/CCT son inestables y pueden sufrir variaciones de tamaño, al pasar de una generación a otra (Zhong y col., 1995). Estudios recientes (Eichler y col., 1995) demuestran que estas interrupciones aparecen también en otros primates, como los gorilas, que junto con el hombre son las especies con mayor número de CGG/GGC en el locus FRAXA. Estas observaciones sugieren que a partir de un cierto número de repeticiones CGG/CCG aparecen las interrupciones AGG/CCT y que éstas confieren estabilidad a los alelos.

En este trabajo se ha secuenciado la zona de repeticiones CGG/GGC del locus FRAXA, en alelos normales y premutados, a partir de los respectivos productos de PCR con el método de termociclación y parada de la reacción por dideoxinucleótidos (ver MATERIAL Y MÉTODOS). Este protocolo permite secuenciar muestras con muy poca cantidad de templado, sin necesidad de clonar. Sin embargo, puede haber más ruido de fondo y pueden aparecer bandas ambiguas siendo muy difícil la lectura completa en los alelos premutados. Además ésta zona al tener abundancia en bases C y G ( $\approx 70\%$ ) aumenta la frecuencia de formación de estructuras secundarias, con las consecuentes paradas en la reacción de secuenciación, que aparecen como bandas en todos los carriles y dificultan la lectura. Este problema es más acusado cuanto mayor es el número de tripletes.

El tamaño de los alelos que se han secuenciado y el número exacto de repeticiones se calculaban previamente con los datos obtenidos por PCR.

En la figura 41 se muestra una autorradiografía de una secuenciación de un alelo con 29 CGG/CCG donde se aprecian dos interrupciones AGG/CCT en las posiciones 11 y 21 de los tripletes. En la figura 42 se muestra una autorradiografía de la secuenciación de un alelo normal, de 35 repeticiones, con tres interrupciones AGG/CCT en las posiciones 11, 21 y 31.

Los alelos premutados eran difícil de secuenciar, no pudiéndose leer todos los tripletes de la muestra. El tamaño exacto se calculaba por PCR. En la figura 43 se muestra una autorradiografía de un alelo premutado de 92 CGG/CCG en el que se puede observar al menos una primera interrupción en la posición 11 de las repeticiones, sin embargo no pudimos conocer si existían otras interrupciones entre los demás tripletes.

Se esquematizan a continuación los patrones de distribución de las interrupciones AGG (X) encontradas entre las repeticiones de tripletes CGG (O), en los alelos del locus FRAXA secuenciados. En los alelos premutados se representa el número total de tripletes y se indica con un guión hasta donde se pudo leer en las electroforesis.

ALELOS NORMALES:

12 TRIPLETES

000000000X00

29 TRIPLETES

000000000X000000000X000000000

29 TRIPLETES

000000000X000000000X000000000

30 TRIPLETES

000000000X000000000X000000000

**RESULTADOS**

---



Figura 41. Autorradiografía de la secuenciación de un alelo de 29 repeticiones CGG/CCG en el que se observan dos interrupciones periódicas (T) en la zona de tripletes (CCG).

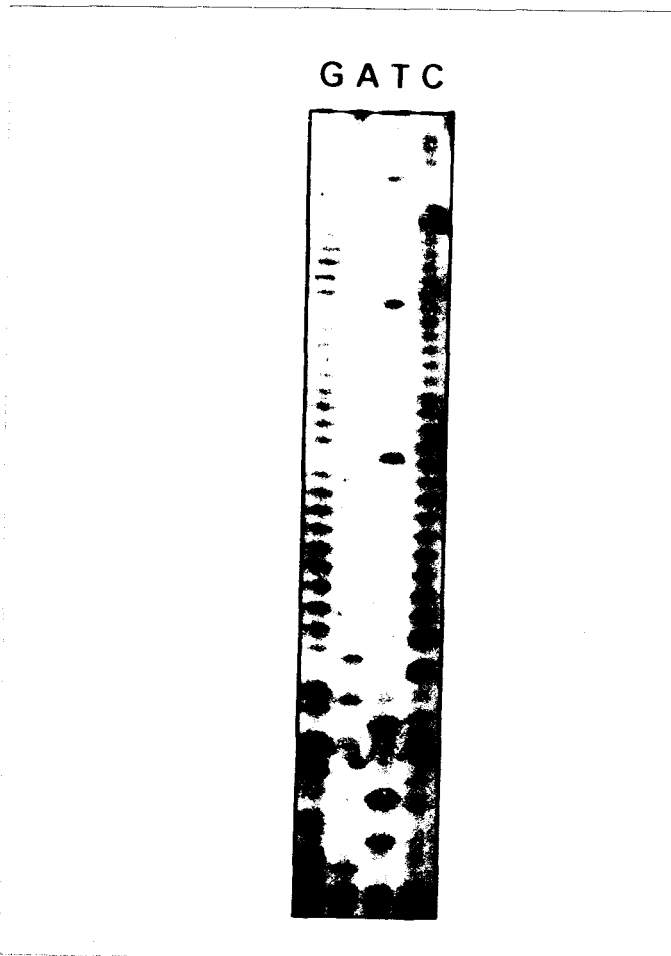


Figura 42. Autorradiografía de la secuenciación de un alelo normal de 35 repeticiones. Se observan tres interrupciones periódicas (T) a lo largo de las repeticiones (CCG).

**RESULTADOS**

---

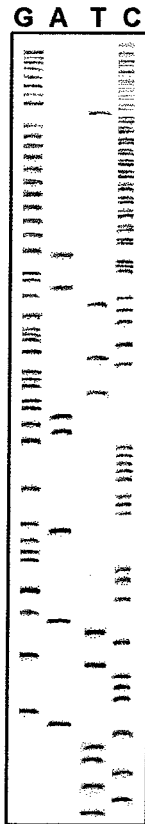


Figura 43. Autorradiografía de la secuenciación de un alelo premutado de 92 repeticiones. Se observa una primer interrupción (T) en la secuencia repetitiva (CCG).

35 TRIPLETES

0000000000X000000000X000000000X0000

ALELOS PREMUTADOS:

72 TRIPLETES

0000000000X0000000000X000000000-----  
-----

92 TRIPLETES

0000000000X0000-----  
-----

65 TRIPLETES

00000000000000000000-----

**2. SECUENCIACIÓN DE LA ZONA ADYACENTE A LOS TRIPLETES.**

La secuenciación de las zonas adyacentes a los tripletes CGG/GGC tenía por objeto establecer si existían diferencias individuales o poblacionales en la zona. En la figura 44A se muestra una autorradiografía de la secuenciación de la zona adyacente a las repeticiones CGG hacia el telómero y en la 44B la secuenciación de la zona hacia el centromero.

En los tres alelos distintos estudiados se observa que la secuencia se corresponde con la publicada anteriormente por Verker y col., (1991), lo que indica que no existe polimorfismo en la zona inmediatamente adyacente a la secuencia repetitiva CGG/GGC del gen FMR-1. En la figura 45 se muestra un esquema de la secuencia encontrada en este estudio (2) comparada con las publicadas por Verkerk y col., (1991) (3) y Kremer y col., (1991) (1).



**RESULTADOS**

---

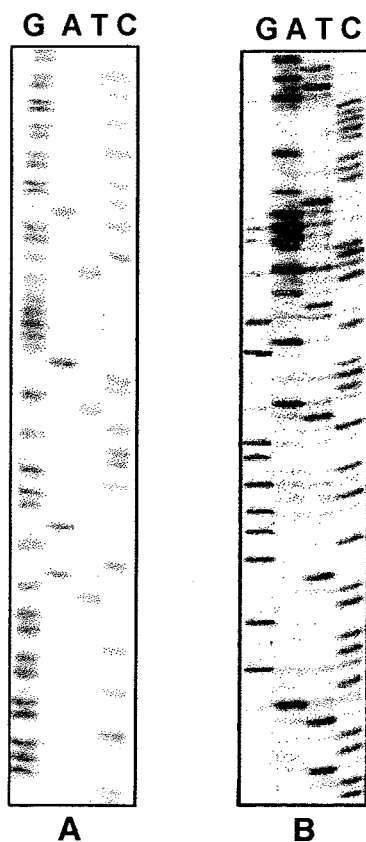


Figura 44. Autorradiografías de la secuenciación de las zonas adyacentes a las repeticiones de triplete del locus FRAXA. A: zonal proximal. B: zona distal.



## **RESULTADOS**

---

### **3. HOMOLOGÍA DEL LOCUS FRAXA ENTRE LA RATA Y EL HOMBRE.**

El gen FMR-1 es muy antiguo en la escala filogenética habiéndose descrito en *Caenorhabditis elegans* y *Xenopus Leavis* (Verkerk y col., 1991; Siomi y col., 1995). Los tripletes (CGG/GGC)<sub>n</sub> sólo aparecen en los mamíferos y tienen diferentes tamaños según la especie. Para conocer el grado de homología, entre la rata y el hombre, en la zona de las repeticiones del locus FRAXA, se secuenció ADNc de rata Wistar albina obtenido por RT-PCR en nuestro laboratorio. La figura 46 muestra uno de los alelos secuenciados en el que aparecen 4 repeticiones CGG seguidas. Se observa además que las secuencias adyacentes son homólogas a la humana, con pequeñas variaciones que no impiden la amplificación por PCR del locus, utilizando los mismos cebadores que en humanos. En la figura 47 se muestra un esquema de las secuencias obtenidas en la especie humana y en la murina estableciendo una homología de un 75% para las zonas adyacentes.

### **E) RELACIÓN GENOTIPO/FENOTIPO EN UNA FAMILIA X FRÁGIL**

En el presente trabajo sobre el síndrome X frágil en Andalucía se ha estudiado la relación entre genotipo y fenotipo, uno de los aspectos más controvertidos en esta enfermedad. El análisis se ha centrado en una familia X frágil (familia 1) en la que se ha podido correlacionar los datos moleculares (genotipo) con los datos morfológicos y psicológicos (fenotipo). Los resultados obtenidos muestran una gran variabilidad en el fenotipo propia de una mutación dinámica como la que aparece en este síndrome.

#### **1. ÁRBOL GENEALÓGICO.**

En la figura 48 se muestra el árbol genealógico de la familia 1 con los datos moleculares del estudio para cada individuo.

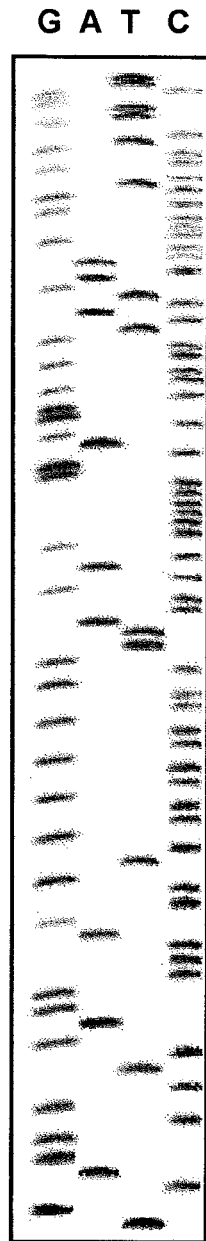


Figura 46. Autorradiografía de la secuenciación de la zona FRAXA en la rata, donde sólo se observan 4 repeticiones (CCG) seguidas en las posiciones 26-38 de la secuencia.

**RESULTADOS**

---

```
GCGCCCGCCACAGTCACTGCCGCCGCGGGCGACGGCCCCCGCACGCCATTGC RATA
::: :::          ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
GCG.CCGC.....CACTGCCGCCGCGGGCGACGGTCCCCCGCACGCC.TGGC HUMANO

.....[CCGCCGCCGCC]GCTGCCGACCCGGAGCTCGCGGACGT RATA
          ::::: ::::: ::::: :::::
[CGGnAGGCGGnAGGCGGn].....GACCC.GAGCTCGCGGGCGT HUMANO
```

**ZONA DE TRIPLETES**

Figura 47. Esquema de la secuencia determinada en la rata comparada con la secuencia en humanos. Las homologías se indican con dos puntos (:) y se subraya las zonas repetitivas.

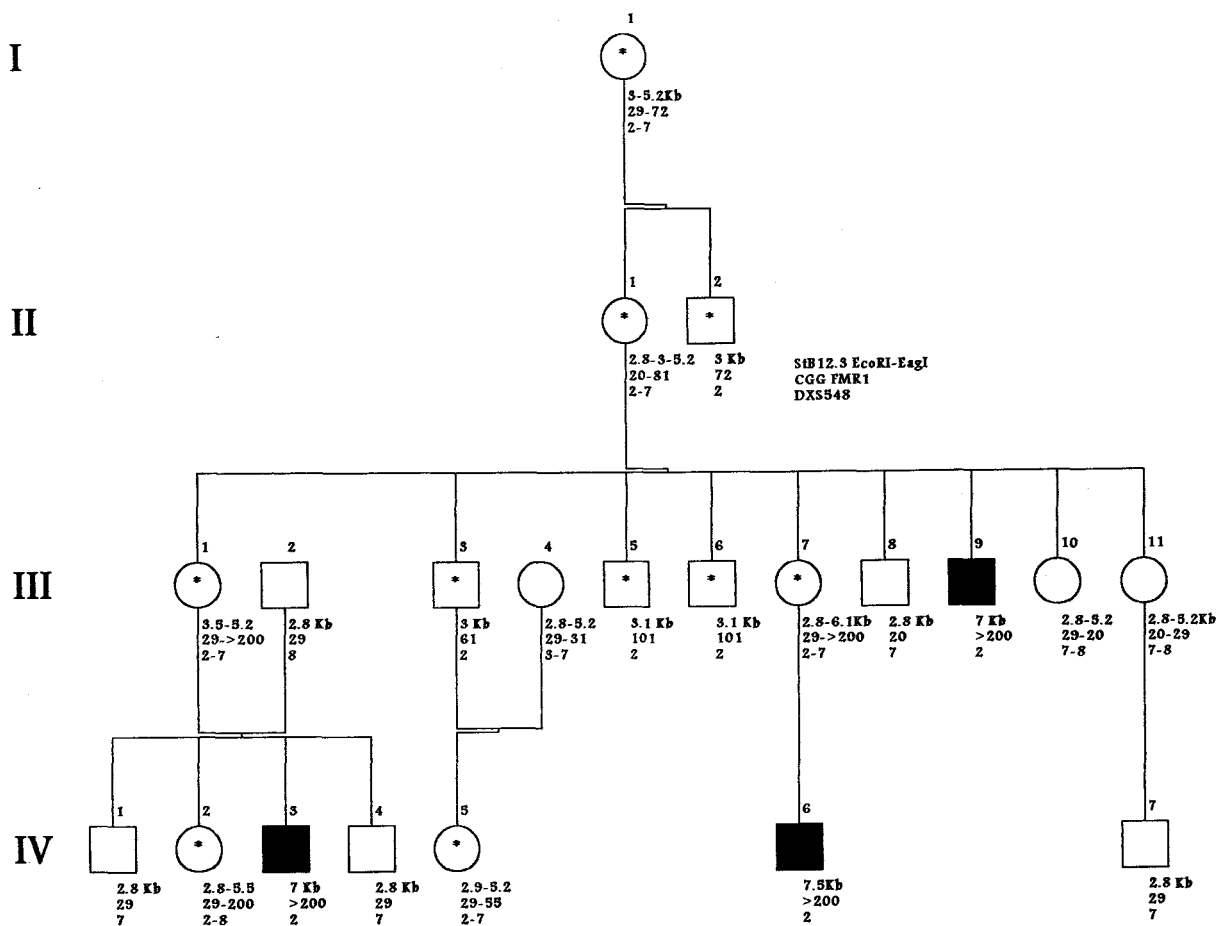


Figura 48. Árbol genealógico de la familia 1. Se indican para cada individuo los datos del estudio molecular.

## **RESULTADOS**

---

### **2. RESULTADOS DEL "SOUTHERN-BLOT".**

En la figura 49 se muestran los resultados de la hibridación con la sonda StB12.3 de una doble digestión con EcoRI y EagI. Puede observarse como en una misma generación aparecen fragmentos de restricción variables, así como patrones de metilación diferentes. Los carriles 1 (individuo III-7), 3 (individuo IV-2), 8 (individuo III-1), 12 (individuo II-1), 13 (individuo I-1) y 15 (individuo IV-5) corresponden a mujeres portadoras con incrementos de 900 pb, 800 pb, 700 pb, 250 pb, 200 pb y 60 pb respectivamente. Los carriles 9 (individuo III-10), 10 (individuo III-11) corresponden con mujeres normales. En los carriles 5 (individuo IV-1), 6 (individuo IV-4), 7 (individuo IV-7) y 17 (individuo III-8) pertenecen a varones normales. Los carriles 14 (individuo III-5), 16 (individuo III-3), 18 (individuo III-6) y 19 (individuo II-2) corresponden a varones portadores de incrementos 150 pb, 70 pb, 150 pb, y 100 pb respectivamente. Los carriles 2 (individuo IV-6), 4 (individuo IV-3) y 11 (individuo III-9) corresponden a individuos afectados del síndrome X frágil con mutaciones totales y fenotipos que incluyen retraso mental junto con otras muchas características típicas del síndrome. Aparece una mujer portadora III-7 con un cromosoma totalmente mutado (carril 1) intelectualmente por debajo de la media con un tamaño de la expansión de 900 pb y metilación completa del alelo.

### **3. RESULTADOS DE LA PCR.**

En la figura 50 se pueden observar los resultados de la PCR del locus FRAXA en la que se amplifican tamaños de hasta 101 repeticiones. En los casos de mutaciones los carriles aparecen libres (8:IV-3; 13:IV-6; 17:III-9). Se muestra en los carriles 4 (III-1), 5 (IV-2) y 6 (III-7) mujeres portadoras de alelos mutados que no se consiguen amplificar, pero si se amplifican los alelos normales de un tamaño de 309 pb. En

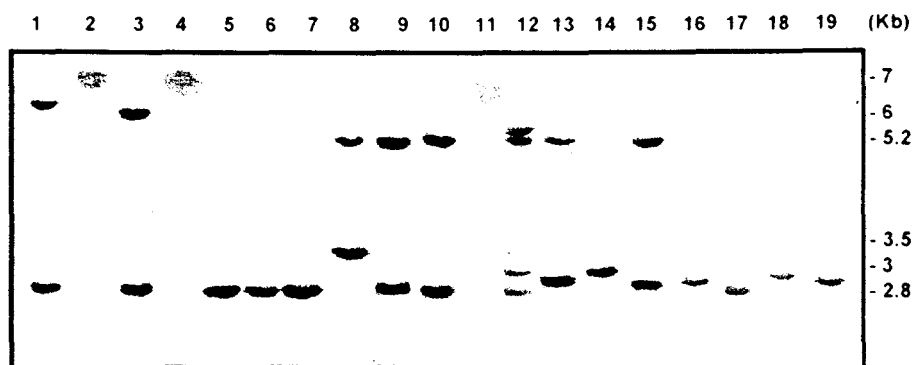


Figura 49. Autorradiografía de los resultados del "Southern-blot" de las muestras de la familia 1. En el texto se indica a que individuo corresponde cada muestra.



## RESULTADOS

---

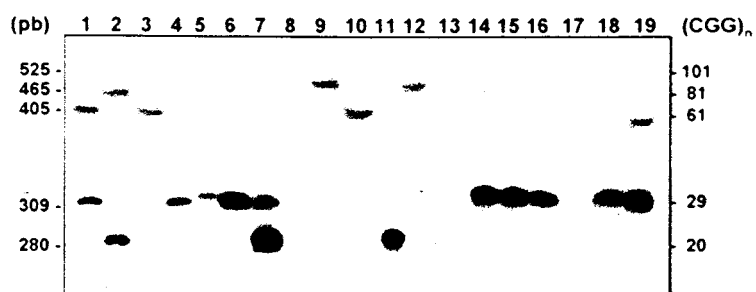


Figura 50. Autorradiografía de la PCR del locus FRAXA en la familia 1. En el texto se indica a que individuo corresponde cada muestra.

los carriles 11 (III-8), 14 (IV-I), 15 (IV-4), 16 (IV-7) y 18 (III-2) se muestran alelos normales pertenecientes a varones. En el carril 7 (III-10) aparece una mujer normal heterocigota. Mujeres portadoras de alelos premutados se muestran en los carriles 1 (I-1), 2 (II-1), y 19 (IV-5) en los que se pueden observar bandas de tamaño normal y bandas con pequeñas expansiones (entre 61 y 81 tripletes). Los varones portadores de premutaciones se muestran en los carriles 3 (II-2), 9 (III-5), 10 (III-3) y 12 (III-6) en los que se observa un sólo alelo con una pequeña expansión. Encontramos en esta familia dos pequeñas reducciones de tamaño en alelos premutados, en un caso a través de la madre al pasar el gen del individuo II-1 (81 CGG) al III-3 (61 CGG) y en otro caso a través del padre de III-3 (61 CGG) a IV-5 (55 CGG). También se encuentran expansiones pequeñas y grandes al pasar el alelo premutado a través de la mujer II-1 a sus hijos .

#### **4. DATOS FÍSICOS Y PSICOLÓGICOS.**

Para la determinación del fenotipo, se estudiaron los rasgos morfológicos y psicológicos más frecuentemente afectados en el síndrome X frágil. La tabla VIII muestra el genotipo de cada uno de los individuos estudiados junto con determinadas características de interés en este síndrome. Se observa como en la mayoría de los casos el fenotipo se corresponde con el genotipo. Sin embargo, los individuos III-5 y III-6 tienen una premutación del mismo tamaño ambos sin metilar y el individuo III-6 presenta algunas características propias del síndrome.

Los resultados del estudio psicológico se muestra en la tabla IX. Se observa que los datos del genotipo se corresponden con los datos sobre aprendizaje y habilidad manual para cada uno de los individuos estudiados, excepto para el individuo III-6 que tiene un coeficiente intelectual dentro del rango de la normalidad pero una habilidad manual claramente disminuida.

TABLA VIII. Genotipo y características físicas de la familia 1.

GENERACIÓN	I			II			III						IV				
INDIVIDUOS	1	1	2	1	3	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6
EDAD (años)	77	52	39	28	27	22	20	18	17	15	12	13	11	7	2	1	1
ADN (Δ kb)																	
Metilado	0	0&0.25	-	0	-	-	-	0.9	-	1.8	0	-	0.8	1.8	-	0	2
No metilado	0.2	0&0.25	0.2	0.7	0.15	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	-	0	0.1	-
Macrocefalia	No	No	No	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Frente amplia	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Cara alargada	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Orejas largas	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Epicanto	No	No	No	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Paladar hundido	No	No	No	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Macroorquidismo	-	-	No	-	No	No	No	-	No	<u>Si</u>	-	No	-	<u>Si</u>	No	-	No
Cresta plantar	No	No	No	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Hipotonía	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	No	No	<u>Si</u>
Alteraciones oral-motoras	No	No	No	No	No	No	<u>Si</u>	<u>Si</u>	No	<u>Si</u>	No	No	No	<u>Si</u>	No	-	-

TABLA IX. Resultados de los test psicológicos de la familia 1.

**Resultados en adultos**

\*\*\*\*\*

TEST	I-1	II-1	II-2	III-1	III-3	III-5	III-6	III-7	III-8	III-9
<b>WAIS-R</b>										
IQ verbal	72	79	101	91	106	89	83	65	93	48
IQ Manipulativo	74	78	112	87	110	103	93	80	108	41
IQ Escala total	70	76	109	87	108	94	85	69	102	39
<b>RAVEN (IQ)</b>	12	18	38	35	48	44	34	24	58	5
Percentil	25	25	50	25	75	50	25	5	95	<5
Rango	IV+	IV+	III-	IV+	II	III	IV+	V	I	V

**Resultados en niños**

\*\*\*\*\*

TEST	III-10	IV-1	IV-2	TEST	IV-3
<b>WISC-R</b>				<b>WIPPSI</b>	
IQ Verbal	88	112	94	IQ Verbal	46
IQ Manipulativo	59	92	75	IQ Manipulativo	45
IQ Escala total	71	103	83	IQ Escala total	<44
<b>RAVEN (IQ)</b>	37	32	27	<b>RAVEN COLOR (IQ)</b>	3
Percentil	50	50	50	Percentil	<5
Rango	III	III	III	Rango	V

Para los test WAIS-R, WISC-R y WIPPSI, la puntuación estandar según la edad se haya con una media de 100 y una desviación estandar de 15. Puntuaciones entre 85 y 115 están por lo tanto en un rango intermedio. De acuerdo con la escala para el test RAVEN y RAVEN color los valores de los percentiles corresponden con los siguientes rangos: I superior a la media, II+ y II sobre la media, III+, III y III- entre la media, IV+ y IV por debajo de la media, V retrasado.

## **RESULTADOS**

---

### **5. ESTUDIO EN TEJIDOS DE DISTINTO ORIGEN EMBRIONARIO.**

El estudio de la relación entre genotipo/fenotipo de una de las familias diagnosticadas del síndrome X frágil (familia 1), demostró la existencia de trastornos leves del aprendizaje y del comportamiento en un individuo portador de una premutación (III-6), de tamaño idéntico al de un hermano que no presentaba sintomatología (III-5, ver apartado anterior). Se acepta en la actualidad que la expansión de los tripletes CGG/CCG del locus FRAXA se produce en algún momento del desarrollo embrionario temprano (Devys y col., 1992). Nos propusimos estudiar si la diferencia en el fenotipo de los dos hermanos podría deberse a un posible mosaicismo entre diferentes tejidos. El número de tripletes en los órganos procedentes del ectodermo y por consiguiente en el sistema nervioso podría ser diferente al encontrado en sangre y esto pudiera explicar la expresión parcial del síndrome en el individuo III-6. Como referencia de las tres procedencias embriológicas se tomaron: las células blancas de la sangre como tejido mesodérmico (S), las células del bulbo piloso como tejido ectodérmico (P) y las células de la mucosa bucal como tejido endodérmico (M). La extracción del ADN y la PCR se realizaron como se ha explicado en "MATERIAL Y MÉTODOS". En la figura 51 se muestran los resultados de los individuos estudiados II-1 mujer portadora carril 2 (S, P, M), III-5 varón portador normal carril 1 (S, P, M), III-6 varón portador con expresión parcial del fenotipo del síndrome X frágil carril 3 (S, P, M) y IV-4 varón normal carril 4 (S, P, M).

En las muestras indicadas como 1 y 3 se amplifican fragmentos de 520 pb (101 CGG) pertenecientes a los individuos III-5 (1) y III-6 (3) de la familia 1 (ver Tabla VIII). El estado de metilación de la isla CpG, reguladora de la transcripción del gen, sólo pudo ser estudiado en células sanguíneas, debido a que la cantidad de ADN que se obtiene de

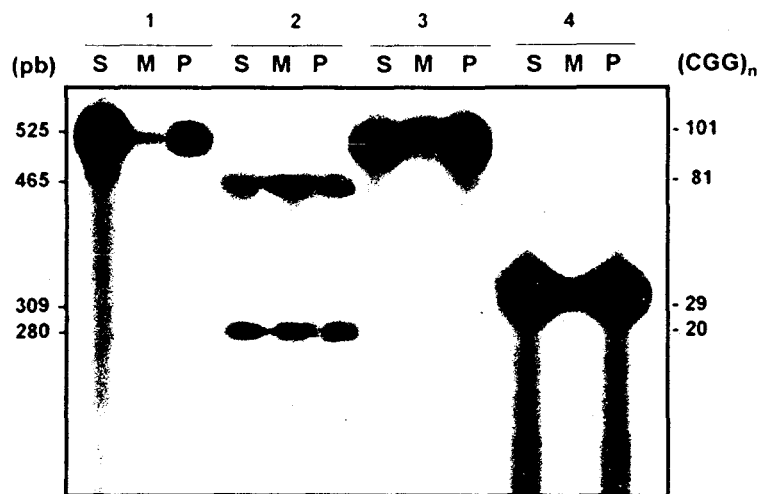


Figura 51. Autorradiografía de la PCR del locus FRAXA en muestras de distinto origen embrionario sangre (S), mucosa (M) y bulbo piloso (P). El estudio del mosaicismo se realizó en los individuos III-5 (1) y III-6 (3), siendo II-1 (2) y IV-4 (4) los controles.

## **RESULTADOS**

---

las células del bulbo piloso o de mucosa bucal, es insuficiente para poder realizar el "Southern-blot" y fue imposible realizar una biopsia epitalial, para obtener cantidad suficiente de células en cultivo que permitiesen extraer mayor cantidad de ADN. En células sanguíneas el alelo, en los dos individuos, estaba sin metilar como se había comprobado con anterioridad con la técnica de "Southern-blot".

### **F) ESTUDIO DEL POLIMORFISMO (CGG/CCG)<sub>n</sub> DEL LOCUS FRAXE.**

Para el estudio del síndrome X frágil en Andalucía nos enviaron pacientes con fragilidades citogenéticas en el extremo del brazo largo del cromosoma X que resultaron negativos para el locus FRAXA. En trabajos recientes (Knight y col., 1993; Hirst y col., 1993A) se han diferenciado dos nuevas fragilidades en la banda Xq28, cercana al gen FMR-1 que corresponden con expansiones de triplete CCG/CGG que se denominan FRAXE y FRAXF. La fragilidad en FRAXE se ha asociado a retraso mental hereditario por lo que se analizó también este locus en los individuos que presentaban fragilidad cromosómica. Los árboles genealógicos de las familias estudiadas se indican en la figura 52. También se analizaron algunos pacientes aislados cuyos datos individualizados se muestran a continuación. Se utilizó la técnica de "Southern blot" con las enzimas HindIII y SacII y la sonda OxE.20, que mapea en la zona de triplete del locus FRAXE, así como la amplificación de la zona de triplete por la técnica de PCR.

#### **1. DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS HindIII y SacII.**

Para el análisis de los polimorfismos de restricción del locus FRAXE, se empleó el enzima de restricción HindIII, una endonucleasa con una diana de corte ampliamente distribuida por el genoma humano y con dos dianas que engloban la zona FRAXE. En algunos casos se completo el estudio con la enzima sensible

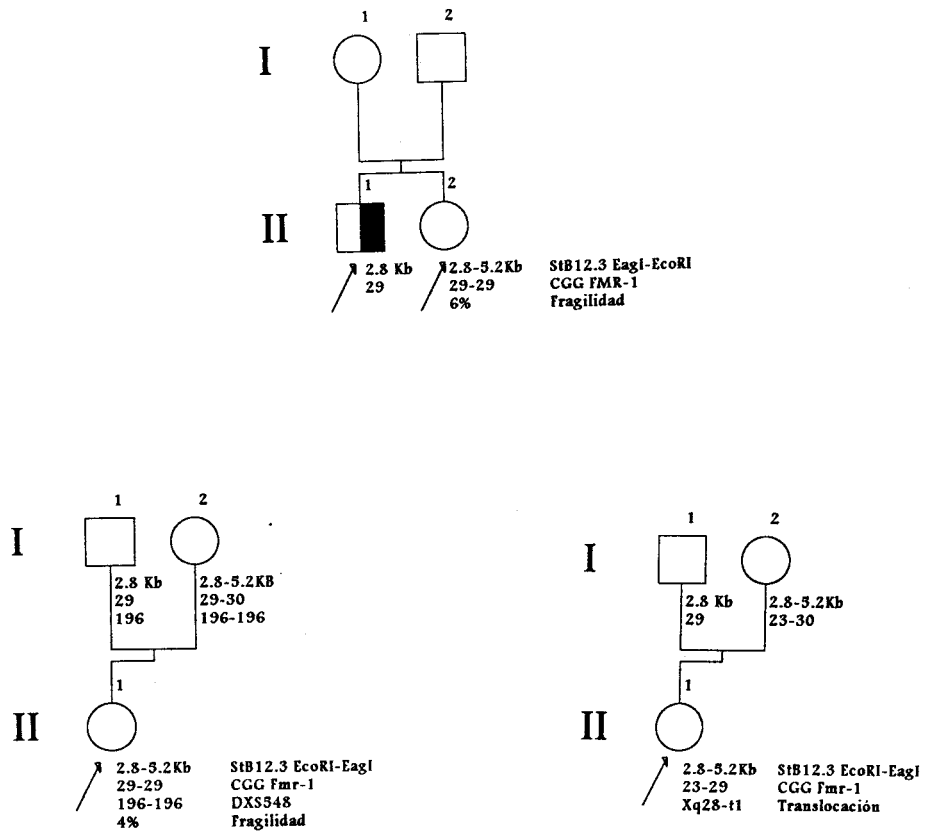


Figura 52. Árboles genealógicos y datos moleculares del locus FRAAXE de familias que presentaban fragilidad citogenética o una translocación en la zona Xq28 donde se sitúa la zona FRAAXE.



## **RESULTADOS**

---

a metilación SacII, que presenta una diana de corte en la isla CpG cercana a las zona de repeticiones CCG/CGG y que aparecerá hipermetilada en los alelos expandidos, por lo que la enzima no cortará. En la figura 53 se muestra un esquema de la zona FRAXE con las dianas de las endonucleasas y los fragmentos que se encuentran cuando se hibrida con la sonda OxE.20.

### *1.1 Hibridación con la sonda Ox.E20.*

En la digestión simple con HindIII, el patrón en los alelos normales será una banda de 5.2 Kb tanto en varones como en mujeres. En los alelos expandidos, por la inestabilidad de la zona las posibilidades son muchas, con bandas superiores a 5.3 Kb. En la digestión doble con HindIII y SacII el patrón diferencia el cromosoma X activo del inactivo (por hipermetilación) en mujeres, el patrón en los varones normales será una banda de 1.8 Kb, en las mujeres normales dos bandas una de 1.8 Kb (cromosoma activo) y otra de 5.2 Kb (cromosoma inactivo), en mujeres portadoras el patrón serán dos bandas una de ellas aumentada de tamaño por la expansión de los tripletes, pueden aparecer más bandas si en las células sanguíneas hay mosaicismo de metilación o tamaño para el alelo expandido.

En los varones FRAXE positivo el patrón será un fragmento mayor de 6.5 Kb que aparece metilado, y en las mujeres afectas el cromosoma normal estará activo o inactivo y en el otro cromosoma el alelo expandido está hipermetilado (por tanto inactivo también), aparecerán distintos fragmentos, uno de 1,8 Kb y/o 5.2 Kb y otro por encima de 6 Kb. En la figura 54 se muestra un ejemplo de hibridación con la sonda OxE.20, de una doble digestión, en la que los patrones son normales.

### *1.2 Resultados individualizados.*

Los resultados obtenidos con esta técnica en las muestras

LOCUS FRAXE Xq28

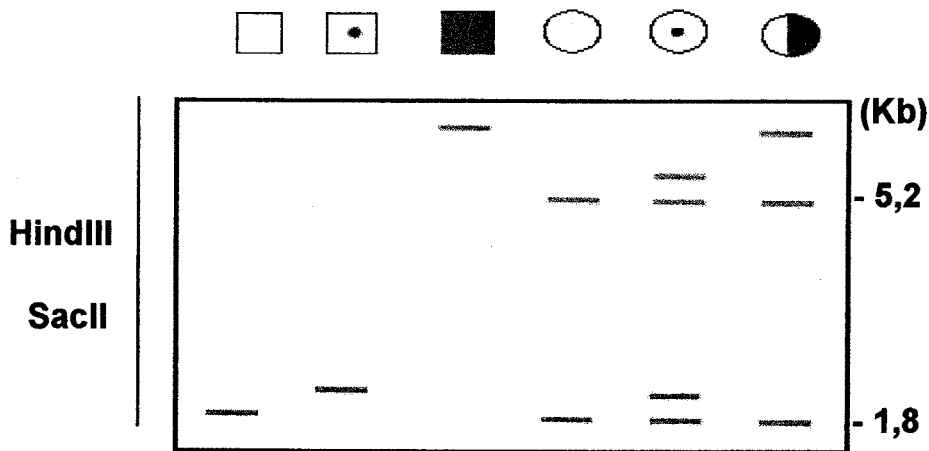
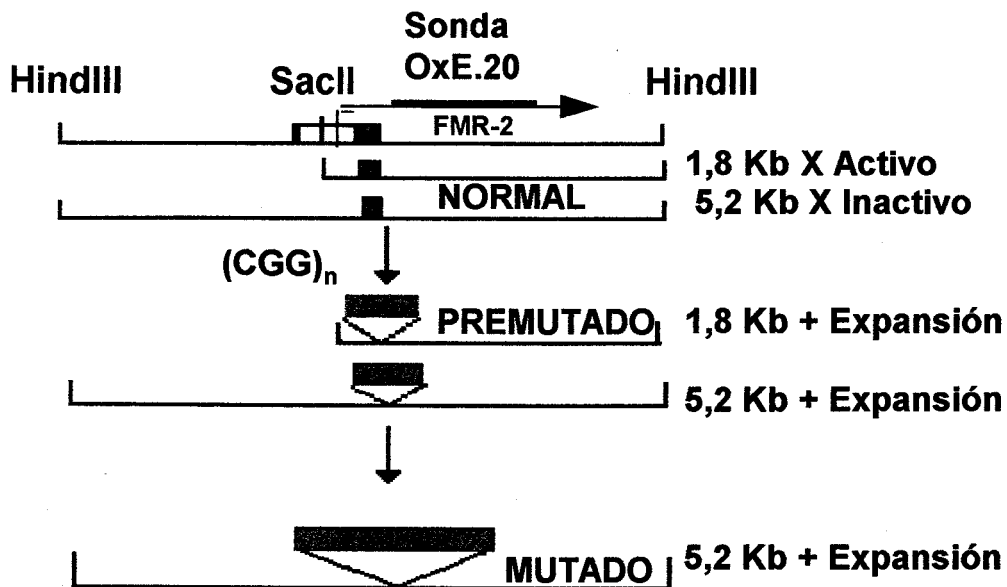


Figura 53. En la parte superior se muestra un esquema de la zona FRAXE donde se indica los lugares de restricción de las enzimas utilizadas y la zona de hibridación de la sonda OxE.20. En la parte inferior se muestra los distintos patrones que se pueden encontrar en un "Southern-blot" con las enzimas y la sonda indicadas.

## RESULTADOS

---

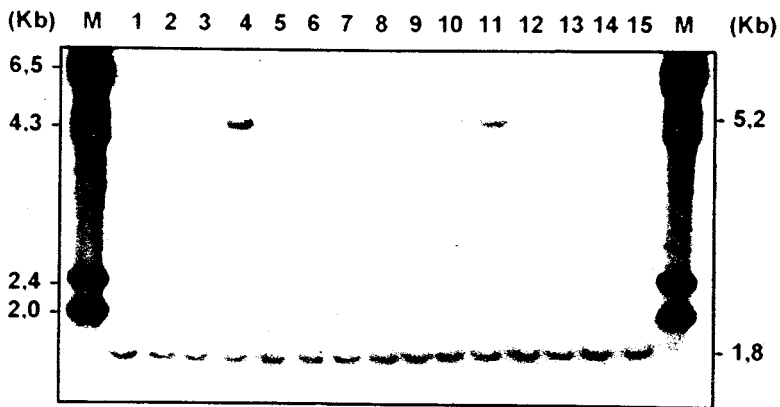


Figura 54. Autorradiografía del "Southern-blot" del locus FRAXE con las enzimas HindIII/SacII y la sonda Ox.E20. En el primer carril y en el último se encuentra el marcador de tamaños  $\lambda$ -HindIII. Los individuos que corresponden a los distintos carriles se especifican en el texto.

estudiadas nos indican que no existe expansión de la zona de tripletes en ninguna de ellas. Los resultados para cada muestra se indican a continuación:

MUESTRAS	SEXO	TIPO	TAMAÑOS	DIGESTIÓN
16.8	♂	RM	1.8 Kb	HindIII-SacII
10.6	♂	RM	"	"
22.4	♂	"	"	"
24.4	♂	"	"	"
27.3	♀	"	1.8-5.2 Kb	"
27.6	♂	"	1.8 Kb	"
28.6	♂	"	"	"
28.10	♂	"	"	"
29.7	♂	"	"	"
29.9	♀	"	1.8-5.2 Kb	"
30.2	♂	"	1.8 Kb	"
31.5	♂	RM	"	"
32.3	♂	"	"	"
4.8	♂	"	5.2 Kb	HindIII
26.3	♂	"	"	"
28.6	♂	"	"	"
29.7	♂	"	"	"
29.9	♀	"	"	"
27.3	♀	"	"	"

**2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE TRIPLETES DEL LOCUS FRAXE.**

El número de tripletes CCG/CGG del locus FRAXE se estudiaron por PCR (ver MATERIAL Y METODOS). Los alelos normales tienen de 6 a 39 repeticiones (Knight et al., 1993). Con los cebadores empleados en nuestro estudio aparecen como bandas de entre 309 y 419 pb. No se han observado alelos con pequeñas amplificaciones y los alelos expandidos no se suelen amplificar como ocurre con los alelos expandidos del locus FRAXA. En la figura 55 se puede observar un ejemplo de amplificación por PCR de alelos en el rango normal con un

**RESULTADOS**

---

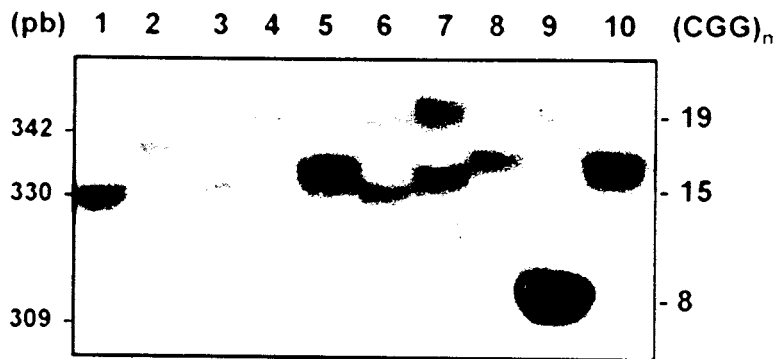


Figura 55. Autorradiografía de una PCR del locus FRAAXE en muestras normales, donde se puede observar el polimorfismo de tamaño que está determinado por el diferente número de tripletes en cada alelo amplificado.

polimorfismo muy claro en el numero de triplete. Aquellos alelos que no se consiguen amplificar por PCR, se estudian con la técnica de análisis de los polimorfismos de restricción por hibridación, con la sonda OxE.20.

*2.1 Resultados individualizados.*

Los resultados para cada muestra analizada se indican a continuación:

MUESTRAS	FENOTIPO	TAMAÑOS	MUESTRAS	FENOTIPO	TAMAÑOS
2.1	♀ RM	16-16	FQ1	♀	18-19
2.2	♀ "	17-18	FQ2	♀	18-18
2.3	♂ "	8	6.1	♀	16-16
2.4	♂ "	19	6.2	♂ RM	16
2.5	♀ "	18-18	6.3	♀	16-18
2.6	♀ "	17-19	6.4	♂	16
2.7	♀ "	18-20	6.7	♂	15
2.8	♂ "	19	6.8	♀	16-18
2.9	♀ "	11-20	6.9	♀ "	15-18
2.10	♂ "	18	7.1	♂ RM	21
3.2	♂ "	16	7.2	♂ RM	20
3.3	♂ "	15	7.5	♂ "	20
3.7	♀ "	15-16	7.6	♂ "	20
3.8	♂ "	15	8.10	♂ "	21
3.10	♀ "	15-16	9.1	♀	21-21
4.6	♀	14-15	9.2	♂ RM	21
4.8	♂ RM	14	9.3	♀	21-21
5.1	♀	15-16	9.4	♂	21
5.2	♀	16-17	9.5	♂	21
5.3	♀	20-20	9.6	♀	23-23
5.4	♂ RM	20	9.7	♂	19
5.5	♂ "	20	9.8	♂	19
5.6	♀	20-20	10.1	♀ RM	21-22
5.7	♀	16-20	10.2	♀ "	22-22
5.8	♀	16-20	10.3	♀	21-22
5.9	♂	17	10.4	♀	22-25
5.10	♂ RM	15	10.5	♀	21-25

## RESULTADOS

---

MUESTRAS	FENOTIPO	TAMAÑOS	MUESTRAS	FENOTIPO	TAMAÑOS
10.6	♂	23	24.3	♂	19
10.16	♂	19	26.1	♂ RM	20
12.7	♂	20	26.2	♂ RM	18
12.8	♀	16-16	26.3	♂ "	26
12.9	♀	25-25	26.4	♂ "	18
12.11	♂	21	26.5	♂ "	19
15.10	♂ RM	15	26.6	♂ "	20
23.7	♂	19	26.7	♂ "	17
23.8	♀	19-21			
23.9	♀	19-21			
23.10	♂(XXY) RM	20-25			

### 3. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL POLIMORFISMO (CCG/CGG)<sub>n</sub> DEL LOCUS FRAXE.

En la población estudiada, que ha correspondido a 73 muestras totales, todos los alelos estaban dentro del rango normal. El tamaño de los triplete (CCG/CGG)<sub>n</sub> han oscilado de 8 a 23, con una frecuencia máxima de los alelos con 16 y 20 triplete. En la figura 56 se muestra un diagrama de barras con los alelos encontrados para el polimorfismo de triplete (CCG/CGG)<sub>n</sub> del locus FRAXE y los valores absolutos de cada alelo.

### G) DATOS GLOBALES DEL PRESENTE ESTUDIO.

Se muestra a continuación un resumen de los resultados obtenidos en este estudio, que se han usado para calcular la prevalencia del síndrome X frágil en la población con retraso mental de causa desconocida, que representa el 63% del total de los tipos de retrasos conocidos.

#### 1. NÚMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR PROVINCIAS.

Se han estudiado un total de 357 muestras con la siguiente

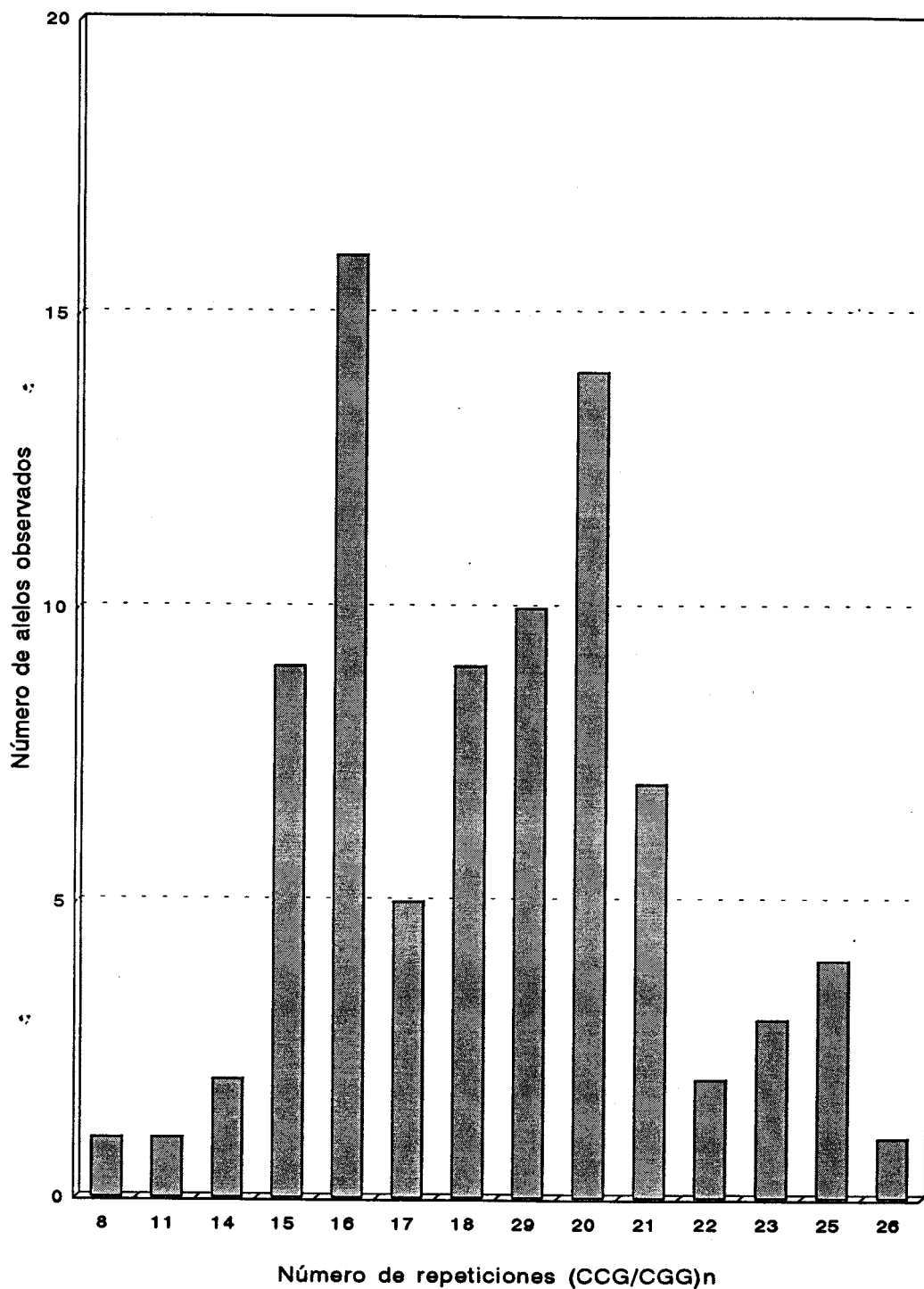


Figura 56. Diagrama de barras donde se representan los valores absolutos de los distintos alelos FRAXE encontrados en una población de 83 cromosomas X no relacionados.



## **RESULTADOS**

---

distribución por provincias: 29 de Cádiz, 5 de Córdoba, 1 de Granada, 145 de Huelva, 96 de Jaen, 6 de Málaga y 75 de Sevilla (ver tabla X). De las 357 muestras totales 186 pertenecían a individuos no relacionados y 171 a otros miembros de las 37 familias analizadas. Se han estudiado 214 individuos con retraso mental de causa desconocida de los que 180 eran varones y 34 mujeres. También se han analizado 143 muestras de individuos que no presentaban retraso mental de los que 96 eran mujeres y 47 varones.

### **2. PREVALENCIA DEL SÍNDROME X FRÁGIL.**

Tomando la subpoblación de individuos con retraso mental de causa desconocida y no relacionados con un total de 186 (63 de ellos estaban en instituciones de educación especial), se ha calculado la prevalencia del síndrome X frágil en la población retrasada mental de etiología desconocida. Como se muestra en la tabla XI de 186 individuos se diagnosticaron 21 X frágiles lo que nos da una prevalencia del 11,2%. Si se realiza el cálculo en la subpoblación de individuos institucionalizados la prevalencia es del 6,3%, un valor mucho menor.

El número de individuos afectados del síndrome X frágil en la población estudiada es de 28 varones, en los que encontramos un tamaño de repeticiones CGG/CCG, en el rango de la mutación total, metilado o mosaico (tamaños premutados no metilado y mutados metilados), también se han encontrado tres individuos que mostraban rasgos característicos del síndrome como el retraso mental o rasgos dismórficos, pero que en los estudios en células sanguíneas portaban premutaciones y un individuo que siendo portador de una premutación (miembro de una familia X frágil con un hermano y sobrinos con el síndrome) que sólo mostraba ciertos trastornos leves que se ha indicado como fenotipo parcial. Dentro de las mujeres estudiadas que presentaban retraso mental, 4 mostraban expansiones en el

TABLA X: Muestras del estudio del síndrome X frágil en Andalucía

CADIZ		CORDOBA		GRANADA		HUELVA		JAEN		MALAGA		SEVILLA	
29		5		1		145		96		6		75	
24	5	3	2	-	1	80	65	70	26	3	3	47	28
21	1	3	-	-	-	52	11	58	6	1	-	45	16
6	1	1	-	-	-	7	2	12	1	-	-	2	-

Número de muestras 357 (140 mujeres y 227 varones).

Número de individuos con retraso mental 214 (34 mujeres y 180 varones).

\* V=Varón, M=Mujer, RM=retraso mental, FRAX=X frágil.

**RESULTADOS**

TABLA XI: Subgrupos establecidos en la población andaluza estudiada.

Sexo	Sin Retraso Mental	Con Retraso Mental	Retraso Mental X frágil
Varón (♂)	47	180	28
Mujer (♀)	96	34	4
TOTAL	143	214	32

	Retrasados sin parentesco	X frágiles sin parentesco	Retrasados en centros E.especial	X frágiles en centros E.especial
Varón (♂)	157	19 (12,1%)	48	3 (6,25%)
Mujer (♀)	29	2 (6,7%)	15	1 (6,6%)
TOTAL	186	21 (11,2%)	63	4 (6,3%)

rango de mutación total en los CGG/CCG del gen FMR1, por lo que padecían el síndrome X frágil.

**3. PORTADORES EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA.**

Hemos considerado como individuos portadores a aquellas personas que no sufren retraso mental pero que tienen una premutación en el caso de los varones y una premutación o mutación completa en uno de los dos cromosomas X en las mujeres.

Se han diagnosticado 26 mujeres portadoras de alelos premutados o totalmente mutados, que no presentaban retraso mental, familiares de varones X frágiles. No se ha realizado un estudio sistemático para descartar la presencia de manifestaciones leves del síndrome como labilidad psicológica o tendencia a la depresión, características descritas en algunos estudios realizados sobre mujeres portadoras, estudio que será objeto de otra tesis ya iniciada. Respecto a los varones hemos diagnosticado 6 varones con expansiones dentro del rango de la premutación y que no sufrían retraso mental, son los llamados en la literatura "varones normales transmisores", aunque pueden manifestar fenotipos parciales.

En este estudio las expansiones en el rango de la premutación (52-200 CGG/CCG), presentan tamaños muy variados, ejemplo de mutación dinámica por inestabilidad de la zona de repeticiones. Se han detectado 14 alelos premutados no relacionados que se indican a continuación:

1=109 Tripletas	8=123 Tripletas
2=110 "	9= 76 "
3=81 "	10=160 "
4=120 "	11=100 "
5=92 "	12= 52 "
6=96 "	13=133 "
7=180 "	14=105 "

## **RESULTADOS**

---

También se han encontrado otros tamaños de alelos premutados, al pasar alguno de los anteriores a la siguiente generación familiar.

### *3.1 Varones con premutación y retraso mental profundo.*

En nuestro estudio hemos encontrado 3 varones con una premutación y con retraso mental profundo. Dos de ellos eran hermanos y tenían una premutación correspondiente a 65 triplete CGG/CCG no metilada (individuos 22-9 y 22-10 respectivamente), sin embargo un tercer hermano también retrasado tenía un alelo normal de 31 repeticiones (individuo 22-11). Otro caso correspondía a un varón con retraso mental profundo, institucionalizado y con el fenotipo típico de X frágil que tenía una premutación no metilada de 100 triplete (individuo 1.1).

## **4. FAMILIAS ESTUDIADAS.**

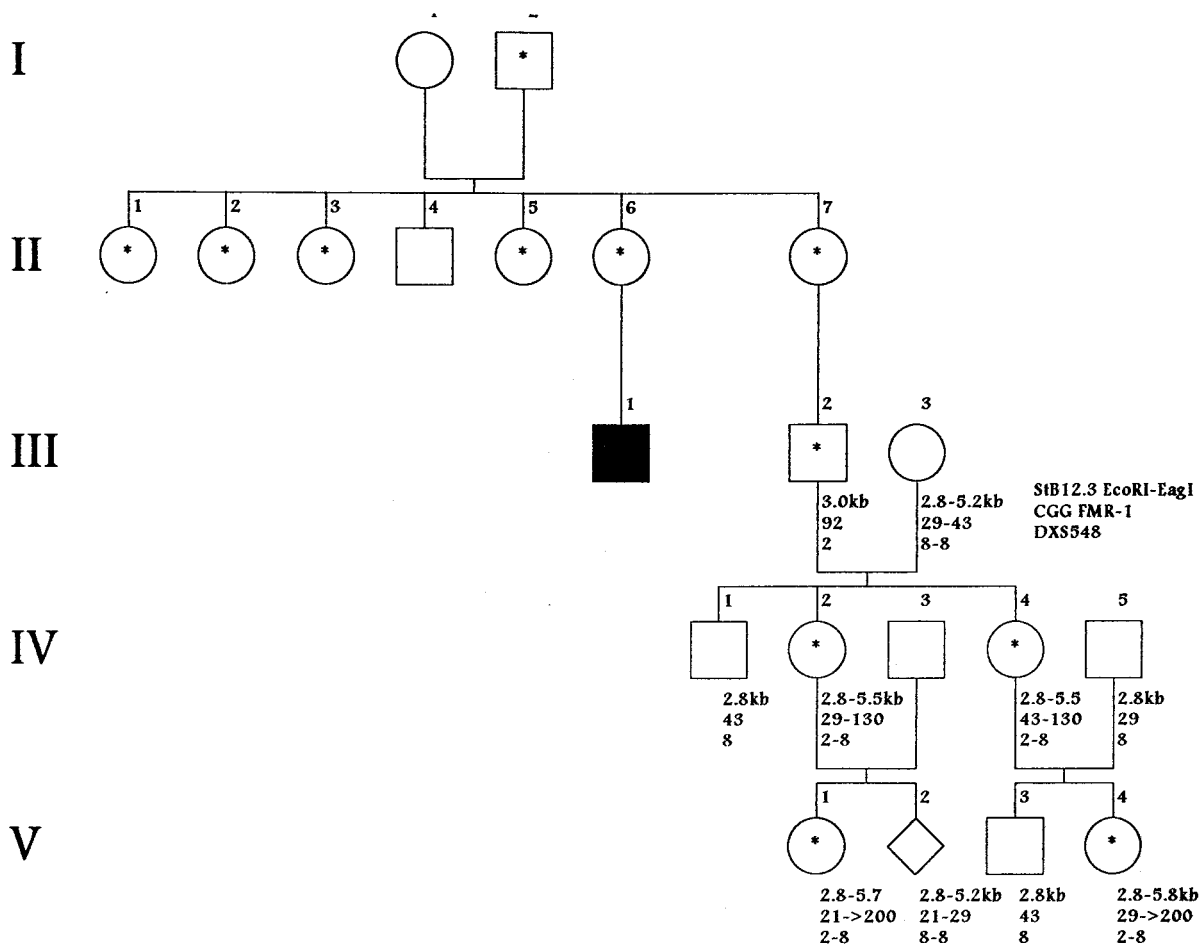
Se han estudiado 37 familias que correspondían a individuos con retraso mental y antecedentes familiares y/o a individuos diagnosticados como síndrome X frágil.

### *4.1 Familias X frágil. Árboles genealógicos y datos moleculares.*

De las 37 familias analizadas, 16 han resultado ser X frágiles lo que corresponde a un 43%. Además de la familia 1 expuesta en el apartado F de "RESULTADOS" se muestran los árboles genealógicos de las demás familias X frágiles, incluyendo los datos moleculares de los individuos estudiados. En las familias pueden seguirse las expansiones o retracciones que sufre la zona de los CGG/CCG en estos alelos inestables.

Familia 2. Se analizan, en este estudio, tres generaciones

Familia 2.



## **RESULTADOS**

---

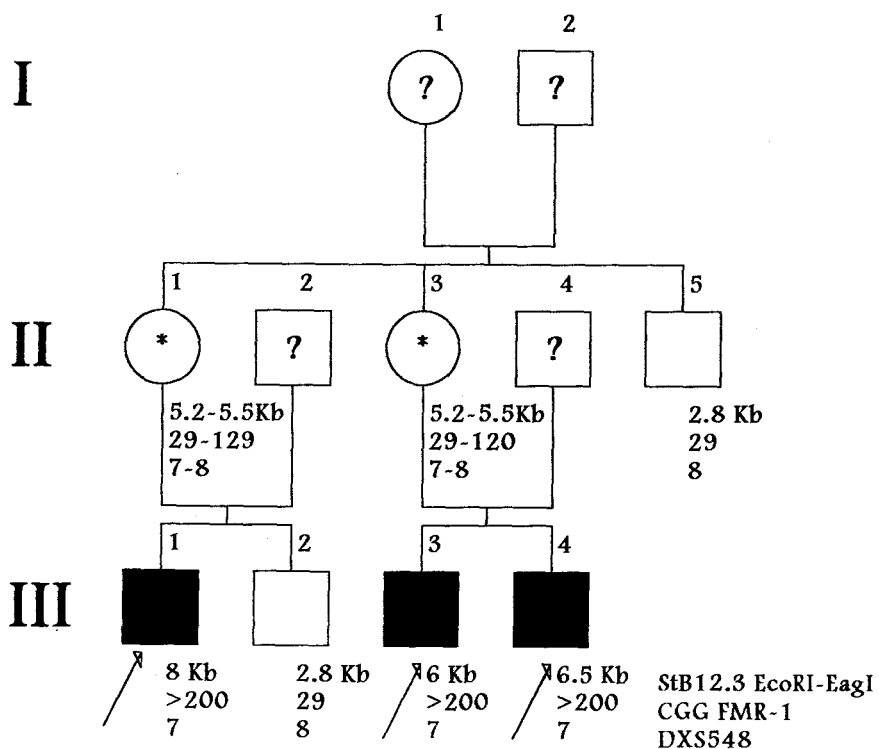
de una rama de un árbol genealógico mucho más amplio, (el carecter de portador y afecto, de otros individuos no estudiados ahora, se había establecido con anterioridad en otro laboratorio). En esta familia se realizó el diagnóstico prenatal expuesto en el apartado D de "RESULTADOS". Entre los individuos estudiados aparecen portadores de alelos premutados y mutados, un individuo afecto del síndrome aparecía como antecedente materno del abuelo III-2). También aparece un alelo normal de los clasificados como grandes con 43 triplete, pero que como se observa en el árbol genealógico, se hereda de forma estable sin que sufra expansiones. Se muestra en esta familia que el alelo mutado se hereda ligado al alelo 2 del polimorfismo DXS548 que es poco frecuente en la población normal.

Familia 3. En esta familia, se han diagnosticado tres varones afectados del síndrome X frágil y dos mujeres portadoras, madres de los individuos afectados, no se pudo estudiar la primera generación, por lo que no se puede indicar en que rama familiar se encuentra el alelo mutado. Como se observa en los tres individuos afectados III-1, III-3 y III-4 el alelo mutado se ha heredado ligado al alelo 7 del polimorfismo DXS548 que es el más frecuente en la población no X frágil.

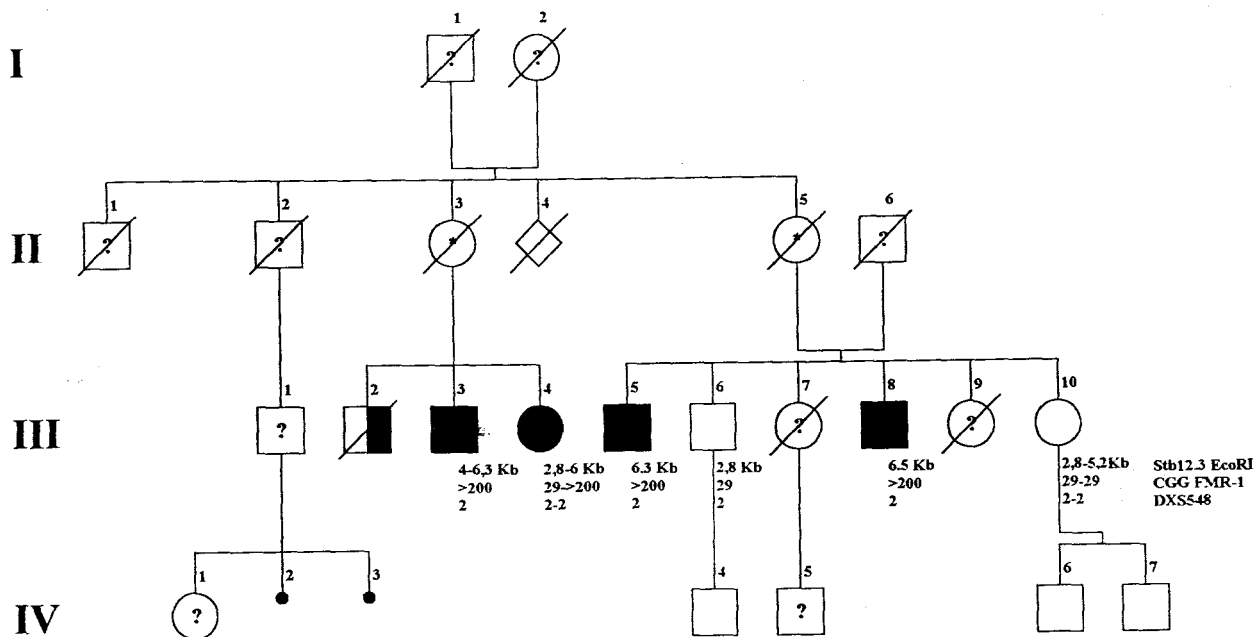
Familia 4. Se han diagnosticado en esta familia, cuatro individuos afectados del síndrome X frágil, 1 mujer y 3 varones con un retraso mental profundo, el estado de portadoras en las madres de estos individuos no se pudo establecer pero son portadoras obligadas. El resto de los familiares analizados resultaron normales para el tamaño de las repeticiones del locus FRAXA o no han podido ser analizados. En esta familia el alelo mutado se hereda ligado al alelo 2 del polimorfismo DXS548.

Familia 5. En esta familia, sólo se han podido estudiar

Familia 3.



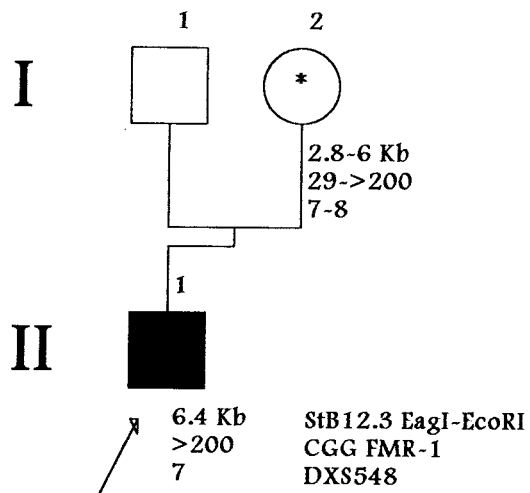
Familia 4.



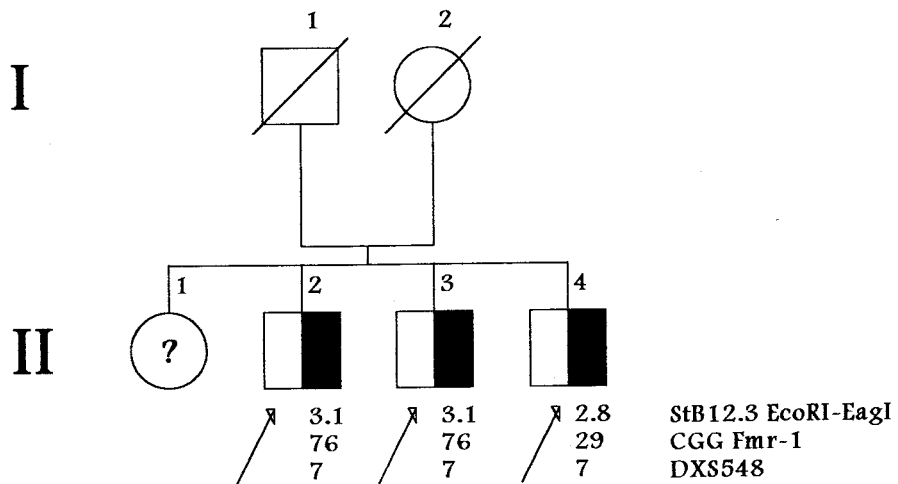


**RESULTADOS**

Familia 5.



Familia 6.



dos individuos un varón afecto del síndrome y su madre portadora, no se tienen datos acerca de otros miembros con retraso mental. Se observa ligamiento entre el alelo mutado y el alelo 7 del polimorfismo DXS548.

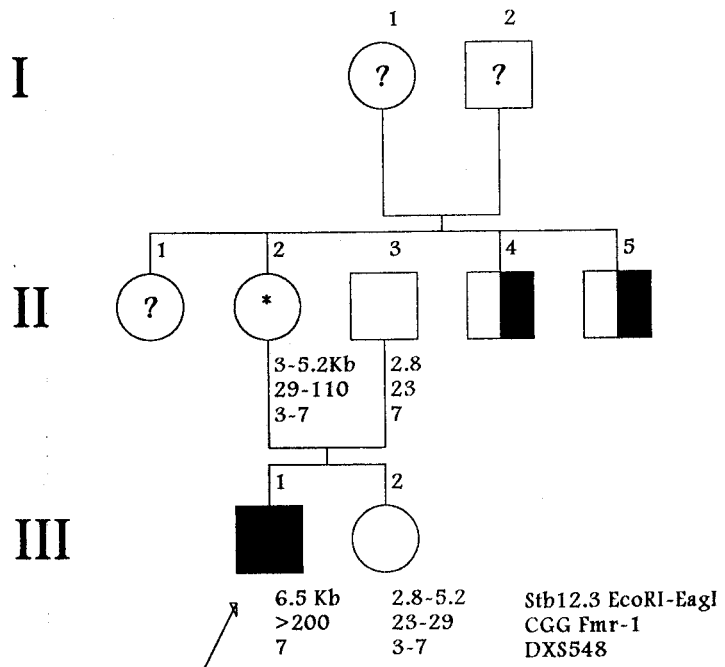
Familia 6. Esta familia se remite al estudio al encontrarse tres hermanos con retraso mental de una mujer normal que quiere tener descendencia, en los análisis del locus FRAXA, dos hermanos presentan una premutación (76 CGG/CCG) no metilada, y el otro un tamaño totalmente normal (29 CGG/CCG), estos resultados se confirman por otro laboratorio independiente, tamaños de expansiones en el rango de premutación pequeña no parece que determine un fenotipo de retraso mental profundo, otros rasgos, característicos del síndrome, no aparecen muy claros, por lo que en esta familia no podemos indicar que el retraso mental se deba exclusivamente al síndrome X frágil, pudiendo existir otra causa que determina el retraso mental en los tres hermanos o un mosaicismo de tejido que no detectamos al analizar células sanguíneas. El alelo premutado está ligado en esta familia al alelo 7 del polimorfismo DXS548.

Familia 7. Se han estudiado, en esta familia, dos generaciones. Se conocían antecedentes maternos de retraso mental y el diagnóstico del síndrome X frágil demuestra que el retraso se debe a la expansión de los tripletes del gen FMR1, que aparecen en el rango de la premutación en la madre portadora y totalmente mutados en su hijo retrasado mental profundo. En esta familia el alelo mutado está ligado al alelo 7 del locus DXS548.

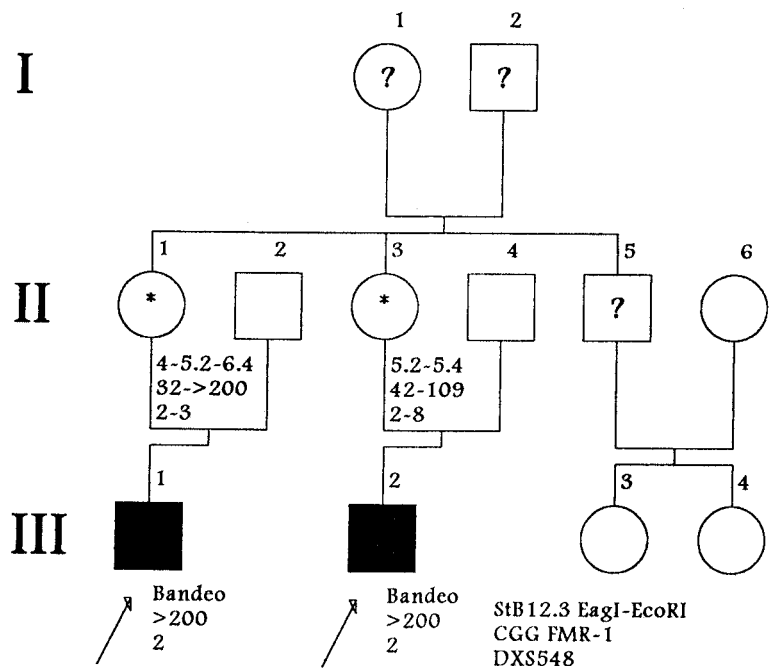
Familia 8. En la familia estudiada se han diagnosticado dos varones afectados del síndrome X frágil y dos mujeres portadoras madres de los afectados, no se ha podido analizar a los demás miembros de la familia. La mujer portadora II-1 muestra mosaicismo de metilación en el alelo mutado y su

**RESULTADOS**

Familia 7.



Familia 8.



hermana II-2 muestra una premutación con una pequeña expansión de 109 triplete, mientras que en los dos individuos afectados se observa mosaicismo de tamaño en alelos mutados. Se observa un ligamiento de la mutación con el alelo 2 del polimorfismo DXS548.

Familia 9. Esta familia se caracteriza por presentar mosaicismo de tamaño en la madre portadora, el hijo afecto de retraso mental por el síndrome X frágil y en la hija portadora (ver figura 30, sección 5 del apartado A), habían aparecido antecedentes maternos de retraso pero el resto de la familia no se prestó al estudio. Se observa ligamiento del alelo mutado con el alelo 6 del locus DXS548.

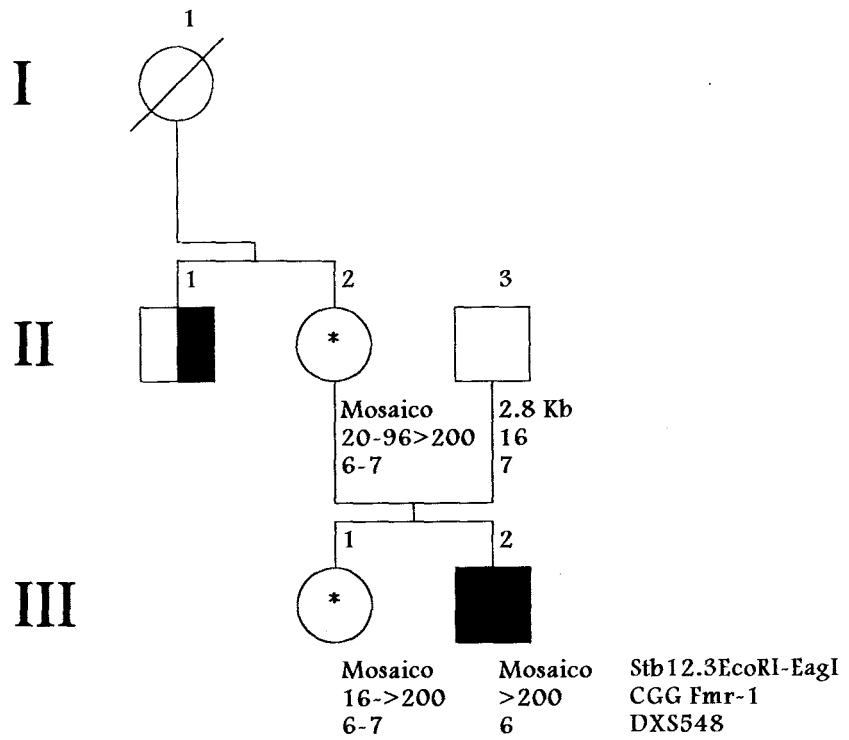
Familia 10. En esta familia se han diagnosticado un varón afecto del síndrome X frágil por expansión de los triplete del gen FMR1 y su madre portadora, los demás individuos retrasados están pendientes de su estudio molecular. El alelo mutado aparece ligado al alelo 6 del polimorfismo DXS548.

Familia 11. Esta familia empieza a estudiarse por un varón que padece retraso mental y que expresa fragilidad en el final del brazo largo del cromosoma X. Por análisis del ADN se detecta expansión en los triplete del gen FMR-1 tanto en el individuo afectado como en su madre y hermana, pero como dato curioso en el individuo retrasado se observa mosaicismo con bandas en rango normal y premutado que no deberían determinar un retraso profundo, aunque no se puede descartar un mosaicismo de tejido donde un porcentaje de las células presenten una expansión mayor, que determinaría la aparición de la fragilidad y el retraso.

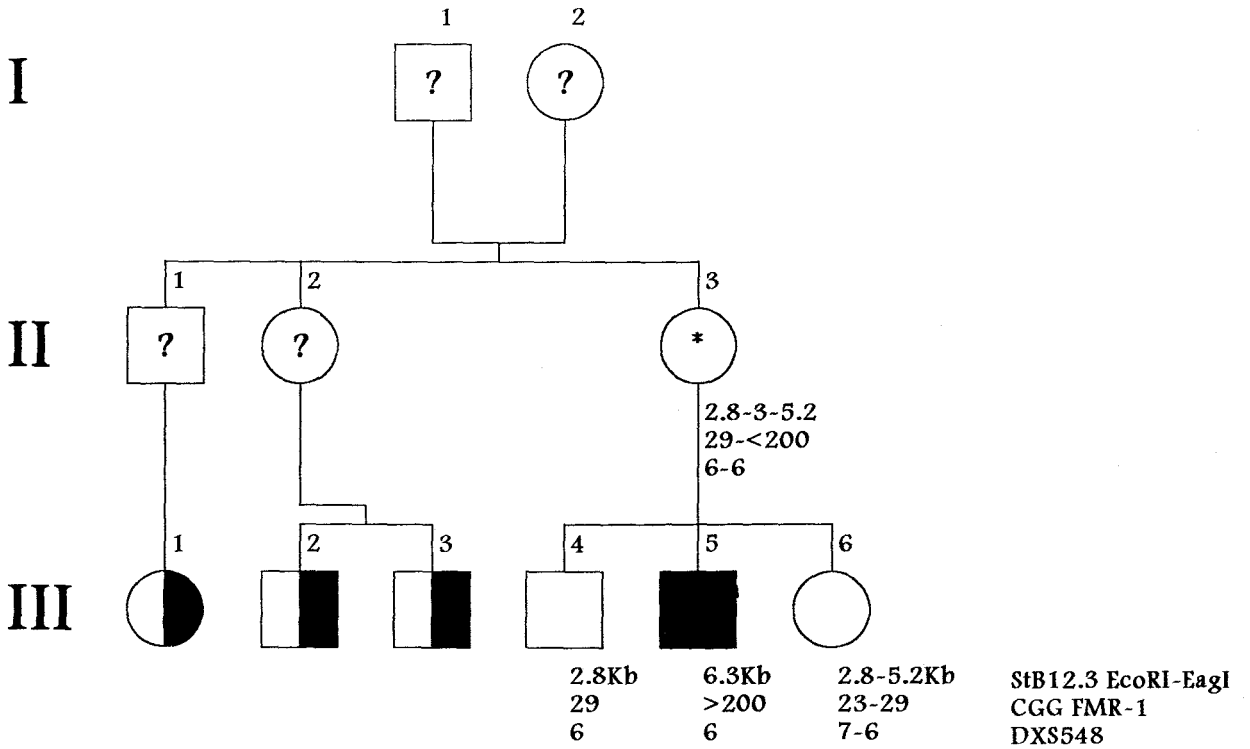
Familia 12. En este estudio se analizan las muestras de un varón con retraso mental, de sus padres y su hermana, se encontró que el retraso se debía a la expansión de los

**RESULTADOS**

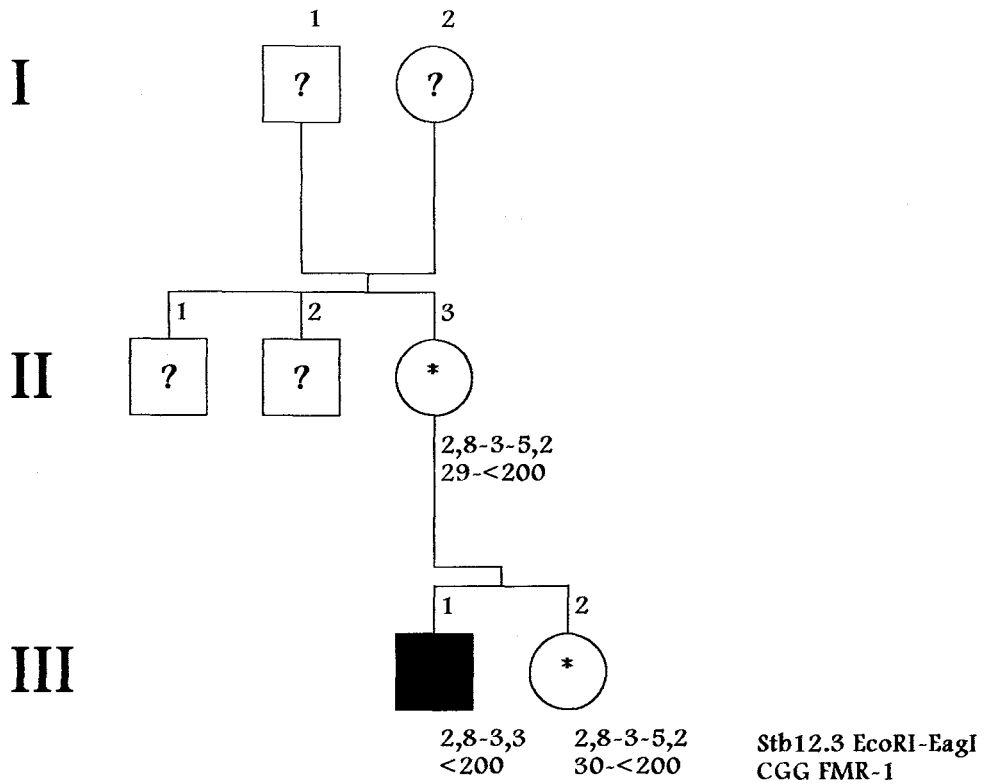
Familia 9.



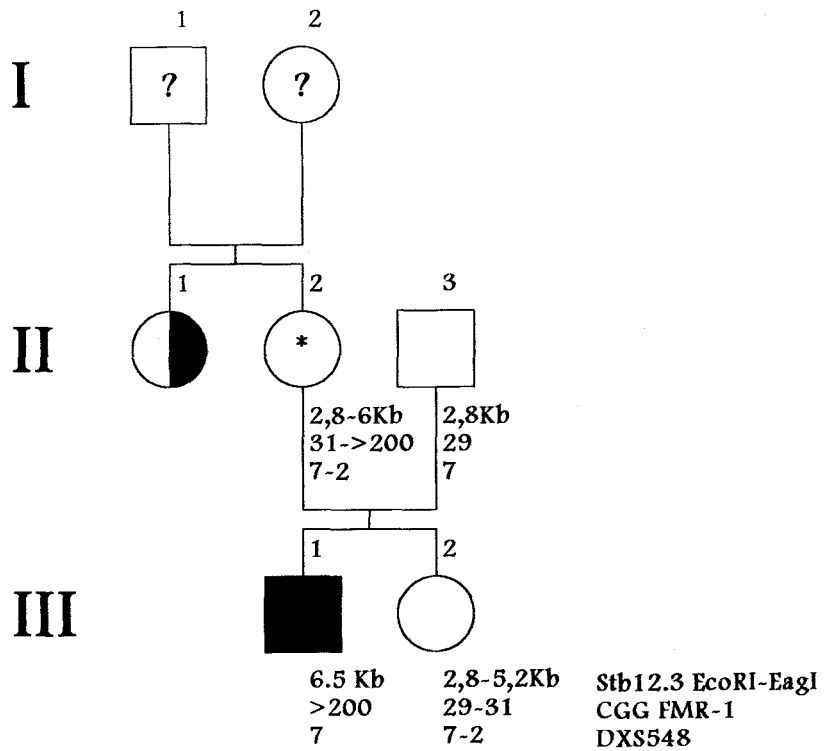
Familia 10.



Familia 11

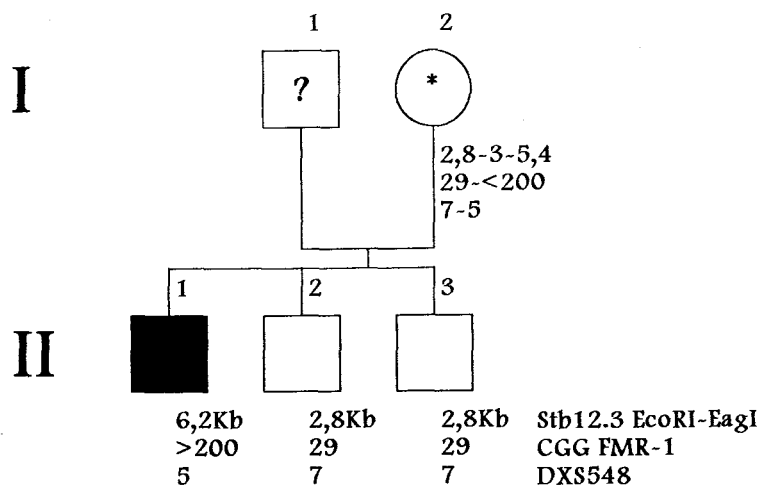


Familia 12

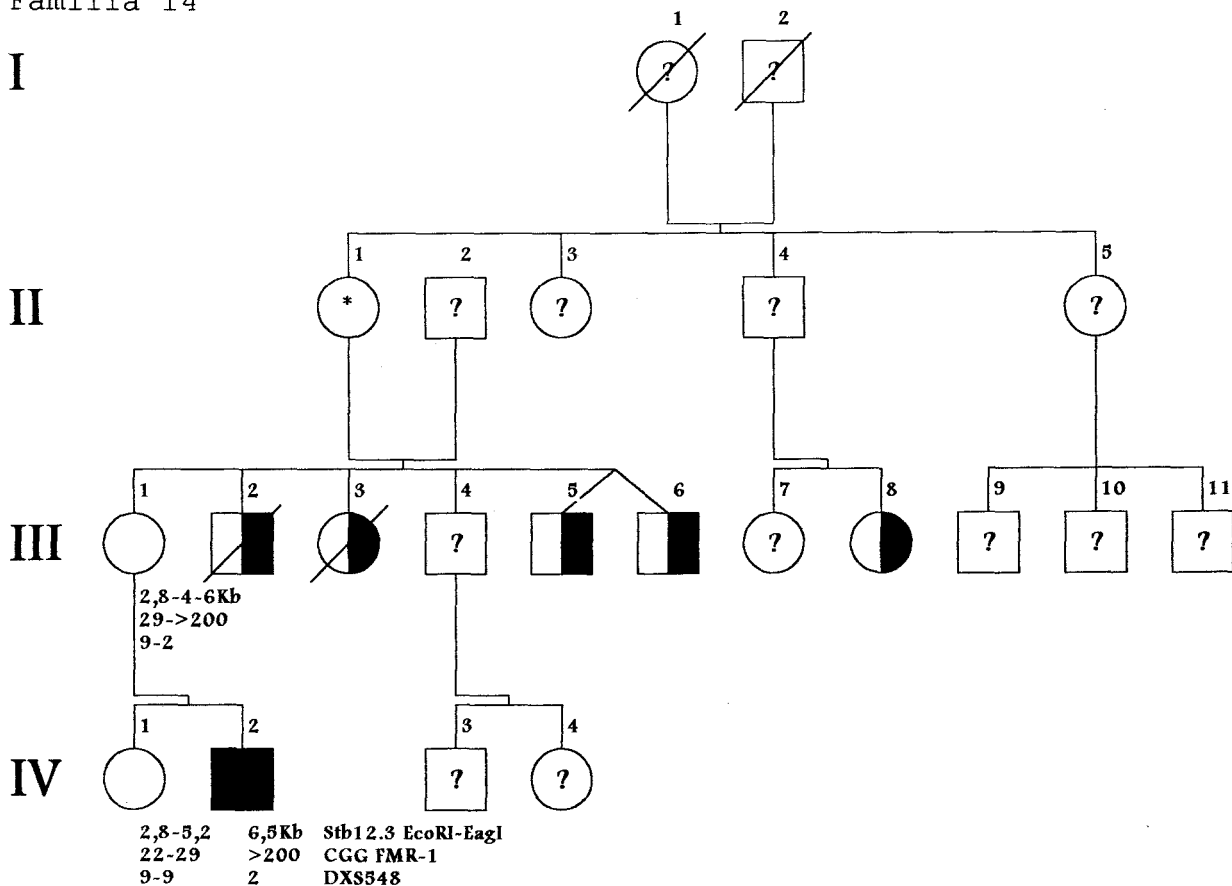


**RESULTADOS**

Familia 13



Familia 14



tripletes del gen FMR-1 y por lo tanto al síndrome X frágil, el alelo aparecía mutado tanto en la madre como en su hijo afectado y ligado al alelo 7 del locus DXS548.

Familia 13. El estudio se inició por un varón con retraso mental profundo que resulto afecto del síndrome X frágil pues los tripletes del gen FMR-1 aparecía expandido a rangos patológicos, su madre presentaba una premutación y sus dos hermanos, también estudiados, presentaban alelos en tamaños normales. El alelo mutado está ligado al alelo 5 del polimorfismo DXS548 muy poco frecuente en la población normal.

Familia 14. Este estudio se inicia en un varón con retraso mental (IV-2) que tenía amplios antecedentes maternos de retraso mental, se observa expansión en los tripletes del gen FMR-1 por lo que el alelo está mutado, se encuentra ligado al alelo 2 del locus DXS548. La madre es portadora (III-1) de una premutación. La hija (IV-1) es normal en cuanto al número de tripletes.

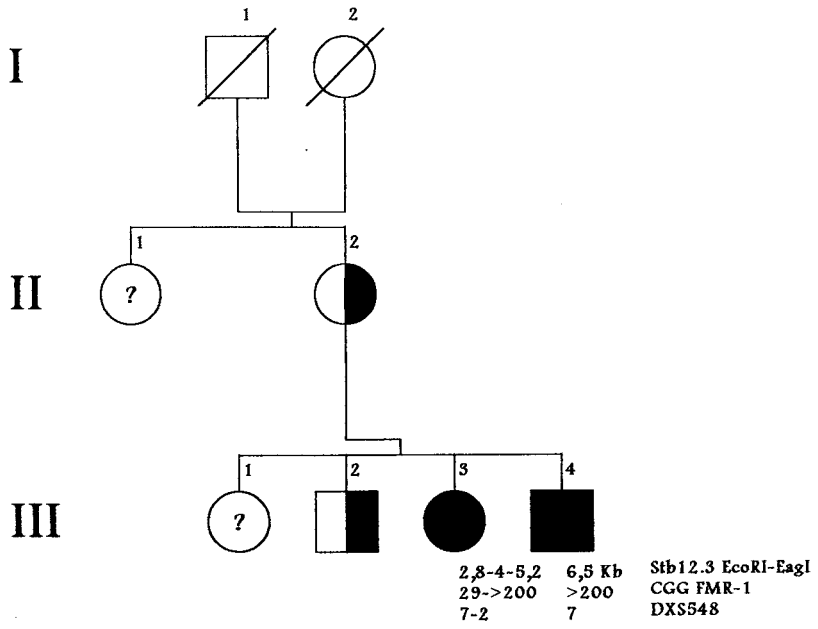
Familia 15. En este estudio se analizan dos hermanos un varón (III-4) y una mujer (III-3) con retraso mental profundo de un árbol con más casos con retraso leve en su madre y otro hermano. Se observa expansiones en rangos patológicos en ambas muestras, encontrándose el alelo mutado ligado al alelo 7 del locus DXS548.

Familia 16. En este estudio se analiza la familia más extensa de este estudio, la procedencia inicial era Huelva, pero se han estudiado miembros de Sevilla, Cadiz y Malaga. El estudio se inicia por aparecer antecedentes familiares del síndrome diagnosticados en un varón (IV-13) que padecía retraso mental de Madrid, se ha realizado un estudio exhaustivo de muchos miembros de la familia para establecer la procedencia del alelo mutado tanto en la línea de la abuela

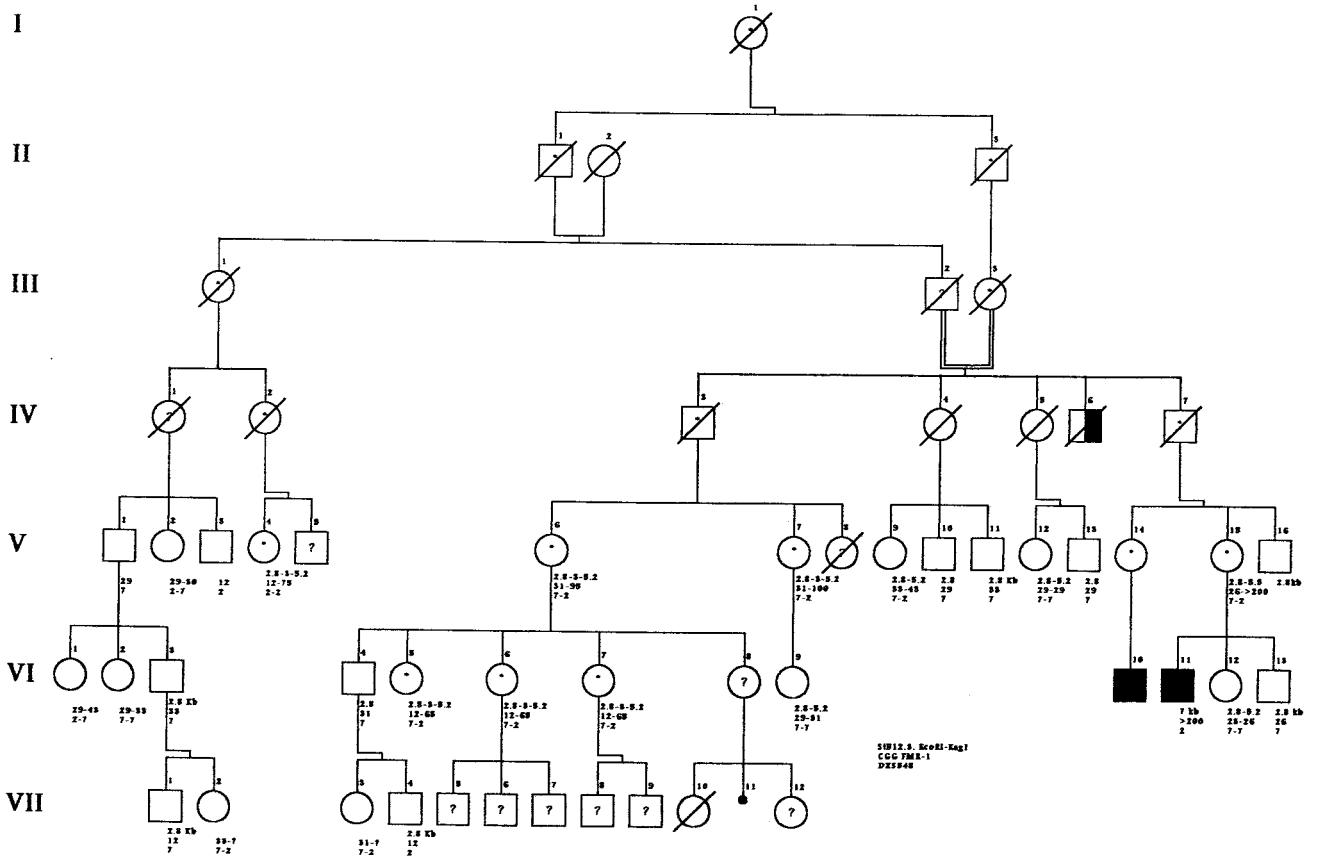


**RESULTADOS**

Familia 15.



Familia 16.



materna (no se muestra en este árbol genealógico por que no se encontró ningún individuo afecto por lo que no eran x frágil) donde se han analizado 10 muestras de entre sus sobrinos y hermanos sin encontrar rastro del gen mutado por lo que se continuó con la línea del abuelo materno (IV-8), que ya tenía hermanos afectados de retraso mental, en esta familia aparecen 4 cruces consanguíneos (líneas dobles) en las generaciones III, V y VI aunque no se ha detectado ningún caso de homocigosis para el alelo mutado. Se caracteriza por la presencia de pocos individuos afectados profundos sólo 2 en 44 individuos totales. Se han estudiado 29 individuos de 3 generaciones diferentes, se han diagnosticado en la V generación 4 mujeres portadoras (V-5, V-7, V-10 y V-17) y en la VI generación 3 mujeres portadoras (VI-2, VI-3 y VI-5) y 1 varón afecto del síndrome (VI-14), en la generación VII se han encontrado dos portadoras (VII-2 y VII-12).

*4.2 Familias con antecedentes de retraso mental no X frágil, árboles genealógicos y datos moleculares.*

En el estudio sobre el síndrome X frágil en Andalucía, se han encontrado varias familias, que a pesar de presentar antecedentes familiares por la línea materna (retrasos mentales ligados al cromosoma X), han resultado negativas para la expansión de los triplete en el gen FMR-1, en las figuras 57A y 57B se muestran sus árboles genealógicos con los datos moleculares del locus FRAXA. En estos casos el estudio se ha completado analizando el locus FRAXE con resultado negativos. En la figura 58 se muestran los árboles genealógicos con los datos moleculares en familias donde aparecía más de un miembro con retraso mental pero que resultaron negativas en las pruebas realizadas para detectar el síndrome X frágil.

**RESULTADOS**

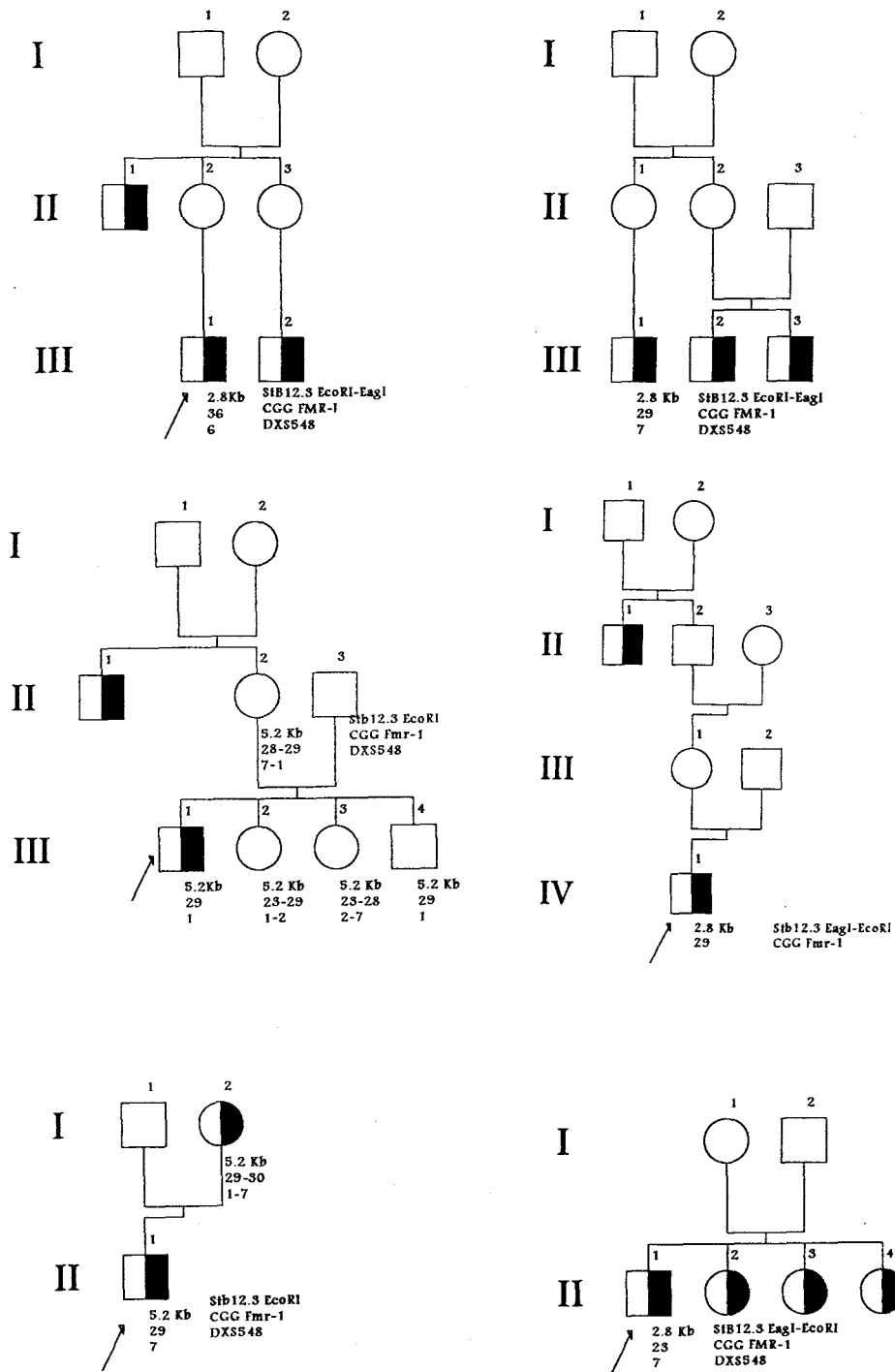


Figura 57A. Árboles genealógicos de las familias con antecedentes de retraso mental ligado al cromosoma X, que resultaron no X frágil. Los datos moleculares se indican debajo de cada individuo estudiado.

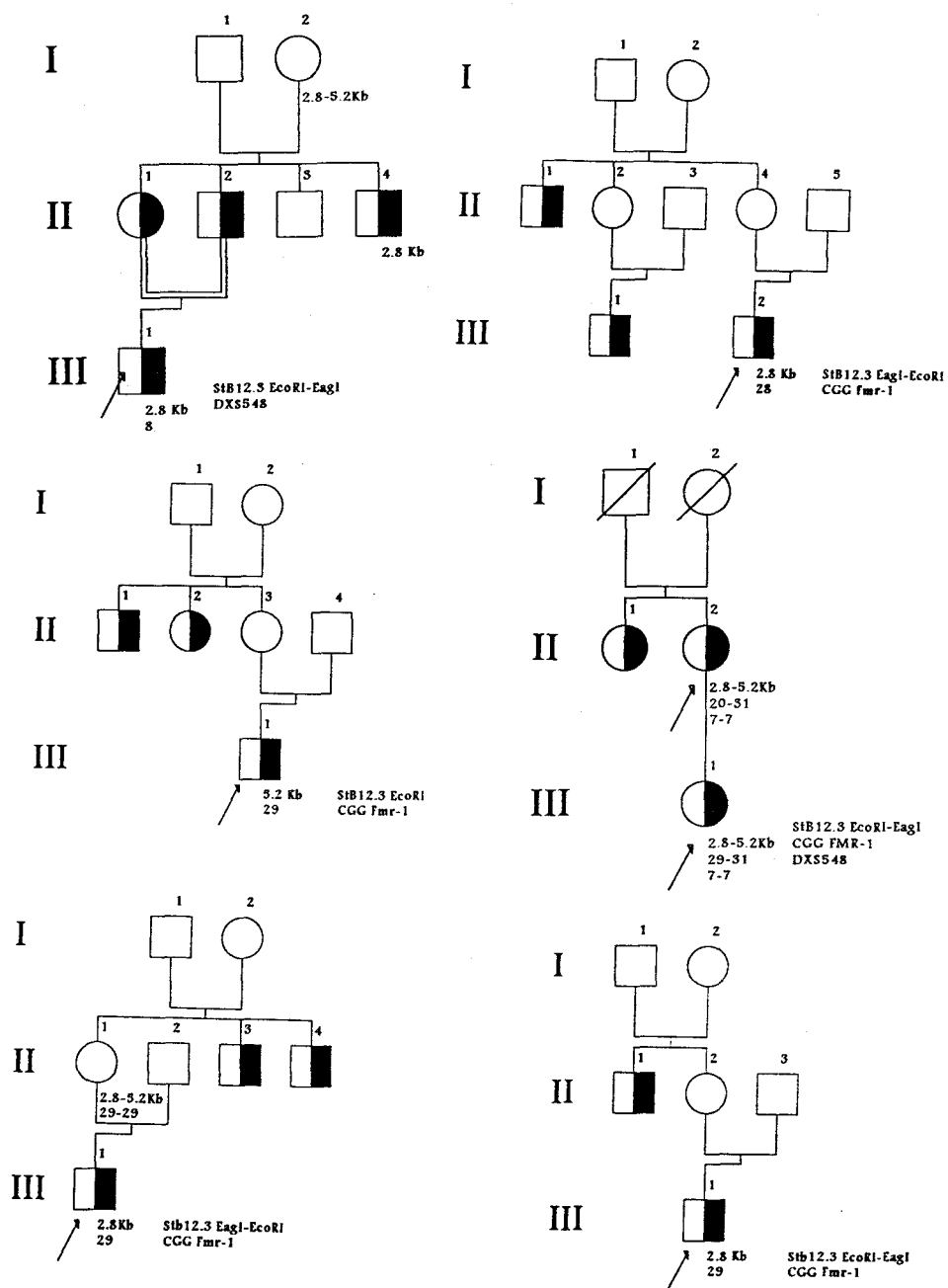


Figura 57B. Árboles genealógicos de otras familias con antecedentes de retraso mental ligado al cromosoma X, que resultaron no X frágil.

**RESULTADOS**

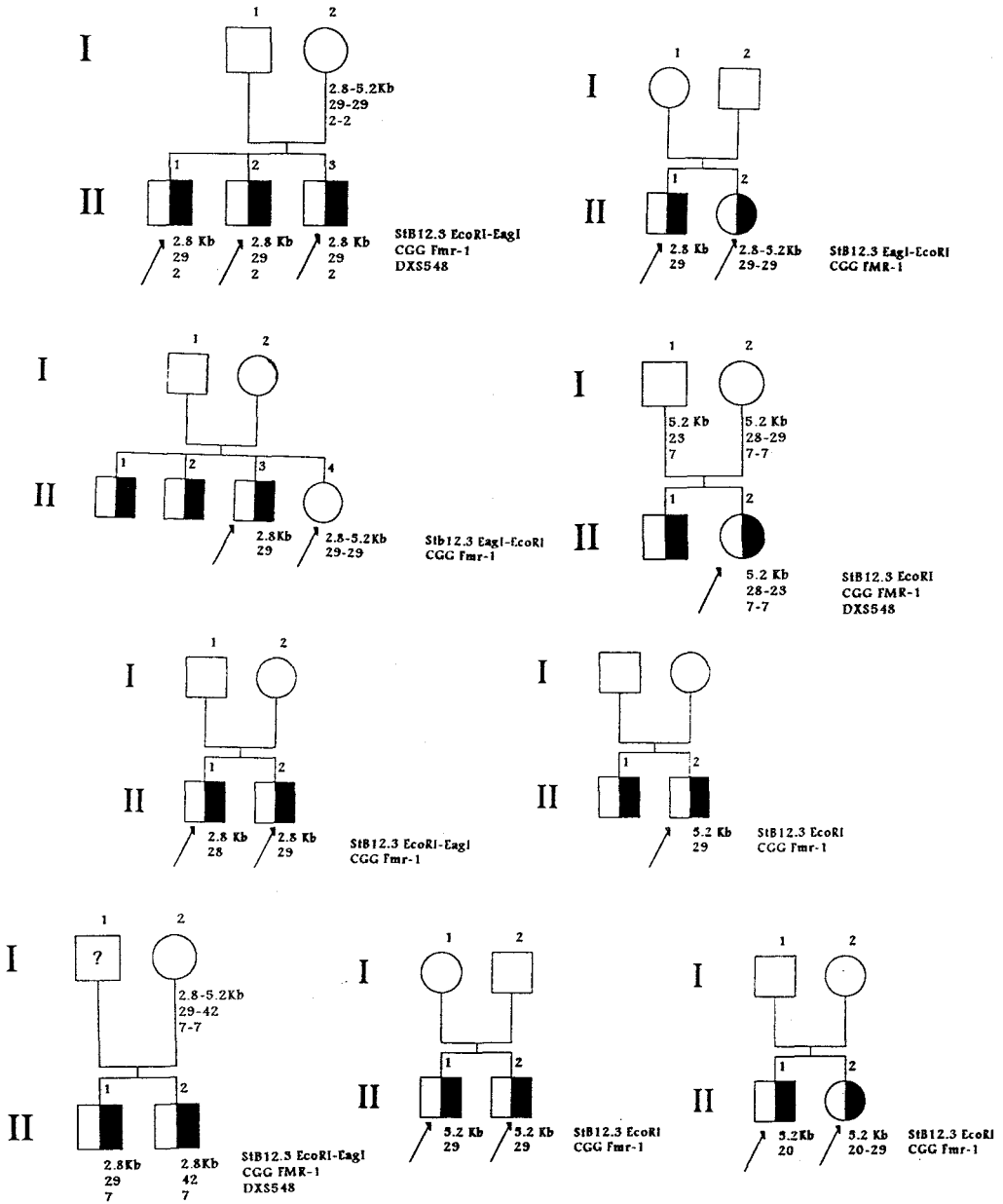


Figura 58. Árboles genealógicos de familias con más de un miembro que padece retraso mental, que en los estudios del síndrome X frágil no presentaban expansión en los tripletes del gen FMR-1.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el síndrome X frágil en una muestra de 357 individuos procedentes de distintas provincias de Andalucía que correspondían a personas con retraso mental de causa desconocida o a sus familiares. Se ha caracterizado el genotipo del locus FRAXA, calculando el número de tripletes y determinando el estado de metilación de la isla CpG próxima a dicho locus. Se ha detectado un importante número de afectados y portadores. En una amplia familia X frágil se han analizado 4 generaciones y se ha estudiado la relación genotipo/fenotipo. Así mismo se ha secuenciado la zona de los tripletes y las zonas adyacentes. Para establecer la existencia de un cromosoma fundador en este síndrome, se ha estudiado el polimorfismo del locus DXS548 ligado a FRAXA.

Se ha estudiado también, en una muestra de 73 individuos con retraso mental de causa desconocida, el polimorfismo de tripletes del locus FRAXE que presenta inestabilidad y está ligado a la aparición de un retraso familiar leve. En este polimorfismo se ha calculado el número de repeticiones del triplete (CCG/CGG) y el estado de metilación de la isla CpG próxima al locus FRAXE.

## **DISCUSIÓN**

---

### **1. ANÁLISIS DEL ADN FRENTE AL ESTUDIO CITOGENÉTICO.**

A partir de los años 70 y hasta la década de los 90 el diagnóstico del síndrome del X frágil se realizaba por citogenética, analizando los cromosomas en metafase y observando la aparición de la fragilidad en el extremo del brazo largo del cromosoma X. A partir de la localización del gen responsable de la enfermedad y la obtención de una sonda capaz de detectar directamente las alteraciones de dicho gen, el diagnóstico molecular del síndrome del X frágil ha demostrado ser el método de elección.

En nuestro estudio hemos utilizado las técnicas de análisis del ADN ("Southern blot" y PCR) para el diagnóstico del síndrome del X frágil. En las muestras que nos han sido enviadas con citogenética positiva, hemos detectado algunos casos de falsos positivos, es decir presentaban fragilidad en el extremo del brazo largo del cromosoma X pero tenían un número normal de triplete en el gen FMR-1. La fragilidad observada se correspondería probablemente con una fragilidad común en Xq27.2 llamada FRAXD, que aparece en 1-3% de las metafases y que no se encuentra ligada a ninguna patología conocida (Zaslav y col., 1991; Richards y Sutherland, 1992).

En otros casos la citogenética era negativa y con las técnicas de biología molecular se demostraba el estado anormal del gen FMR-1. Como Richards y Sutherland (1992) indican, la expresión de la fragilidad FRAXA se encuentra, en la mejores preparaciones, en un 4-40% de las metafases en individuos afectados del síndrome, con una frecuencia menor en las mujeres normales portadoras de una mutación total, y nunca en varones y mujeres portadores de una premutación. Por lo tanto el estudio molecular para establecer el estado de portador es imprescindible. Los datos de nuestro estudio confirman lo descrito en la literatura de la mayor fiabilidad de las técnicas moleculares frente a las

citogenéticas (Perroni y col., 1996 y Turner y col., 1996).

Por otra parte Hirtzlin y col., (1995) han realizado un estudio comparativo del coste de las técnicas citogenéticas frente a los estudios de biología molecular del ADN. Establecen que el coste es significativamente menor con las técnicas moleculares, por lo que las ventajas del diagnóstico por biología molecular están perfectamente establecidas.

## **2. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO.**

Para determinar el genotipo de un individuo que consulta sobre el síndrome X frágil, se deben utilizar varias técnicas complementarias para llegar a un diagnóstico de certeza. El método más rápido y económico es estudiar por PCR el locus FRAXA y establecer el número exacto de repeticiones (CGG/CCG). Los resultados de PCR nos permitirá descartar el síndrome en varones y mujeres que tengan 1 o 2 bandas respectivamente, de tamaño normal y de intensidad adecuada. En el caso de mujeres con una sola banda y varones en los que no se amplifica la zona o ésta es muy pobre es necesario utilizar otras técnicas complementarias.

La falta de amplificación en los varones es un índice indicativo de un posible X frágil aunque a veces la falta de amplificación por PCR se debe a una mala hibridación de los cebadores. Las mujeres con una sola banda pueden ser homocigóticas para ese locus o tener un alelo expandido que no se amplifica.

Para establecer si la falta de amplificación por PCR del locus FRAXA se debía a una deficiente hibridación de los cebadores o a fallos de la polimerasa, por el tamaño y composición del fragmento a amplificar, se realizaron estudios de desplazamiento del cebador marcado por cebador frío. Puede



## **DISCUSIÓN**

---

observarse en la figura 35, que en todos los casos el cebador frío desplazaba al radiactivo indicando una buena hibridación.

El diagnóstico de certeza del síndrome del X frágil debe hacerse con la técnica de "Southern-blot" con una digestión simple para detectar las amplificaciones. En los casos positivos es necesario realizar el "Southern-blot" con dos enzimas de restricción para conocer el estado de metilación de la isla CpG próxima a FRAXA. En el presente trabajo hemos utilizado las enzimas EcoRI/EagI o HindIII/SacII con las sondas StB12.3 u Ox1.9 con resultados de resolución semejante en ambos casos. Sin embargo, de acuerdo con la mayoría de los laboratorios que realizan el diagnóstico del síndrome del X frágil (Mila y col., 1994, Rousseau y col., 1994, Perroni y col., 1996, Spence y col., 1996, y Sherman y col., 1996), la sonda más utilizada en nuestro estudio ha sido la StB12.3.

En casos de diagnóstico dudoso, sobre todo para determinar el estado de portadora en mujeres, es importante estudiar algún locus que cosegregue con FRAXA (Zhong y col., 1996). En las familias con un miembro X frágil se analiza a qué alelo del locus objeto de estudio está ligado FRAXA. En nuestro trabajo hemos analizado el locus DXS548 y ha sido de gran utilidad para confirmar algunos diagnósticos.

Se han descrito casos aislados de individuos que presentan un fenotipo claro del síndrome X frágil pero con los tripletees en un rango normal. En estos pacientes sería conveniente secuenciar las zonas del gen importantes para la función de la proteína como son los dominios KH, la zona RGG y los sitios de maduración del ARN para eliminar los intrones (Chiurazzi y col., 1994). De Boulle y col., (1993) han descrito un fenotipo completo del síndrome en un paciente con un rango normal de tripletees, que presentaba una mutación en un sólo nucleótido en el primer dominio KH del gen FMR-1. Este es el único caso en la literatura

de mutación puntual como causa del síndrome, sin embargo no pueden descartarse otras mutaciones todavía no encontradas.

Así mismo una pequeña delección en alguna zona activa podría determinar también la aparición del fenotipo del síndrome X frágil como se ha indicado en Introducción (Trotier y col., 1994). En nuestro trabajo hemos estudiado solamente la causa más frecuente del síndrome (>99%) que corresponde a la amplificación de los triplete CGG/CCG del locus FRAXA, si bien hemos encontrado varios casos de varones con el fenotipo típico del síndrome pero un número normal de tripletes.

### **3. CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES.**

El estudio de las frecuencias alélicas de varios loci en una población, permite conocer sus características genéticas y compararlas con otras poblaciones ya estudiadas para los mismos loci. Además, el estudio del ligamiento entre dos loci uno de ellos causante de enfermedad permite estudiar el efecto del/los cromosoma fundador.

Las repeticiones (CGG/CCG)<sub>n</sub> del locus FRAXA son polimórficas en la población con un rango descrito para la población normal de 6 a 50 repeticiones (Fu y col., 1991). En nuestro estudio hemos encontrado alelos en un rango de 10 a 43 tripletes, todos ellos estables. Los alelos más frecuentes en nuestra población son el de 29 seguidos del de 30 repeticiones. Estos resultados son semejantes a los encontrados en un estudio realizado en Cataluña (Milá y col., 1994) donde encuentran un 24% de los cromosomas con 29 repeticiones y un 22,5% de los cromosomas con 30 tripletes.

En algunas poblaciones mediterráneas (Syrrou y col., 1996) como la griega se observa que un 41% de los cromosomas tiene 29 repeticiones y un 20% tiene 28 repeticiones. En otras poblaciones

## DISCUSIÓN

---

caucásicas, sin embargo, el alelo más frecuente es el de 30 triplete. En Finlandia este alelo representa el 23,2% del total seguido del de 23 triplete que aparece en el 14,3% de los cromosomas (Zhong y col., 1996). En Italia el alelo de 30 repeticiones aparece en el 37% de los cromosomas, seguido del de 29 con un 13% del total (Chiurazzi y col., 1996).

Si se dividen los alelos encontrados en dos grupos A:<35 triplete y B:>35 triplete la frecuencia se acumula en un 88,44% en los pequeños que siempre son estables. Los alelos grandes se sitúan en la zona gris donde algunos pueden ser inestables. En nuestra muestra los alelos grandes representan el 11,56% del total de cromosomas no X frágiles. Datos similares se han descrito en otros estudios con valores de 11,26% y 12,1% de alelos en la zonas gris (Snow y col., 1993; Zhong y col., 1995).

El locus DXS548 es polimórfico en la población y cosegrega con el locus FRAXA, por lo que es muy útil para estudiar el efecto fundador en el síndrome del cromosoma X frágil. Las frecuencias alélicas para este locus comparadas con otros estudios publicados indican que existen diferencias significativas con las poblaciones de Francia (Oudet y col., 1993), Italia (Chiurazzi y col., 1996) y Grecia (Syrrou y col., 1996) así como con otras poblaciones centroeuropeas, africanas (Chiurazzi y col., 1996 a y b) y norteamericanas (Zhong y col., 1994).

En este estudio se ha encontrado un alelo nuevo de 17 repeticiones AC/TG que hemos denominado alelo 10 siguiendo la nomenclatura propuesta por Macpherson y col., (1994). También se ha encontrado el alelo 9 de 18 repeticiones AC/TG, que sólo se había descrito en las poblaciones de Italia (Chiurazzi y col., 1996) y de Bélgica-Holanda (Buyle y col., 1993). Las frecuencias alélicas de nuestro estudio muestran una mayor dispersión, como se ha descrito previamente para otros loci (Chillon y col., 1994;

Bertrantpetit y col., 1991) e indicaría una mayor heterogeneidad genética en nuestra población.

El estudio de los haplotipos DXS548-FRAXA establece que en nuestra población existe un desequilibrio de ligamiento entre los dos marcadores. Empleando el test de  $\chi^2$  para comparar los alelos encontrados en los cromosomas X frágiles con los valores de estos alelos en los cromosomas no X frágiles, se calcula un valor de  $\chi^2 = 19,4$  ( $P=0,0002$ , con 3 grados de libertad) lo que apoya la hipótesis del cromosoma fundador en el síndrome X frágil en Andalucía.

En nuestro estudio se observa un claro ligamiento entre el alelo 2 del locus DXS548 y los individuos afectados del síndrome X frágil. Estos resultados se han encontrado en otras poblaciones caucásicas (Zhong y col., 1994; Chiurazzi y col., 1994; Chiurazzi y col., 1996a; Sirrou y col., 1996; Zhong y col., 1996). Chiurazzi y col., (1996a) postulan que existiría un antecesor común del cromosoma X mutado que debió surgir en África donde se observa este mismo desequilibrio de ligamiento. En las poblaciones orientales, sin embargo, no se encuentra este ligamiento entre los cromosomas X frágiles y el alelo 2 del locus DXS548 (Chiurazzi y col. 1996b).

#### **4. DIAGNÓSTICO PRENATAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL.**

Como se ha dicho anteriormente el síndrome del X frágil es la primera causa de retraso mental hereditario y en la actualidad no tiene tratamiento específico. Por ello la única forma de disminuir su incidencia es detectar a los portadores y realizar el diagnóstico prenatal en los embarazos de riesgo. El estudio prenatal del síndrome se realiza en células del líquido amniótico alrededor de la decimosexta semana de gestación o en las células de las vellosidades coriónicas en el primer trimestre del embarazo.

## **DISCUSIÓN**

---

El método de elección depende de la cantidad de células disponibles siendo la PCR el más utilizado (Brown y col., 1996). Sin embargo, es necesario realizar un "Southern-blot" en todos los casos en los que la PCR no sea informativa. El diagnóstico prenatal que presentamos en este trabajo se realizó por PCR en células del líquido amniótico. En este caso la PCR fue claramente informativa ya que el feto tenía dos alelos normales uno procedente de la madre y otro del padre. Los datos se confirmaron con los resultados del locus DXS548, puesto que el feto no tenía el alelo que en esta familia cosegregaba con el cromosoma X frágil, indicando además que no había contaminación de la muestra con células maternas.

Como se ha indicado el "Southern-blot" sería necesario en los casos en los que el feto no haya heredado los cromosomas normales de los padres y el mutado no pueda detectarse por PCR. También es aconsejable realizar un "Southern-blot" para detectar mosaicismos de tamaño y estudiar el estado de metilación de la isla CpG reguladora de la expresión del gen FMR-1 implicado en el retraso mental.

En el caso de haber heredado el cromosoma mutado, la expresión del fenotipo es muy variable por lo que sería difícil definir si padecerá o no retraso mental profundo (Hagerman y Cronister, 1996). Si el feto es varón y la isla CpG ligada al gen FMR-1 está metilada el riesgo de ser retrasado es casi del 100%, siendo el 40% aproximadamente en las mujeres (Hagerman y Cronister, 1996).

### **5. EVOLUCIÓN DE LA ZONA FRAXA.**

El número de repeticiones CGG/CCG es variable en la población normal (Verkerk y col., 1991), sin embargo las expansiones se producen en alelos inestables que llamamos premutados. Existe una zona gris entre los 40-50 triplete en los

que es muy difícil predecir si el alelo es estable o inestable. Se ha postulado que los alelos grandes (>35 repeticiones) serían los más predispuestos a sufrir mutaciones (Zhong y col., 1994). Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis, pues tenemos muy pocos alelos en los tamaños más altos de la zona gris y por otra parte, los alelos de tamaños más pequeños de la zona gris no están ligados al haplotipo más frecuente en los cromosomas X frágiles.

En los alelos normales que se han secuenciado se ha observado la existencia de interrupciones periódicas AGG/CCT (Zhong y col., 1994). Se ha propuesto que la inestabilidad de los tripletes vendría determinada por la pérdida de dichas interrupciones causada por mutaciones puntuales, y no por el número total de tripletes CGG/CCG (Hirst y col., 1994; Reiss y col., 1994 y Snow y col., 1994).

En los datos de secuenciación de la zona de repeticiones en nuestra población se observan interrupciones periódicas en todos los alelos normales estudiados. La dificultad para secuenciar los alelos premutados no nos ha permitido una lectura total de las repeticiones. En dos alelos premutados se ha observado una primera interrupción en la posición 11 de los tripletes pero no hemos podido determinar si existían otras interrupciones posteriores. Estos alelos aparecen totalmente expandidos en las generaciones siguientes, lo que indica que eran muy inestables incluso con una interrupción en la primera parte de las repeticiones.

En otras enfermedades debidas a mutaciones dinámicas, por amplificación de tripletes, como el retraso mental ligado a FRAXE, la distrofia miotónica o la corea de Huntington no se han observado interrupciones en las zonas repetitivas (Zhong y col., 1996). Esto indicaría que el fenómeno de estabilización por las interrupciones no es general para todos los tipos de mutaciones

## **DISCUSIÓN**

---

dinámicas y debe haber otras causas para explicar la inestabilidad.

Se ha secuenciado la zona adyacente a las repeticiones para establecer si eran polimórficas, pues la secuencia publicada por Verkerk y col., (1991) era diferente a la publicada por Kremer y col., (1991). La secuencia de los alelos analizados en este estudio se corresponde con la publicada por Verkerk y col., (1991) y no hemos encontrado variaciones en ninguno de los alelos estudiados.

### **6. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN EL SÍNDROME X FRÁGIL.**

Uno de los temas más estudiados y controvertidos en la actualidad es la relación genotipo-fenotipo en el síndrome del X frágil, sobre todo en las mujeres portadoras. Además, recientemente se han descrito nuevos fenotipos asociados al retraso mental X frágil (de Vries y col., 1993; de Vries y col., 1995 y Alembik y col., 1995).

En la familia 1 de nuestro estudio, hemos encontrado un varón con una expansión del gen FMR-1 en el rango de premutación pero que presentaba una expresión parcial del síndrome (III-6, fig. 48). Sin embargo, un hermano que tenía una expansión de idéntico tamaño era absolutamente normal (III-5, fig.48). La hipótesis era que el varón con expresión parcial del síndrome pudiera tener tamaños más grandes en otros tejidos y así explicar las alteraciones fenotípicas.

Los estudios de PCR realizados en células procedentes de mesodermo (células sanguíneas), endodermo (mucosa bucal) y extodermo (bulbo piloso) mostraban una expansión idéntica en las tres procedencias embrionarias. No pudimos descartar diferencias en la metilación debido a la escasa cantidad de ADN, por lo que no se puede determinar si la expresión parcial del síndrome en

este individuo se debe a la premutación o es una simple coincidencia.

En el presente estudio hemos encontrado un individuo varón afecto de retraso mental, en una familia X frágil, que presentaba tamaños normales y premutados detectables por "Southern-blot", pero que no tenía ningún fragmento con la mutación completa ni se sospechaba un "smear" (individuo 34.10 del apartado A de Resultados). No puede descartarse que en otros tejidos aparezcan tamaños mutados que determinen la aparición del síndrome como demuestran Dobkin y col., (1996) en algunos individuos mosaicos.

También presentamos tres varones (individuos 1.1, 22.9 y 22.10 del apartado A de Resultados), con retraso mental profundo que en los estudios moleculares de células sanguíneas, presentaban sólo premutaciones sin metilar. Como indican Dobhin y col., (1996) y Maddalene y col., (1996) se detectan individuos con premutaciones en sangre y mutaciones completas en tejido epitelial, estudiando las muestras por "Southern-blot". McConkey y col., (1993) encuentran variaciones en los niveles de metilación que podrían dar lugar a la expresión parcial del síndrome, por lo que postulan un efecto gradiente en la expresión del fenotipo X frágil (ver fig. 11).

En el presente estudio además de las expansiones típicas del síndrome se observan varias retracciones de los alelos al pasar de una generación a otra. En la familia 1 aparecen retracciones que se heredan tanto vía materna como paterna (III-3 y IV-5 respectivamente, fig. 48). No se ha observado, sin embargo, ninguna expansión cuando el alelo se hereda vía paterna como ha sido ampliamente demostrado en otros estudios (Oberle y col., 1991; Sutherland y col., 1992; Yu y col., 1991). Las mujeres que hereden el gen premutado vía paterna son fenotípicamente normales, siendo sus hijos los que tienen un riesgo muy alto de padecer retraso mental, como puede observarse en las familias 2



## **DISCUSIÓN**

---

y 16 de nuestro estudio.

### **7. VARIABILIDAD EN LA METILACIÓN DE LA ISLA CpG DEL LOCUS FRAXA.**

El estudio molecular de la zona FRAXA indicaba que la expansión en el rango de mutación (> de 200 repeticiones) se acompaña de hipermetilación de la isla CpG próxima a dicho locus, lo que induciría la falta de expresión del gen FMR-1 (Bell y col., 1991; Luo y col., 1993). Estudios posteriores han propuesto que la metilación de la isla CpG se produciría cuando el tamaño de las repeticiones superase los 230 triplete (Mueller y col., 1995 y McConKey-Rosell, 1995).

En nuestro estudio se han encontrado dos mujeres portadoras de una mutación total (>200 triplete) en las que el alelo estaba sin metilar, en una de ellas el número de repeticiones era de 235 y en la otra de 260 (8.3 y 5.3 respectivamente del apartado A de resultados). En algunos varones afectados del síndrome con patrones mosaicos hemos observado fragmentos por encima de 300 repeticiones sin metilar (12.12, 32.7 y 33.6 del apartado A de resultados). Sin embargo los alelos con expansiones de 1200 pb (400 triplete) se han encontrado siempre metilados.

Trabajos recientes muestran que alelos premutados con tamaños en el rango de 400 triplete sin metilar conllevan niveles más bajos de proteína FMRP, con niveles normales de ARNm. Estos datos sugieren que el número de triplete en sí mismo, inhibe la traducción de la proteína y puede determinar la aparición de fenotipos intermedios (Feng y col., 1995b).

### **8. MOSAICISMOS EN CÉLULAS SANGUÍNEAS.**

La inestabilidad en las repeticiones determina una alta variabilidad en los patrones detectados por "Southern-blot", que a veces aparece como un banda difusa ("smear"). Estos mosaicismos

que se observan con relativa frecuencia, en los portadores de una mutación completa y que a veces se acompañan de premutaciones, pueden inducir a falsos negativos en los resultados por PCR (Rousseau y col., 1992).

Se ha descrito un patrón mosaico idéntico en tres pares de gemelos monocigóticos, lo que indica que la heterogeneidad somática y de metilación se establece muy temprano en el desarrollo. En los casos de mosaicismo se observa un nivel muy bajo de expresión del ARNm del gen FMR-1 lo que determinaría la aparición del retraso mental (Devys y col., 1992).

En nuestro estudio, se ha detectado una familia en la que la madre portadora y sus dos hijos, un varón con retraso mental y una mujer normal, eran mosaicos de tamaño de la zona de triplete y de metilación en la isla CpG adyacente a las repeticiones (individuos 1,2 y 3; fig. 30). En cuatro casos más se han detectado mosaicismos pero no se pudieron realizar estudios familiares por lo que no se puede indicar si son fenómenos aislados o tienen algún componente familiar (ver como ejemplo el individuo 4, fig. 30).

En nuestro estudio hemos encontrado un 17% de mosaicismo entre los varones afectados (5 mosaicos en 28 individuos X frágiles) similar a los valores descritos por otros autores. Nolin y col., (1994) detectan un 15% de mosaicismo y Rousseau y col., (1994) en un estudio en 318 familias con el síndrome X frágil encuentran un 12% en varones y un 6% en mujeres.

#### **9. BAJA PREVALENCIA DE LA EXPANSIÓN DEL LOCUS FRAXE.**

En algunas muestras de individuos retrasados que nos enviaban para el estudio del síndrome X frágil, pero que resultaron negativas, se ha analizado también el locus FRAXE ligado a un retraso mental familiar ligero con una amplia

## **DISCUSIÓN**

---

variabilidad clínica. Para caracterizarlo se ha calculado el tamaño de las repeticiones CCG/GGC y el estado de metilación de la isla CpG ligada al gen FMR-2 implicado en este tipo de retraso mental.

No hemos detectado ningún individuo con expansión en la zona repetitiva (CCG/CGG)<sub>n</sub> de FRAXE, lo que indica, a pesar de que la muestra estudiada es pequeña, que el retraso mental ligado a FRAXE debe ser poco frecuente en Andalucía. Estos resultados están de acuerdo con lo previamente descrito en otras poblaciones (Hofstee y col., 1994; Holden y col., 1996; Meadows y col., 1996).

### **10. PREVALENCIA DEL SÍNDROME X FRÁGIL.**

Uno de los objetivos de nuestro trabajo ha sido estudiar la prevalencia del síndrome X frágil en los individuos con retraso mental de causa desconocida en Andalucía. Se ha calculado una prevalencia de un 11,2% (11,1% en varones y 6,7% en mujeres), un valor algo superior al encontrado por otros autores (Hagerman y Silverman, 1991).

Considerando que el retraso mental de origen desconocido es aproximadamente el 63% del total de retrasos mentales (Hofstee y col., 1994), se calcula que la prevalencia del síndrome X frágil en la población retrasada de Andalucía es aproximadamente el 7%. Los valores publicados oscilan desde un 1,9% en una población de Hawaii (Jacobs y col., 1986) hasta el 11% encontrado en un estudio en Australia (Turner y col., 1986).

La prevalencia del síndrome del X frágil en la población general se calculó en principio por estudios citogenéticos, en los que se observaba 1 individuo afecto entre 1250 varones y 1 entre 2000 mujeres (Mazurczak, y col., 1996). Una reevaluación de la prevalencia en la población caucásica por estudios

moleculares reducen la frecuencia a 1 individuo afecto entre 4000 varones (Turner y col., 1996). Un cálculo aproximado de la prevalencia del síndrome X frágil en Andalucía, asumiendo que el 1% de la población se estima que tiene algún tipo de retraso mental (Hagerman y Cronister, 1996) sería de 1 afecto entre 1300 varones. Esta prevalencia es ligeramente superior a la encontrada en otros estudios (Turner y col., 1996) puede deberse a un involuntario sesgo en la muestra.

En el estudio en Andalucía, como se ha indicado anteriormente, podría existir una desviación del muestreo, producida por los especialistas clínicos, al seleccionar ellos parte de las muestras que enviaban para el análisis del síndrome X frágil. Eligiendo principalmente aquellas que cumpliesen ciertas características como antecedentes familiares o rasgos fenotípicos, por lo que el valor real de la prevalencia puede ser algo menor al calculado. Dentro de las 42 familias estudiadas, que presentaban antecedentes familiares de retraso mental, se ha diagnosticado el síndrome en 19 de ellas lo que representa un 45%. Un 38,8% había sido indicado por Frister-Iskenius y col., (1983), un 14% en el estudio de Carpenter y col., (1982) y un 19% en el estudio de Carpenter y col., (1987) por lo que las frecuencias calculadas son variables de un estudio a otro.

Para poder determinar la prevalencia exacta del síndrome X frágil en Andalucía, sería necesario realizar un estudio más amplio en la población general evitando cualquier tipo de desviación de la muestra. En otros países se están realizando estudios sistemáticos en la población general para detectar a los afectados y portadores lo que posibilita el consejo genético y el diagnóstico prenatal en las familias X frágiles (Spence y col., 1996). Esto ha permitido en países como Australia reducir en 10 veces la prevalencia de hijos afectados en mujeres portadoras (Robinson y col., 1996).

## CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha estudiado el síndrome del X frágil en una muestra, de individuos con retraso mental de causa desconocida y sus familiares, procedente de diversas provincias de Andalucía. Se han puesto a punto, en el laboratorio, las técnicas de biología molecular para el estudio del síndrome del X frágil por análisis del ADN. Estas técnicas permiten obtener un diagnóstico de certeza tanto de afectos como de portadores.
2. La técnica de PCR es rápida y de relativo bajo costo, y permite descartar el síndrome en un gran número de individuos, preferentemente en mujeres heterocigotas con dos fragmentos de tamaño normal. La PCR es la técnica de elección para conocer el tamaño exacto de las expansiones.
3. El diagnóstico del síndrome X frágil debe realizarse con la técnica de "Southern-blot". La digestión simple con EcoRI o HindIII permite conocer si existe expansión de los tripletes pero no da información sobre el estado de metilación de la isla CpG. Los resultados son válidos tanto con la sonda StB12.3 como con la Ox1.9.

## CONCLUSIONES

---

4. En los afectos del síndrome X frágil es aconsejable conocer el estado de metilación de la isla CpG próxima a FRAXA, por lo que debe realizarse el estudio por "Southern-blot" con doble digestión. Pueden usarse indistintamente las enzimas EcoRI/EagI o HindIII/SacII.

5. La aparición de individuos con fenotipo del síndrome X frágil, pero sin expansiones en la zona de los tripletes (CGG/CCG)<sub>n</sub> indica que deben realizarse pruebas complementarias (estudio de mutaciones puntuales o de expresión de la proteína FMRP) para descartar otras causas del síndrome, si bien éstas constituyen un porcentaje mínimo.

6. El fenotipo en el síndrome X frágil es muy variable, lo que puede estar determinado por la diversidad en el número de tripletes y/o el estado de metilación de la isla CpG próxima a FRAXA. En nuestro estudio, los datos moleculares de los individuos analizados, se correlacionaban bien con los físicos y psicológicos. Hemos encontrado, sin embargo, dos hermanos con la misma expansión y estado de metilación en la zona FRAXA y distinta expresión del síndrome. No se detectó mosaicismo de tamaño en los distintos tejidos estudiados, aunque la escasez de la muestra no permitió estudiar el estado de metilación de la isla CpG reguladora de la transcripción del gen FMR-1.

7. En el diagnóstico prenatal del síndrome X frágil, la PCR del locus FRAXA del feto (probando) y otros familiares, complementada con el estudio del polimorfismo DXS548, ligado a FRAXA, puede llevar al diagnóstico de certeza en los casos de fetos mujeres heterocigotas, con alelos de tamaño normal para el número de tripletes del gen FMR-1.

8. En los individuos no X frágiles, el rango de los alelos encontrados para el locus FRAXA oscila de 7 a 43 tripletes, siendo el de 29 seguido del de 30 los más frecuentes. Los alelos

pequeños (< de 35 repeticiones) constituyen el 88,44% y los grandes (> de 35 triplete) el 11,56%. La proporción de alelos en la zona gris (alelos estables o inestables) es similar a la calculada en otras poblaciones.

9. El estudio del polimorfismo (CA/TG)<sub>n</sub> del locus DXS548 en nuestra muestra presenta una mayor dispersión de frecuencias respecto a otras poblaciones caucásicas estudiadas, indicando una mayor heterogeneidad genética. Se ha encontrado un nuevo alelo de 17 (CA/TG) que hemos denominado alelo 10 según la nomenclatura propuesta por Macpherson y col., (1995).

10. El análisis de los haplotipos DXS548/FRAXA en la población andaluza no X frágil, muestra una mayor dispersión de frecuencias que en otras poblaciones, lo que indicaría de nuevo una mayor heterogeneidad genética. En la población X frágil se observa un ligamiento estadísticamente significativo ( $\chi^2=19,2$ . P=0,0002 con 3 grados de libertad), entre el alelo 2 del locus DXS548 y los cromosomas mutados, apoyando la hipótesis del cromosoma fundador surgido en África.

11. La secuencia de la zona de repeticiones (CGG/CCG)<sub>n</sub> del locus FRAXA de los alelos normales muestra que a intervalos periódicos aparece una interrupción (AGG/CCT). En los alelos premutados hemos encontrado una primera interrupción en el extremo proximal; sin embargo la dificultad en la lectura de la secuenciación de estos alelos, ha hecho imposible determinar si existían otras interrupciones.

12. El estudio de las zonas adyacentes al locus FRAXA en las muestras estudiadas, ha puesto de manifiesto que la secuencia en nuestra población se corresponde con la previamente descrita por Verker y col. (1991), no observándose ningún tipo de polimorfismo en esta zona.

## **CONCLUSIONES**

---

13. La zona FRAXA del gen FMR-1 está muy conservada en la evolución encontrándose una homología del 75% con la secuencia en la rata. El número de tripletes (CGG/CCG) es, sin embargo mucho menor en esta especie, observándose 4 repeticiones seguidas sin ninguna interrupción (AGG/CCT).

14. Se han encontrado 3 casos de varones con retraso mental severo y portadores de una premutación en el locus FRAXA. No se ha podido determinar si eran mosaicos de tejidos, o el retraso mental se debía a otras causas distintas al síndrome X frágil.

15. No se han encontrado afectos de retraso mental tipo FRAXE entre los 73 individuos analizados, por lo que la prevalencia de este síndrome debe ser muy baja en la población retrasada de Andalucía.

16. La prevalencia del síndrome X frágil, en la población andaluza con retraso mental de causa desconocida, es del 11,2%; siendo mucho menor entre los individuos retrasados e institucionalizados, con un valor del 6,3%. Esto indicaría una mayor proporción de retrasos moderados en este síndrome. A partir de los resultados de este estudio se calcula que la prevalencia del síndrome X frágil en varones, es aproximadamente 1 de cada 1300, ligeramente más alta que la establecida para otras poblaciones caucásicas. Esto podría ser debido a un cierto sesgo de la muestra estudiada.

17. La alta prevalencia de esta enfermedad hereditaria, que este trabajo confirma también en Andalucía, aconseja continuar su estudio para detectar los numerosos casos aún sin diagnosticar y mantener un seguimiento médico de las familias X frágiles. Un consejo genético adecuado y la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales en los embarazos de riesgo permitiría una disminución efectiva de la incidencia del síndrome X frágil en Andalucía.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abitbol, M.; Menini, C.; Delezoide, A.-L.; Rhyner, T.; Vekemans, M.; Mallet, J.: Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nature Genet.* 4: 147-153, 1993.
- Abrams, M. T.; Reiss, A. L.; Freund, L. S.; Baumgardner, T.L.; Chase, G. A.; Denckla, M. B.: Molecular neurobehavioral associations in females with the fragile X full mutation. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 317-27, 1994.
- Albright, S. G.; Lachiewicz, A. M.; Tarleton, J. C.; Rao, K.W . ; Schwartz, C. E.; Richie, R.; Tennison, M. B.; Aylsworth, A. S.: Fragile X phenotype in a patient with a large de novo deletion in Xq27-q28. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 294-7, 1994.
- Alembik, Y.; Dott, B.; Stoll, C.: Rett-like syndrome in fragile X syndrome. *Genet-Couns.* 6(3): 207-10, 1995.
- Allingham-Hawkins, D. J.; Ray, P. N.: FRAXE expansion is not a common etiological factor among developmentally delayed males. *Am. J. Hum. Genet.* Jul; 57(1): 72-6, 1995.
- Antinolo, G.; Borrego, S.; Cabeza, J. C.; Sanchez, R.; Sanchez, J.; Sanchez, B.: Reverse mutation in fragile X syndrome [letter]. *Am J Hum Genet.* Jan. 58 (1): p237-9, 1996.
- Amin, V. R.; Maino, D. M.: The fragile X female: a case report of the visual, visual perceptual, and ocular health findings. *J. Am. Optom. Assoc.* May; 66(5): 290-5, 1995.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Ashley, A. E.; Sherman, S. L.: Population dynamics of a meiotic/mitotic expansion model for the fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* Dec. 57 (6): p1414-25, 1995.
- Ashley, C. T.; Sutcliffe, J. S.; Kunst, C. B.; Leiner, H. A.; Eichler, E. E.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.: Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nature Genet.* 4: 244-251, 1993.
- Ashley, C. T., Jr.; Wilkinson, K. D.; Reines, D.; Warren, S. T.: FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262: 563-566, 1993.
- Bachner, D.; Steinbach, P.; Wohrle, D.; Just, W.; Vogel, W.; Hameister, H.; Manca, A.; Poustka, A.: Enhanced Fmr-1 expression in testis. (Letter) *Nature Genet.* 4: 115-116, 1993.
- Baumgardner, T. L.; Reiss, A. L.; Freund, L. S.; Abrams, M. T.: Specification of the neurobehavioral phenotype in males with fragile X syndrome. *Pediatrics.* May; 95(5): 744-52, 1995.
- Bell, M. V.; Hirst, M. C.; Nakahori, Y.; MacKinnon, R. N.; Roche, A.; Flint, T. J.; Jacobs, P. A.; Tommerup, N.; Tranebjaerg, L.; Froster-Iskenius, U.; Kerr, B.; Turner, G.; Lindenbaum, R. H.; Winter, R.; Pembrey, M.; Thibodeau, S.; Davies, K. E.: Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 64: 861-866, 1991.
- Berry-Kravis, E.; Hicar, M.; Ciurlionis, R.: Reduced cyclic AMP production in fragile X syndrome: cytogenetic and molecular correlations. *Pediatr-Res.* Nov; 38(5): 638-43, 1995.
- Biancalana, V.; Taine, L.; Bouix, J. C.; Finck, S.; Chauvin, A.; De Verneuil, H.; Knight, S. J.; Stoll, C.; Lacombe, D.; Mandel, J. L.: Expansion and methylation status at FRAXE can be detected on EcoRI blots used for FRAXA diagnosis: analysis of four FRAXE families with mild mental retardation in males. *Am J Hum Genet.* Oct, 59 (4): p847-54, 1996.
- Blair, H. J.; Hirst, M. C.; MacKinnon, R.; Davies, K. E.; Boyd, Y.: Evaluation of human microdissection clones from the FRAXA region as tools for comparative mapping in the mouse: isolation of a conserved genomic clone close to FMR1. *Mamm-Genome.* Sep;

- 5(9): 584-7, 1994.
- Blomquist, H. K.; Gustavson, K.-H.; Holmgren, G.; Nordenson, I.; Sweins, A.: Fragile site X chromosomes and X-linked mental retardation in severely retarded boys in a northern Swedish county: a prevalence study. *Clin. Genet.* 21: 209-214, 1982.
- Borghgraef, M.; Swillen, A.; Van-den-Berghe, H.; Fryns, J. P.: Fragile X boys: evolution of the mental age in childhood. Preliminary data on 10 prepubertal boys. *Genet-Couns.* 6(2): 97-101, 1995.
- Bowen, P.; Biederman, B.; Swallow, K. A.: The X-linked syndrome of macro-orchidism and mental retardation: further observations. *Am. J. Med. Genet.* 2: 409-414, 1978.
- Brookwell, R.; Turner, G.: High resolution banding and the locus of the Xq fragile site. *Hum. Genet.* 63: 77, 1983.
- Brown, W. T.; Gross, A.; Chan, C.; Jenkins, E. C.; Mandel, J. L.; Oberle, I.; Arveiler, B.; Novelli, G.; Thibodeau, S.; Hagerman, R.: Multilocus analysis of the fragile X syndrome. *Hum. Genet.* 78: 201-205, 1988.
- Brown, W. T.; Gross, A. C.; Chan, C. B.; Jenkins, E. C.: Genetic linkage heterogeneity in the fragile X syndrome. *Hum. Genet.* 71: 11-18, 1985.
- Brown, W. T.; Jenkins, E. C.; Goonewardena, P.; Mizejeski, C.; Atkin, J.; Devys, D.: Prenatally detected fragile X females: long-term follow-up studies show high risk of mental impairment. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15-May 1; 43(1-2): 96-102, 1992.
- Brown, W. T.; Nolin, S.; Houck, G. Jr; Ding, X.; Glicksman, A.; Li, S. Y.; Stark-Houck, S.; Brophy, P.; Duncan, C.; Dobkin, C.; Jenkins, E.: Prenatal diagnosis and carrier screening for fragile X by PCR. *Am J Med Genet.* Jul 12, 64 (1): p191-5, 1996.
- Brown, W. T.; Zhong, N.; Dobkin, C.: Positive fragile X microsatellite associations point to a common mechanism of dynamic mutation evolution. *Am. J. Hum. Genet.* Mar. 58 (3): 641-3, 1996.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Butler, M. G.; Pratesi, R.; Vnencak-Jones, C. L.: Molecular genetic screening in cytogenetically normal mentally retarded males with manifestations of fragile X syndrome [letter]. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 315-6, 1994.
- Camerino, G.; Mattei, M. G.; Mattei, J. F.; Jaye, M.; Mandel, J. L.: Close linkage of fragile X-linked mental retardation syndrome to haemophilia B and transmission through a normal male. *Nature* 306: 701-707, 1983.
- Cao, J.; Tarleton, J.; Barberio, D.; Davidow, L. S.: A simple fragile X PCR assay with 7-deazaguanine-substituted DNA visualized by ethidium bromide. *Mol. Cell. Probes.* Apr; 8(2): 177-80, 1994.
- Carmi, R.; Meryash, D. L.; Wood, J.; Gerald, P. S.: Fragile-X syndrome ascertained by the presence of macro-orchidism in a 5-month-old infant. *Pediatrics* 74: 883-886, 1984.
- Carpenter, N. J.; Leichtman L. G.; say B.: Fragile X-linked mental retardation. *AM. J. Dis. child.* 136: 392-398, 1982.
- Castellvi-Bel, S.; Mila, M.; Soler, A.; Carrio, A.; Sanchez, A.; Villa, M.; Jimenez, M. D.; Estivill, X.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome: (CGG)<sub>n</sub> expansion and methylation of chorionic villus samples. *Prenat-Diagn.* Sep; 15(9): 801-7, 1995.
- Castiglione-Morelli, M. A.; Stier, G.; Gibson, T.; Joseph, C.; Musco, G.; Pastore, A.; Trave, G.: The KH module has an alpha beta fold. *FEBS-Lett.* Jan 23; 358(2): 193-8, 1995.
- Chastain, P. D.; Eichler, E. E.; Kang, S.; Nelson, D. L.; Levene, S. D.; Sinden, R. R.: Anomalous rapid electrophoretic mobility of DNA containing triplet repeats associated with human disease genes. *Biochemistry.* Dec 12; 34(49): 16125-31, 1995.
- Chakravarti, A.: Fragile X founder effect? *Nature Genet.* 1: 237-238, 1992.
- Chen X; Mariappan SV; Catasti P; Ratliff R; Moyzis RK; Laayoun A; Smith SS; Bradbury EM; Gupta G; Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure

- and biological implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. May 23; 92 (11): p5199-203, 1995.
- Chiurazzi, P.; Kozak, L.; Neri, G.: Unstable triplets and their mutational mechanism: size reduction of the CGG repeat vs. germline mosaicism in the fragile X syndrome. Am. J. Med. Genet. Jul 15; 51(4): 517-21, 1994.
- Chiurazzi, P.; Macpherson, J.; Sherman, S.; Neri, G.: Significance of linkage disequilibrium between the fragile X locus and its flanking markers [editorial]. Am. J. Med. Genet. Jul 12, 64 (1): p203-8, 1996A.
- Chiurazzi, P.; Destro-Bisol, G.; Genuardi, M.; Oostra, B.; Spedini, G.; Neri, G.: Extended gene diversity at the FMR1 locus and neighbouring CA repeats in a sub-Saharan population. Am. J. Med. Genet. Jul 12, 64 (1): p216-9, 1996B.
- Chiurazzi, P.; Genuardi, M.; Kozak, L.; Giovannucci-Uzielli, M. L.; Bussani, C.; Dagna-Bricarelli, F.; Grasso, M.; Perroni, L.; Sebastio, G.; Sperandio, M. P.; Oostra, B. A.; Neri, G.: Fragile X founder chromosomes in Italy: a few initial events and possible explanation for their heterogeneity. Am. J. Med. Genet. Jul 12, 64 (1): p209-15, 1996C.
- Chong, S. S.; Eichler, E. E.; Nelson, D. L.; Hughes, M.R.: Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. Am. J. Med. Genet. Jul 15; 51(4): 522-6, 1994.
- Choo, K. H.; George, D.; Fillby, G.; Halliday, J. L.; Leversha, M.; Webb, G.; Danks, D. M.: Linkage analysis of X-linked mental retardation with and without fragile-X using factor IX gene probe. (Letter) Lancet II: 349 only, 1984.
- Clarke, A.; Bradley, D.; Gillespie, K.; Rees, D.; Holland, A.; Thomas, N. S.: Fragile X mental retardation and the iduronate sulphatase locus: testing Laird's model of fra(X) inheritance. Am. J. Med. Genet. Apr 15-May 1; 43(1-2): 299-306, 1992.
- Conway GS; Hettiarachchi S; Murray A; Jacobs PA.: Fragile X premutations in familial premature ovarian failure [letter; comment]. Lancet Jul 29; 346 (8970); p309-10, 1995.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Cooper W. G.: Evolutionary origin of expandable G-C-rich triplet repeat DNA sequences. *Biochem. Genet.* Jun; 33 (5-6): p173-81, 1995.
- Daker, M. G.; Chidiac, P.; Fear, C. N.; Berry, A. L.: Fragile X in a normal male: a cautionary tale. *Lancet I*: 780, 1981.
- Dahl, N.; Hu, L. J.; Chery, M.; Fardeau, M.; Gilgenkrantz, S.; Nivelon-Chevallier, A.; Sidaner-Noisette, I.; Mugneret, F.; Gouyon, J. B.; Gal, A.: Myotubular myopathy in a girl with a deletion at Xq27-q28 and unbalanced X inactivation assigns the MTM1 gene to a 600-kb region. *Am. J. Hum. Genet.* May; 56(5): 1108-15, 1995.
- Dar, H.; Schaap, T.; Bait-Or, H.; Borochowitz, Z.; Gelman-Kohan, Z.; Chemke, T.; Chaki, R.; Cohen, H.; Falik-Borenstein, Z.; Chemke, J.: Ethnic distribution of the fragile X syndrome in Israel: evidence of founder chromosomes(?). *Israel J. Med. Sci.* 31: 323-325, 1995.
- Davidow, L. S.; Barberio, D.; Cao, .J; McCormick, I.: An improved fragile X Southern blot probe without the CGGs eliminates background bands. *Mol. Cell. Probes.* Jun; 8(3): 241-4, 1994.
- De Boulle, K.; Verkerk, A. J. M. H.; Reyniers, E.; Vits, L.; Hendrickx, J.; Van Roy, B.; Van Den Bos, F.; de Graaff, E.; Oostra, B. A.; Willems, P. J.: A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* 3: 31-35, 1993.
- Deelen, W.; Bakker, C.; Halley, D. J.; Oostra, B.A.: Conservation of CGG region in FMR1 gene in mammals. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 513-6, 1994.
- De Graaff, E.; Rouillard, P.; Willems, P. J.; Smits, A. P.; Rousseau, F.; Oostra, B. A.: Hotspot for deletions in the CGG repeat region of FMR1 in fragile X patients. *Hum. Mol. Genet.* Jan. 4 (1): p45-9, 1995 a.
- De Graaff, E.; Willemsen, R.; Zhong, N.; de-Die-Smulders, C. E.; Brown, W. T.; Freling, G.; Oostra, B.: 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.* Sep; 57(3): 609-18, 1995 b.
- Deissler, H.; Behn-Krappa, A.; Doerfler, W. J.: Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that bind specifically to the unstable tandem repeat (CGG)<sub>n</sub> in the human FMR1 gene. *Biol. Chem.* Feb 23; 271 (8): p4327-34, 1996.
- Dennis, N. R.; Curtis, G.; Macpherson, J. N.; Jacobs, P. A. Two families with Xq27.3 fragility, no detectable insert in the FMR-1 gene, mild mental impairment, and absence of the Martin-Bell phenotype. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15-May 1; 43(1-2): 232-6, 1992.
- De Vries, B. B. A.; Fryns, J.-P.; Butler, M. G.; Canziani, F.; Wesby-van Swaay, E.; van Hemel, J. O.; Oostra, B. A.; Halley, D. J. J.; Niermeijer, M. F.: Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype. *J. Med. Genet.* 30: 761-766, 1993.
- De Vries, B. B.; Niermeijer, M. F.: The Prader-Willi-like phenotype in fragile X patients: a designation facilitating clinical (and molecular) differential diagnosis. *J. Med. Genet.* Oct; 31(10): 820, 1994.
- De Vries, B. B. A.; Robinson, H.; Stolte-Dijkstra, I.; Tjon Pian G, C. V.; Dijkstra, P. F.; van Doorn, J.; Halley, D. J. J.; Oostra, B. A.; Turner, G.; Niermeijer, M. F.: General overgrowth in the fragile X syndrome: variability in the phenotypic expression of the FMR1 gene mutation. *J. Med. Genet.* 32: 764-769, 1995.
- De Vries, B. B.; Wiegers, A. M.; Smits, A. P.; Mohkamsing, S.; Duivenvoorden, H. J.; Fryns, J. P.; Curfs, L. M.; Halley, D. J.; Oostra, B. A.; van den Ouweland, A. M.; Niermeijer, M. F.: Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am. J. Hum. Genet.* May 58 (5) p1025-32, 1996.
- Devys, D.; Biancalana, V.; Rousseau, F.; Boue, J.; Mandel, J. L.; Oberle, I.: Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- development. *Am. J. Med. Genet.* 43: 208-216, 1992.
- Devys, D.; Lutz, Y.; Rouyer, N.; Bellocq, J. P.; Mandel, J. L.: The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genet.* 4: 335-340, 1993.
- Dreesen, J. C. F. M.; Geraedts, J. P. M.; Dumoulin, J. C. M.; Evers, J. L. H.; Pieters, M. H. E. C.: RS46 (DXS548) genotyping of reproductive cells: approaching preimplantation testing of the fragile-X syndrome. *Hum. Genet.* 96: 323-329, 1995.
- Dreesen, J. C.; Smits, A. P.; van-Oost, B.A.: Recombination of DXS548 (RS46) with the FRAXA locus [letter]. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 535-7, 1994.
- Dutch-Belgian Fragile X Consortium: Fmrl knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. *Cell* 78: 23-33, 1994.
- Eichler, E. E.; Kunst, C. B.; Lugenbeel, K. A.; Ryder, O. A.; Davison, D.; Warren, S. T.; Nelson, D. L.: Evolution of the cryptic FMR1 CGG repeat. *Nat. Genet.* Nov; 11(3): 301-8, 1995.
- Eichler, E. E.; Nelson, D. L.: Genetic variation and evolutionary stability of the FMR1 CGG repeat in six closed human populations. *Am. J. Med. Genet.* Jul 12. 64 (1): p220-5, 1996.
- Eichler, E. E.; Richards, S.; Gibbs, R. A.; Nelson, D. L.: Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1147-1153, 1993.
- Einfeld, S. L.; Tonge, B. J.; Florio, T.: Behavioural and emotional disturbance in fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 386-91, 1994.
- El-Aleem, A. A.; Bohm, I.; Temtamy, S.; el-Awady, M.; Awadalla, M.; Schmidtke, J.; Stuhmann, M.: Direct molecular analysis of the fragile X syndrome in a sample of Egyptian and German patients using non-radioactive PCR and Southern blot followed by chemiluminescent detection. *Hum. Genet.* Nov; 96(5): 577-84, 1995.
- Engstrom, C.; Thornlund, A. S.; Johansson, E. L.; Langstrom, M.; Chotai, J.; Adolfsson, R.; Nylander, P. O.: Anticipation in unipolar affective disorder. *J. Affect. Disord.* Oct 9; 35(1-2):



- 31-40, 1995.
- Erster, S. H.; Brown, W. T.; Goonewardena, P.; Dobkin, C. S.; Jenkins, E. C.; Pergolizzi, R. G.: Polymerase chain reaction analysis of fragile X mutations. *Hum. Genet.* Sep-Oct; 90(1-2): 55-61, 1992.
- Escalante, J.; Grunspun, H.; Frota-Pessoa, O.: Severe sex-linked mental retardation. *J. Genet. Hum.* 19: 137-140, 1971.
- Feng, Y.; Lakkis, L.; Devys, D.; Warren, S.T.: Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. *Am. J. Hum. Genet.* Jan; 56(1): 106-13, 1995. (a)
- Feng, Y.; Zang, F. P.; Lokey, I. K.; Chastain, J. L.; Lakkis, L.; Eberhart, D.; Warren, S. T.: Translational suppression by trineucleotide repeat expansion at FMR1. *Science* 5 May; 268: 731-734, 1995. (b)
- Filippi, G.; Arslanian, A.; Dagna-Bricarelli, F.; Pierluigi, M.; Grasso, M.; Rinaldi, A.; Rocchi, M.; Siniscalco, M.: Premutation for the Martin-Bell syndrome analyzed in a large pedigree segregating also for G6PD-deficiency. I. A working hypothesis on the nature of the FRAX-mutations. *Am. J. Med. Genet.* 40: 387-394, 1991.
- Filippi, G.; Rinaldi, A.; Archidiacono, N.; Rocchi, M.; Balazs, I.; Siniscalco, M.: Linkage between G6PD and fragile-X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 15: 113-119, 1983.
- Fisch, G. S.; Holden, J. J.; Simensen, R.; Carpenter, N.; Howard-Peebles, P. N.; Maddalena, A.; Sandgrund, A.; Jacques, J. R.; McGann, B.: Is fragile X syndrome a pervasive developmental disability? Cognitive ability and adaptive behavior in males with the full mutation. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 346-52, 1994 a.
- Fisch, G. S.; Nelson, D. L.; Snow, K.; Thibodeau, S. N.; Chalifoux, M.; Holden, J. J.: Reliability of diagnostic assessment of normal and premutation status in the fragile X syndrome using DNA testing. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 339-45, 1994 b.
- Flannery, A. V.; Hirst, M. C.; Knight, S. J.; Ritchie, R. J.;

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Davies, K. E.: The fragile X syndrome. *Biochim. Biophys. Acta.* Jun 9; 1271(2-3): 293-303, 1995.
- Follette, P. J.; Laird, C. D.: Estimating the stability of the proposed imprinted state of the fragile-X mutation when transmitted by females. *Hum. Genet.* 88: 335-343, 1992.
- Froster-Iskenius, U.; Schulze, A.; Schwinger, E.: Transmission of the marker X syndrome trait by unaffected males: conclusions from studies of large families. *Hum. Genet.* 67: 419-427, 1984.
- Fryns, J. P.: The fragile X syndrome: a study of 83 families. *Clin. Genet.* 26: 497-528, 1984.
- Fryns, J. P.; Van Den Berghe, H.: Transmission of fragile X(q27) from normal male(s). *Hum. Genet.* 61: 262-263, 1982.
- Fryns, J. P.; Curfs, L. M.; Cassiman, J. J.; van-den-Berghe, H.: The fragile-X syndrome after the discovery of the FMR-1 gene. The clinical geneticist faced with the unravelled enigmas and persisting difficulties in genetic counseling [editorial]. *Genet. Couns.* 3(4): 175-7, 1992.
- Fu, Y.-H.; Kuhl, D. P. A.; Pizzuti, A.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J. S.; Richards, S.; Verkerk, A. J. M. H.; Holden, J. J. A.; Fenwick, R. G., Jr.; Warren, S. T.; Oostra, B. A.; Nelson, D. L.; Caskey, C. T.: Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-1058, 1991.
- Gedeon, A. K.; Baker, E.; Robinson, H.; Partington, M. W.; Gross, B.; Manca, A.; Korn, B.; Poustka, A.; Yu, S.; Sutherland, G. R.; Mulley, J. C.: Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genet.* 1: 341-344, 1992.
- Gedeon, A. K.; Meinanen, M.; Ades, L. C.; Kaariainen, H.; Gecz, J.; Baker, E.; Sutherland, G. R.; Mulley, J. C.: Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: identification of a gene near FRAXE. *Am. J. Hum. Genet.* Apr; 56(4): 907-14, 1995.
- Gerald, P. S.: X-linked mental retardation and an X-chromosome marker. (Editorial) *New Eng. J. Med.* 303: 696-697, 1980.
- Gecz, J.; Gedeon, A. K.; Sutherland, G. R.; Mulley, J. C.:

- Identification of the gene FMR2, associated with FRAAXE mental retardation. *Nat Genet.* May. 13 (1): p105-8, 1996.
- Giangreco, C. A.; Steele, M. W.; Aston, C. E.; Cummins, J. H.; Wenger, S. L.: A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J. Pediatr.* Oct. 129 (4): p611-4, 1996.
- Giannelli, F.; Morris, A. H.; Garrett, C.; Daker, M.; Thurston, C.; Smith, C. A. B.: Genetic heterogeneity of X-linked mental retardation with fragile X: association of tight linkage to factor IX and incomplete penetrance in males. *Ann. Hum. Genet.* 51: 107-124, 1987.
- Giraud, F.; Ayme, S.; Mattei, J. F.; Mattei, M. G.: Constitutional chromosomal breakage. *Hum. Genet.* 34: 125-136, 1976.
- Glover, T. W.: FUDR induction of the X-chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 234-242, 1981.
- Goodman, R. M.; Strauss, S.; Friedman, E.; Chaki, R.: Ovarian size in the fragile X mental retardation syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 26: 17-18, 1987.
- Griffiths, M. J.; Strachan, M. C.: A single lymphocyte culture for fragile X induction and prometaphase chromosome analysis. *J. Med. Genet.* 28: 837-839, 1991.
- Gu, Y.; Shen, Y.; Gibbs, R. A.; Nelson, D. L.: Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAAXE CCG repeat and CpG island. *Nat Genet.* May. 13 (1): p109-13, 1996.
- Haaf, T.; Sirugo, G.; Kid, K. K.; Ward, D. C.: Chromosomal localization of long trinucleotide repeats in the human genome by fluorescence in situ. *Nature Genetics.* Feb. 12(2): 183-185, 1996.
- Haataja, R.; Vaisanen, M.-L.; Li, M.; Ryyanen, M.; Leisti, J.: The fragile X syndrome in Finland: demonstration of a founder effect by analysis of microsatellite haplotypes. *Hum. Genet.* 94: 479-483, 1994.
- Haddad, L. A.; Mingroni-Netto, R. C.; Vianna-Morgante, A. M.;

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Pena, S. D.: A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet.* Jun 97 (6) p808-12, 1996.
- Hagerman, R. J.; Hull, C. E.; Safanda, J. F.; Carpenter, I.; Staley, L. W.; O'Connor, R. A.; Seydel, C.; Mazzocco, M. M.; Snow, K.; Thibodeau, S. N.; et al.: High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 298-308, 1994.
- Hagerman, R. J.; Staley, L. W.; O'Conner, R.; Lugenbeel, K.; Nelson, D.; McLean, S. D.; Taylor, A.: Learning-disabled males with a fragile X CGG expansion in the upper premutation size range. *Pediatrics.* Jan. 97 (1): p122-6, 1996.
- Hagerman, R. J.; Synhorst, D. P.: Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 123-131, 1984.
- Hagerman, R. J.; Van Housen, K.; Smith, A. C. M.; McGavran, L.: Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 111-121, 1984.
- Hagerman, R. J.; Wilson, P.; Staley, L. W.; Lang, K. A.; Fan, T.; Uhlhorn, C.; Jewell-mart, S.; Hull, C.; Drisko, J.; Flom, K.; et al.: Evaluation of school children at high risk for fragile X syndrome utilizing buccal cell FMR-1 testing. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 474-81, 1994.
- Halley, D.; Van-Den-Ouweland, A.; Deelen, W.; Verma, I.; Oostra, B.: Strategy for reliable prenatal detection of normal male carriers of the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 471-3, 1994.
- Hallmayer, J.; Pintado, E.; Lotspeich, L.; Spiker, D.; McMahon, W.; Petersen, P. B.; Nicholas, P.; Pingree, C.; Kraemer, H. C.; Wong, D. L.; et al.: Molecular analysis and test of linkage between the FMR-1 gene and infantile autism in multiplex families. *Am. J. Hum. Genet.* Nov; 55(5): 951-9, 1994.
- Hamel, B. C.; Smits, A. P.; de-Graaff, E.; Smeets, D. F.; Schoute, F.; Eussen, B. H.; Knight, S. J.; Davies, K. E.;

- Assman-Hulsmans, C. F.; Oostra, B. A.: Segregation of FRAXE in a large family: clinical, psychometric, cytogenetic, and molecular data. *Am. J. Hum. Genet.* Nov; 55(5): 923-31, 1994.
- Hanzlik, A. J.; Osemlak-Hanzlik, M. M.; Hauser, M. A.; Kurnit, D. M.: A recombination-based assay demonstrates that the fragile X sequence is transcribed widely during development. *Nature Genet.* 3: 44-48, 1993.
- Harley, H. G.; Brook, J. D.; Rundle, S. A.; Crow, S.; Reardon, W.; Buckler, A. J.; Harper, P. S.; Housman, D. E.; Shaw, D. J.: Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature.* Feb 6; 355(6360): 545-6, 1992.
- Harvey, J.; Judge, C.; Wiener, S.: Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *J. Med. Genet.* 14: 46-50, 1977.
- Heitz, D.; Devys, D.; Imbert, G.; Kretz, C.; Mandel, J.L.: Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J. Med. Genet.* Nov; 29(11): 794-801, 1992.
- Hergersberg, M.; Matsuo, K.; Gassmann, M.: tissue-specific expression of a FMR1/ Beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Human Mol. Genet.* Mar 4: 359-366, 1995.
- Hinds, H. L.; Ashley, C. T.; Sutcliffe, J. S.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.; Housman, D. E.; Schalling, M.: Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 3: 36-43, 1993.
- Hinton, V.J.; Halperin, J. M.; Dobkin, C. S.; Ding, X. H.; Brown, W. T.; Mizejeski, C. M.: Cognitive and molecular aspects of fragile X. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* Aug; 17(4): 518-28, 1995.
- Hirst, M. C.; Barnicoat, A.; Flynn, G.; Wang, Q.; Daker, M.; Buckle, V. J.; Davies, K. E.; Bobrow, M.: The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum. Molec. Genet.* 2: 197-200, 1993 a.
- Hirst, M. C.; Grewal, P. K.; Davies, K. E.: Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum. Mol.*

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Genet. Sep; 3(9): 1553-60, 1994.
- Hirst, M.; Grewal, P.; Flannery, A.; Slatter, R.; Maher, E.; Barton, D.; Fryns, J. P.; Davies, K.: Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 67-74, 1995.
- Hirst, M. C.; Knight, S. J.; Bell, M. V.; Super, M.; Davies, K. E.: The fragile X syndrome. *Clin. Sci. Colch. Sep;* 83(3): 255-64, 1992.
- Hirst, M. C.; Knight, S. J. L.; Christodoulou, Z.; Grewal, P. K.; Fryns, J. P.; Davies, K. E.: Origins of the fragile X syndrome mutation. *J. Med. Genet.* 30: 647-650, 1993 b.
- Hirtzlin, I.; Mandel, J. L.; Lanoe, J. L.; Fardeau-Gautier, M.: Comparative analysis of the costs of cytogenetic techniques and molecular biology techniques in the diagnosis of fragile X disease. *Rev. Epidemiol. Sante. Publique.* 43(3): 205-14, 1995.
- Hofker, M. H.; Bergen, A. A. B.; Skraastad, M. I.; Carpenter, N. J.; Veenema, H.; Connor, J. M.; Bakker, E.; van Ommen, G. J. B.; Pearson, P. L.: Efficient isolation of X chromosome-specific single copy probes from a cosmid library of a human X/hamster hybrid-cell line: mapping of new probes close to the locus for X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 40: 312-328, 1987.
- Hofstee, Y.; Arinami, T.; Hamaguchi, H.: Comparison between the cytogenetic test for fragile X and the molecular analysis of the FMR-1 gene in Japanese mentally retarded individuals. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 466-70, 1994.
- Howard-Peebles, P. N.; Stoddard, G. R.: Familial X-linked mental retardation with a marker X chromosome and its relationship to macroorchidism. *Clin. Genet.* 17: 125-128, 1980.
- Iida, T.; Nakahori, Y.; Tsutsumi, O.; Taketani, Y.; Nakagome, Y.: The CpG island of the FMR-1 gene is methylated differently among embryonic tissues: implication for prenatal diagnosis. *Hum. Reprod.* Aug; 9(8): 1471-3, 1994.
- Jacky, P. B.; Dill, F. J.: Expression in fibroblast culture of the satellited-X chromosome associated with familial sex-linked

- mental retardation. *Hum. Genet.* 53: 267-269, 1980.
- Jacobs, P. A.; Hunt, P. A.; Mayer, M.; Wang, J.-C.; Boss, G. R.; Erbe, R.: Expression of the marker(X)(q28) in lymphoblastoid cell lines. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 552-557, 1982.
- Jenkins, E. C.; Brown, W. T.; Brooks, J.; Duncan, C. J.; Rudelli, R. D.; Wisniewski, H. M.: Experience with prenatal fragile X detection. *Am. J. Med. Genet.* 17: 215-239, 1984.
- Jenkins, E. C.; Brown, W. T.; Duncan, C. J.; Brooks, J.: Demonstration of the fragile X chromosome in amniotic fluid cells. (Abstract) *Clin. Res.* 30: 292A only, 1982.
- Jenkins, E. C.; Morys, I.; Henderson, J.; Genovese, M.; Carter, M.; Li, S. Y.; Houck, G. E. Jr; Ding, X.; Stark-Houck, S. L.; Dobkin, C. S.; et al.: Fragile X induction systems in CVS cultures: effect on cytogenetic, PCR, and genomic Southern Blot DNA analyses of the FMR-1 gene. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 436-42, 1994.
- Johnson, G. E.: Contribution to the psychology and pedagogy of feeble-minded children. *J. Psycho-asthenics* 2: 26-32, 1897.
- Johnson, V. P.; Carpenter, N. J.; Skorey, P. A.: Martin-Bell syndrome segregating in a large kindred with normal transmitting males: clinical, cytogenetic, and linkage study. *Am. J. Med. Genet.* 38: 275-282, 1991.
- Kang, S.; Ohshima, K.; Shimizu, M.; Amirhaeri, S.; Wells, R. D.: Pausing of DNA synthesis in vitro at specific loci in CTG and CGG triplet repeats from human hereditary disease genes. *J. Biol. Chem.* Nov 10; 270 (45): p 27014-21, 1995.
- Kaplan, G.; Kung, M.; McClure, M.; Cronister, A.: Direct mutation analysis of 495 patients for fragile X carrier status/proband diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 501-2, 1994.
- Khalifa, M. M.; Reiss, A. L.; Migeon, B. R.: Methylation status of genes flanking the fragile site in males with the fragile-X syndrome: a test of the imprinting hypothesis. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 744-753, 1990.
- Khandjian, E. W.; Corbin, F.; Woerly, S.; Rousseau, F.: The fragile X mental retardation protein is associated with

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- ribosomes. *Nature Genet.* 12: 91-93, 1996.
- Kinnell, H. G.: Fragile-X disorder associated with antisocial personality. (Letter) *Lancet* II: 1104 only, 1982.
- Kirkilionis, A. J.; Chudley, A. E.; Greenberg, C. R.; Yan, D. L.; McGillivray, B.; Hamerton, J. L.: Transmission of the fra(X) haplotype from three nonpenetrant brothers to their affected grandsons. *Am. J. Med. Genet.* 43: 588-591, 1992.
- Kirchgeessner, C. U.; Warren, S. T.; Willard, H. F. : inactivation of the FMR1 fragile X mental retardation gene. *J. Med. Genet.* 32: 925-929, 1995.
- Knight, S. J. L.; Flannery, A. V.; Hirst, M. C.; Campbell, L.; Christodoulou, Z.; Phelps, S. R.; Pointon, J.; Middleton Price, H. R.; Barnicoat, A.; Pembrey, M. E.; Holland, J.; Oostra, B. A.; Bobrow, M.; Davies, K. E.: Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAAXE mental retardation. *Cell* 74: 127-134, 1993.
- Knight, S. J.; Hirst, M. C.; Roche, A.; Christodoulou, Z.; Huson, S. M.; Winter, R.; Fitchett, M.; McKinley, M. J.; Lindenbaum, R. H.; Nakahori, Y.: Molecular studies of the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* Apr-May ; 43(1-2): 217-23, 1992.
- Knight SJ; Ritchie RJ; Chakrabarti L; Cross G; Taylor GR; Mueller RF; Hurst J; Paterson J; Yates JR; Dow DJ; Davies KE.: A study of FRAAXE in mentally retarded individuals referred for fragile X syndrome (FRAXA) testing in the United Kingdom. *Am. J. Hum. Genet.* May , 58 (5): p906-13, 1996.
- Kolehmainen, K.: Population genetics of fragile X: a multiple allele model with variable risk of CGG repeat expansion. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 428-35, 1994.
- Kolehmainen, K.; Karant, Y.: Modeling methylation and IQ scores in fragile X females and mosaic males. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 328-38, 1994.
- Krawczun, M. S.; Jenkins, E. C.; Brown, W. T.: Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum. Genet.* 69: 209-211, 1985.



- Kruyer, H.; Mila, M.; Glover, G.; Carbonell, P.; Ballesta, F.; Estivill, X.: Fragile X syndrome and the (CGG)<sub>n</sub> mutation: two families with discordant MZ twins. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 437-442, 1994.
- Kunst, C. B.; Zerylnick, C.; Karickhoff, L.; Eichler, E.; Bullard, J.; Chalifoux, M.; Holden, J. J. A.; Torroni, A.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.: FMR1 in global populations. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 513-522, 1996.
- Laird, C. D.: Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile X syndrome of mental retardation. *Genetics* 117: 587- 599, 1987.
- Laird, C. D.: Possible erasure of the imprint on a fragile X chromosome when transmitted by a male. *Am. J. Med. Genet.* 38: 391-395, 1991.
- Laird, C. D.; Jaffe, E.; Karpen, G.; Lamb, M.; Nelson, R.: Fragile sites in human chromosomes as regions of late-replicating DNA. *Trends Genet.* 3: 274-281, 1987.
- Laird, C. D.; Lamb, M. M.; Thorne, J. L.: Two progenitor cells for human oogonia inferred from pedigree data and the X-inactivation imprinting model of the fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 696-719, 1990.
- Langenbeck, U.; Schmidtke, J.; Bartels, I.; Hansmann, I.; Knuppel, H.: Mean corpuscular hemoglobin is increased in Martin-Bell syndrome. *Hum. Genet.* 66: 365-366, 1984.
- La-Spada, A. R.; Paulson, H. L.; Fischbeck, K. H.: Trinucleotide repeat expansion in neurological disease. *Ann. Neurol.* Dec; 36(6): 814-22, 1994.
- Laval, S. H.; Blair, H. J.; Hirst, M. C.; Davies, K. E.; Boyd, Y.: Mapping of FMR1, the gene implicated in fragile X-linked mental retardation, on the mouse X chromosome. *Genomics* 12: 818-821, 1992.
- Laxova, R.: Fragile X syndrome. *Adv. Pediatr.* 41: 305-42, 1994.
- Levinson, G.; Maddalena, A.; Palmer, F. T.; Harton, G. L.; Bick, D. P.; Howard-Peebles, P. N.; Black, S. H.; Schulman, J.D.: Improved sizing of fragile X CCG repeats by nested polymerase

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- chain reaction. *Am. J. Med. Genet.* Jul; 51(4): 527-34, 1994.
- Lewis, K. E.; Lubetsky, M. J.; Wenger, S. L.; Steele, M. W.: Chromosomal abnormalities in a psychiatric population. *Am. J. Med. Genet.* Feb 27; 60(1): 53-4, 1995.
- Loesch, D. Z.; Hay, D. A.: Clinical features and reproductive patterns in fragile X female heterozygotes. *J. Med. Genet.* 25: 407-414, 1988.
- Loesch, D. Z.; Huggins, R. M.; Hoang, N. H.: Growth in stature in fragile X families: a mixed longitudinal study. *Am. J. Med. Genet.* Sep 11; 58 (3): p249-56, 1996.
- Loesch, D. Z.; Huggins, R.; Petrovic, V.; Slater, H.: Expansion of the CGG repeat in fragile X in the FMR1 gene depends on the sex of the offspring. *Am. J. Hum. Genet.* Dec; 57(6): 1408-13, 1995.
- Lubs, H.; Travers, H.; Lujan, E.; Carroll, A.: A large kindred with X-linked mental retardation, marker X and macroorchidism. *Am. J. Med. Genet.* 17: 145-157, 1984.
- Lubs, H. A., Jr.: A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21: 231-244, 1969.
- Lugenbeel, K. A.; Peier, A. M.; Carson, N. L.; Chudley, A. E.; Nelson, D. L.: Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 10: 483-485, 1995.
- Luo, S.; Robinson, J. C.; Reiss, A. L., Migeon B.R.: DNA methylation of the fragile X locus in somatic and germ cells during fetal development: relevance to the fragile X syndrome and X inactivation. *Somatic cell and molecular genetics.* 19: 393- 404, 1993.
- Macpherson, J. N.; Bullman, H.; Youngs, S. A.; Jacobs, P. A.: Insert size and flanking haplotype in fragile X and normal population: Possible multiple origins for the fragile X mutation. *Hum. Mol. Genet.* 3: 339-405; 1994.
- Macpherson, J. N.; Curtis, G.; Crolla, J. A.; Dennis, N.; Migeon, B.; Grewal, P.K.; Hirst, M. C.; Davies, K. E.; Jacobs, P. A.: Unusual (CGG)<sub>n</sub> expansion and recombination in a family with

- fragile X and DiGeorge syndrome. *J. Med. Genet.* Mar; 32(3): 236-9, 1995.
- Macpherson, J. N.; Nelson, D. L.; Jacobs, P. A.: Frequent small amplifications in the FMR-1 gene in fra(X) families: limits to the diagnosis of 'premutations'. *J. Med. Genet.* Nov; 29(11): 802-6, 1992.
- Maddalena, A.; Hicks, B. D.; Spence, W. C.; Levinson, G.; Howard-Peebles, P. N.: Prenatal diagnosis in known fragile X carriers. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 490-6, 1994.
- Malmgren, H.; Gustavson, K. H.; Wahlstrom, J.; Arpi Henriksson, I.; Bensch, J.; Pettersson, U.; Dahl, N.: Infantile autism-fragile X: molecular findings support genetic heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* Dec 1; 44(6): 830-3, 1992.
- Mandel, J.-L.; Hagerman, R.; Froster, U.; Brown, W. T.; Jenkins, E. C.; Jacobs, P.; Turner, G.; Lubs, H.; Neri, G.: Fifth International Workshop on the Fragile X and X-Linked Mental Retardation. *Am. J. Med. Genet.* 43: 5-27, 1992.
- Mandel, J. L.; Heitz, D.: Molecular genetics of the fragile-X syndrome: a novel type of unstable mutation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* Jun; 2(3): 422-30, 1992.
- Mariappan, S. V.; Catasti, P.; Chen, X.; Ratliff, R.; Moyzis, R. K.; Bradbury, E. M.; Gupta, G.: Solution structures of the individual single strands of the fragile X DNA triplets (GCC)<sub>n</sub> (GGC)<sub>n</sub>. *Nucleic Acids Res.* Feb 15; 24 (4): p784-92, 1996.
- Matilainen, R.; Airaksinen, E.; Mononen, T.; Launiala, K.; Kaariainen, R.: A population-based study on the causes of mild and severe mental retardation. *Acta. Paediatr.* Mar; 84(3): 261-6, 1995.
- Martin, J. P.; Bell, J.: A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psychiat.* 6: 154-157, 1943.
- Martin, R. H.; Lin, C. C.; Mathies, B. J.; Lowry, R. B.: X-linked mental retardation with macro-orchidism and marker-X chromosomes. *Am. J. Med. Genet.* 7: 433-441, 1980.
- Martinez, F.; Badia, L.; Prieto, F.: A fragile X family with high penetrance in females: risk heterogeneity?. *Clin. Genet.* Jul;

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- 42(1): 22-6, 1992.
- Mattei, J. F.; Mattei, M. G.; Aumeras, C.; Auger, M.; Giraud, F.: X-linked mental retardation with the fragile X: a study of 15 families. *Hum. Genet.* 59: 281-289, 1981.
- Mazurczak, T.; Bocian, E.; Milewski, M.; Obersztyn, E.; Stanczak, H.; Bal, J.; Szamotulska, K.; Karwacki, M. W.: Frequency of Fra X syndrome among institutionalized mentally retarded males in Poland. *Am J Med Genet.* Jul 12. 64 (1): p184-6, 1996.
- McConkie-Rosell, A.; Lachiewicz, A. M.; Spiridigliozzi, G. A.; Tarleton, J.; Schoenwald, S.; Phelan, M. C.; Goonewardena, P.; Ding, X.; Brown, W. T.: Evidence that methylation of the FMR-1 locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 800-809, 1993.
- McMurray, C. T.: Mechanisms of DNA expansion. *Chromosoma.* 104: 2-13. 1995.
- Meijer, H.; de Graaff, E.; Merckx, D. M. L.; Jongbloed, R. J. E.; de Die-Smulders, C. E. M.; Engelen, J. J. M.; Fryns, J. P.; Curfs, P. M. G.; Oostra, B. A.: A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 3: 615-620, 1994.
- Meryash, D. L.; Cronk, C. E.; Sachs, B.; Gerald, P. S.: An anthropometric study of males with the fragile-X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 159-174, 1984.
- Mila, M.; Castellvi-Bel, S.; Sanchez, A.; Lazaro, C.; Villa, M.; Estivill, X.: Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR1 gene. *J Med Genet* Apr. 33 (4): p338-40, 1996.
- Mila, M.; Kruyer, H.; Glover, G.; Sanchez, A.; Carbonell, P.; Castellvi-Bell, S.; Volpini, V.; Rossell, J.; Gabarron, J.; Lopez, I.; et al.: Molecular analysis of the (CGG)<sub>n</sub> expansion in the FMR-1 gene in 59 Spanish fragile X syndrome families. *Hum. Genet.* Oct; 94(4): 395-400, 1994.
- Mingroni-Netto, R. C.; Fernandes, J. G.; Vianna-Morgante, A. M.: Relationship of expansion of CGG repeats and X-inactivation

- with expression of fra(X)(q27.3) in heterozygotes. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 443-6, 1994.
- Mitchell, J. E.; Newbury, S. F.; McClellan, J. A.: Compact structures of d(CNG)<sub>n</sub> oligonucleotides in solution and their possible relevance to fragile X and related human genetic diseases. *Nucleic. Acids. Res.* Jun 11; 23(11): 1876-81, 1995.
- Morris, A.; Morton, N. E.; Collins, A.; Lawrence, S.; Macpherson, J. N.: Evolutionary dynamics of the FMR1 locus. *Ann. Hum. Genet.* Jul; 59 ( Pt 3): 283-9, 1995.
- Morris, A.; Morton, N. E.; Collins, A.; Macpherson, J.; Nelson, D.; Sherman, S.: An n-allele model for progressive amplification in the FMR1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* May 23; 92(11): 4833-7, 1995.
- Morton, N. E.; Macpherson, J. N.: Population genetics of the fragile-X syndrome: multiallelic model for the FMR1 locus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89: 4215-4217, 1992.
- Muelles, O. T.; Hartsfield, J. K.; Amar, M. J. A.; Gallardo, L. A.; Kousseff, B. G.: Fragile X syndrome: Discordant levels of CGG repeats mosaicism in two brothers. *Am. J. Med. Genet.* 60: 302-307, 1995.
- Mulley, J. C.; Yu, S.; Loesch, D. Z.; Hay, D. A.; Donnelly, A.; Gedeon, A. K.; Carbonell, P.; Lopez, I.; Glover, G.; Gabarron, I.: FRAXE and mental retardation. *J. Med. Genet.* Mar; 32(3): 162-9, 1995.
- Musco, G.; Stier, G.; Joseph, C.; Castiglione Morelli, M. A.; Nilges, M.; Gibson, T. J.; Pastore, A.: Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* Apr 19; 85 (2): p237-45, 1996.
- Mulligan, L. M.; Phillips, M. A.; Forster-Gibson, C. J.; Beckett, J.; Partington, M. W.; Simpson, N. E.; Holden, J. J. A.; White, B. N.: Genetic mapping of DNA segments relative to the locus for the fragile-X syndrome at Xq27.3. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 463-472, 1985.
- Nadel, Y.; Weisman-Shomer, P.; Fry, M.: The fragile X syndrome

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- single strand d(CGG)<sub>n</sub> nucleotide repeats readily fold back to form unimolecular hairpin structures. *J. Biol. Chem.* Dec 1; 270(48): 28970-7, 1995.
- Nelson, D. L.: The fragile X syndromes. *Semin. Cell. Biol.* Feb;6(1): 5-11, 1995.
- Nolin, S. L.; Glicksman, A.; Houck, G. E. Jr; Brown, W. T.; Dobkin, C. S.: Mosaicism in fragile X affected males. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 509-12, 1994.
- Nussbaum, R. L.; Ledbetter, D. H.: Fragile X syndrome: a unique mutation in man. *Annu. Rev. Genet.* 20: 109-145, 1986.
- Oberle, I.; Boue, J.; Croquette, M. F.; Voelckel, M. A.; Mattei, M. G.; Mandel, J.L.: Three families with high expression of a fragile site at Xq27.3, lack of anomalies at the FMR-1 CpG island, and no clear phenotypic association. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15-May 1; 43(1-2): 224-31, 1992.
- Oberle, I.; Rousseau, F.; Heitz, D.; Kretz, C.; Devys, D.; Hanauer, A.; Boue, J.; Bertheas, M. F.; Mandel, J. L.: Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252: 1097-1102, 1991.
- Oostra, B. A.; Halley, D. J.: Complex behavior of simple repeats: the fragile X syndrome. *Pediatr. Res.* Nov; 38(5): 629-37, 1995.
- Opitz, J. M.; Sutherland, G. R.: International workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 17: 5-94, 1984.
- Opitz, J. M.; Westphal, J. M.; Daniel, A.: Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 101-109, 1984.
- Oudet, C.; Mornet, E.; Serre, J. L.; Thomas, F.; Lentes Zengerling, S.; Kretz, C.; Deluchat, C.; Tejada, I.; Boue, J.; Boue, A.; Mandel, J. L.: Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggests that fragile X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 297-304, 1993.
- Pai, J. T.; Tsai, S. F.; Horng, C. J.; Chiu, P. C.; Cheng, M. Y.;

- Hsiao, K. J.; Wu, K.D.: Absence of FMR-1 gene expression can be detected with RNA extracted from dried blood specimens. *Hum. Genet.* May; 93(5): 488-93, 1994.
- Partington, M. W.; Moore, D.; Turner, G. M.: confirmation of early menopause in fragile X carriers. *Am. J. Med. Genet.* 64:370-372, 1996.
- Parrish, J. E.; Oostra, B. A.; Verkerk, A. J. M. H.; Richards, C. S.; Reynolds, J.; Spikes, A. S.; Shaffer, L. G.; Nelson, D. L.: Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. *Nature Genet.* 8: 229-235, 1994.
- Pascual Pascual, S. I.; Garcia Marcos, J. A.; Martin Lucas, M. A.: Estudio del síndrome X-fragil en la población de la compañía telefónica de España. *Rev. Neurol.* May-Jun; 23 (121): 644-7, 1995.
- Pellissier, M.-C.; Voelckel, M.-A.; Piquet, C.; Mattei, M.-G.; Mattei, J.-F.: Transmission of mental retardation with fragile X site by two normal transmitter brothers. *Am. J. Med. Genet.* 38: 367-369, 1991.
- Pembrey, M. E.; Winter, R. M.; Davies, K. E.: A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 21: 709-717, 1985.
- Perroni, L.; Grasso, M.; Argusti, A.; Lo Nigro, C.; Croci, G. F.; Zelante, L.; Garani, G. P.; Dagna Bricarelli, F.: Molecular and cytogenetic analysis of the fragile X syndrome in a series of 453 mentally retarded subjects: a study of 87 families. *Am. J. Med. Genet.* Jul 12. 64 (1): p176-80, 1996.
- Pieretti, M.; Zhang, F.; Fu, Y.-H.; Warren, S. T.; Oostra, B. A.; Caskey, C. T., Nelson, D. L.: Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66: 817-822, 1991.
- Plassart, E.; Fontaine, B.: Genes with triplet repeats: a new class of mutations causing neurological diseases. *Biomed. Pharmacother.* 48(5-6): 191-7, 1994.
- Poustka, A.; Dietrich, A.; Langenstern, G.; Toniolo, D.; Warren,

## BIBLIOGRAFÍA

---

- S. T.; Lehrach, H.: Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 8302-8306, 1991.
- Price, D. K.; Zhang, F.; Ashley, C. T. Jr; Warren, S. T.: The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CCT 5'-untranslated repeat and encodes an RNA-binding protein. *Genomics*. Jan 1. 31 (1): p3-12, 1996.
- Prior, T. W.; Papp, A. C.; Snyder, P. J.; Sedra, M. S.; Guida, M.; Enrile, B. G.: Germline mosaicism at the fragile X locus. *Am. J. Med. Genet.* Jan. 30; 55 (3): p384-6, 1995.
- Purrello, M.; Alhadeff, B.; Esposito, D.; Szabo, P.; Rocchi, M.; Truett, M.; Masiarz, F.; Siniscalco, M.: The human genes for hemophilia A and hemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3. *EMBO J.* 4: 725-729, 1985.
- Puissant, H.; Malinge, M. C.; Larget-Piet, A.; Martin, D.; Chauveau, P.; Odent, S.; Plessis, G.; Parent, P.; Lemarec, B.; Larget-Piet, L.: Molecular analysis of 53 fragile X families with the probe StB12.3. *Am. J. Med. Genet.* Dec 1; 53(4): 370-3, 1994.
- Pyeritz, R. E.; Stamberg, J.; Thomas, G. H.; Bell, B. B.; Zahka, K. G.; Bernhardt, B. A.: The marker Xq28 syndrome (fragile X syndrome) in a retarded man with mitral valve prolapse. *Johns Hopkins Med. J.* 151: 231-237, 1982.
- Quan, F.; Grompe, M.; Jakobs, P.; Popovich, B. W.: Spontaneous deletion in the FMR1 gene in a patient with fragile X syndrome and cherubism. *Hum. Molec. Genet.* 4: 1681-1684, 1995.
- Quan, F.; Zonana, J.; Gunter, K.; Peterson, K. L.; Magenis, R.; Popovich, B. W.: An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1042-1051, 1995.
- Ramos, F. J.; Emanuel, B. S.; Spinner, N. B.: Frequency of the common fragile site at Xq27.2 under conditions of thymidylate stress: implications for cytogenetic diagnosis of the fragile-X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 42: 835-838, 1992.
- Reiss, A. L.; Aylward, E.; Freund, L. S.; Joshi, P. K.; Bryan,



- R. N.: Neuroanatomy of fragile X syndrome: the posterior fossa. *Ann. Neurol.* 29: 26-32, 1991.
- Reiss, A. L.; Freund, L. S.; Baumgardner, T. L.; Abrams, M. T.; Denckla, M. B.: Contribution of the FMR1 gene mutation to human intellectual dysfunction. *Nat. Genet.* Nov; 11(3): 331-4, 1995.
- Reiss, A. L.; Freund, L.; Tseng, J. E.; Joshi, P. K.: Neuroanatomy in fragile X females: the posterior fossa. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 279-288, 1991.
- Reiss, A. L.; Lee, J.; Freund, L.: Neuroanatomy of fragile X syndrome: the temporal lobe. *Neurology* 44: 1317-1324, 1994.
- Reiss, A. L.; Lee, J.; Freund, L.: Neuroanatomy of fragile X syndrome: the temporal lobe. *Neurology* 44: 1317-1324, 1994.
- Renpenning, H.; Gerrad, J. W.; Zaleski, W. A.; Tabata, T.: Familial sex-linked mental retardation. *Can. Med. Assoc. J.* 87: 954-956, 1962.
- Reyniers, E.; Van-Bockstaele, D. R.; De Boulle, K.; Kooy, R. F.; Bakker, C. E.; Oostra, B. A.; Willems, P. J.: Mean corpuscular hemoglobin is not increased in Fmr1 knockout mice. *Hum. Genet.* Jan; 97(1): 49-50, 1996.
- Reyniers, E.; Vits, L.; De Boulle, K.; Van Roy, B.; Van Velzen, D.; de Graaff, E.; Verkerk, A. J. M. H.; Jorens, H. Z. J.; Darby, J. K.; Oostra, B.; Willems, P. J.: The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nature Genet.* 4: 143-148, 1993.
- Ribacoba Montero, R.; Salas Puig, J.; Fernandez Toral, J.; Fernandez Martinez, J. M.; Moral Rato, M.: Síndrome X frágil y epilepsia. *Neurologia*; Feb. 10 (2): p70-5, 1995.
- Richards, R. I.; Kondo, I.; Holman, K.; Yamauchi, M.; Seki, N.; Kishi, K.; Staples, A.; Sutherland, G. R.; Hori, T.: Haplotype analysis at the FRAXA locus in the Japanese population. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 412-6, 1994.
- Richards, R. I.; Holman, K.; Friend, K.; Kremer, E.; Hillen, D.; Staples, A.; Brown, W. T.; Goonewardena, P.; Tarleton, J.; Schwartz, C.; Sutherland, G. R.: Evidence of founder chromosomes in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 1: 257-260,

## BIBLIOGRAFÍA

---

- 1992.
- Richards, R. I.; Holman, K.; Kozman, H.; Kremer, E.; Lynch, M.; Pritchard, M.; Yu, S.; Mulley, J.; Sutherland, G. R.: Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J. Med. Genet.* 28: 818-823, 1991.
- Richards, R. I.; Sutherland, G. R.: Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell* 70: 709-712, 1992.
- Riggins, G. J.; Sherman, S. L.; Oostra, B. A.; Sutcliffe, J. S.; Feitell, D.; Nelson, D. L.; van-Oost, B. A.; Smits, A. P.; Ramos, F. J.; Pfendner, E.; et al.: Characterization of a highly polymorphic dinucleotide repeat 150 KB proximal to the fragile X site. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15-May 1; 43(1-2): 237-43, 1992.
- Robinson, H.; Wake, S.; Wright, F.; Laing, S.; Turner, G.: Informed choice in fragile X syndrome and its effects on prevalence. *Am. J. Med. Genet.* Jul 12. 64 (1): p198-202, 1996.
- Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Rinaldi, A.; Filippi, G.; Bartolucci, G.; Fancello, G. S.; Siniscalco, M.: Mental retardation in heterozygotes for the fragile-X mutation: evidence in favor of an X inactivation-dependent effect. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 738-743, 1990.
- Rodewald, L.; Miller, D. C.; Sciorra, L.; Barabas, G.; Lee, M. L.: Central nervous system neoplasm in a young man with Martin-Bell syndrome-fra(X)-XLMR. *Am. J. Med. Genet.* 26: 7-12, 1987.
- Rosenberg, R. N.; Iannaccone, S.T.: The prevention of neurogenetic disease. *Arch. Neurol.* Apr; 52(4): 356-62, 1995.
- Rousseau, F.: The fragile X syndrome: implications of molecular genetics for the clinical syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* Jan; 24(1): 1-10, 1994.
- Rousseau, F.; Heitz, D.; Biancalana, V.; Blumenfeld, S.; Kretz, C.; Boue, J.; Tommerup, N.; Van Der Hagen, C.; DeLozier-Blanchet, C.; Croquette, M.-F.; Gilgenkrantz, S.;

- Jalbert, P.; Voelckel, M.-A.; Oberle, I.; Mandel, J.-L.: Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Eng. J. Med.* 325: 1673-1681, 1991.
- Rousseau, F.; Heitz, D.; Mandel, J.-L.: The unstable and methylatable mutations causing the fragile X syndrome. *Hum. Mutat.* 1: 91-96, 1992.
- Rousseau, F.; Heitz, D.; Oberle, I.; Mandel, J.-L.: Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation. *J. Med. Genet.* 28: 830-836, 1991.
- Rousseau, F.; Heitz, D.; Tarleton, J.; MacPherson, J.; Malmgren, H.; Dahl, N.; Barnicoat, A.; Mathew, C.; Mornet, E.; Tejada, I.; Maddalena, A.; Spiegel, R.; Schinzel, A.; Marcos, J. A. G.; Schorderet, D. F.; Schaap, T.; Maccioni, L.; Russo, S.; Jacobs, P. A.; Schwartz, C.; Mandel, J. L.: A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 225-237, 1994.
- Rousseau, F.; Robb, L. J.; Rouillard, P.; Der-Kaloustian, V. M.: No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR-1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. *Hum. Mol. Genet.* Jun; 3(6): 927-30, 1994.
- Ruvalcaba, R. H. A.; Myhre, S. A.; Roosen-Runge, E. C.; Beckwith, J. B.: X-linked mental deficiency megalotestes syndrome. *J. A. M. A.* 238: 1646-1650, 1977.
- Ryynanen, M.; Pulkkinen, L.; Kirkinen, P.; Saarikoski, S.: Fragile-X syndrome in east Finland: molecular approach to genetic and prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 463-5, 1994.
- Schaap, C.; Fryns, J. P.: Severe progressive neurological disorder associated with hydrocephalus in a man with fragile X syndrome [letter]. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 403-4, 1994.
- Schaap, C.; Schrandt-Stumpel, C. T.; Colla-Pijkels, E. T.;

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Van-Driessche, J.; Kusters, R.; Fryns, J. P.: A genetic diagnostic survey in an institutionalized population of 116 moderately to severely retarded male patients: the Rekem experience. *Genet. Couns.* 6(3): 251-8, 1995.
- Schmidt, M.; Robertson, A.; Crawford, M.: X inactivation pattern in interstitial deletions of the fragile X region [letter]. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 451, 1994.
- Schrander-Stumpel, C.; Gerver, W.-J.; Meyer, H.; Engelen, J.; Mulder, H.; Fryns, J.-P.: Prader-Willi-like phenotype in fragile X syndrome. *Clin. Genet.* 45: 175-180, 1994.
- Shapiro, L. R.; Simensen, R. J.; Wilmot, P. L.; Fisch, G. S.; Vibert, B. K.; Fenwick, R. G.; Tarleton, J.; Phelan, M. C.: Asymmetry of methylation with FMR-1 full mutation in two 45,X/46,XX mosaic females associated with normal intellect. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 507-8, 1994.
- Sherman, S. L.; Jacobs, P. A.; Morton, N. E.; Froster-Iskenius, U.; Howard-Peebles, P. N.; Nielsen, K. B.; Partington, M. W.; Sutherland, G. R.; Turner, G.; Watson, M.: Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 69: 289-299, 1985.
- Sherman, S. L.; Maddalena, A.; Howard-Peebles, P. N.; Brown, W. T.; Nolin, S.; Jenkins, E.; Schwartz, C.; Tarrelton, J.; Shapiro, L. R.; Smits, A. P.; et al.: Characteristics of the transmission of the FMR1 gene from carrier females in a prospective sample of conceptuses. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 503-6, 1994.
- Shimizu, M.; Gellibolian, R.; Oostra, B. A.; Wells, R. D.: Cloning, characterization and properties of plasmids containing CGG triplet repeats from the FMR-1 gene. *J. Mol. Biol.* May 17; 258 (4): p614-26, 1996.
- Siomi, H.; Choi, M.; Siomi, M. C.; Nussbaum, R. L.; Dreyfuss, G.: Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* 77: 33-39, 1994.
- Siomi, H.; Siomi, M. C.; Nussbaum, R. L.; Dreyfuss, G.: The

- protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74: 291-298, 1993.
- Siomi, M. C.; Siomi, H.; Sauer, W. H.; Srinivasan, S.; Nussbaum, R. L.; Dreyfuss, G.: FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO. J.* Jun 1; 14(11): 2401-8, 1995.
- Siomi, M. C.; Zhang, Y.; Siomi, H.; Dreyfuss, G.: Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol.* Jul. 16 (7): p3825-32, 1996.
- Sittler, A.; Devys, D.; Weber, C.; Mandel, J.L. : Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmrl protein isoforms. *Hum. Molec. Genet.* 5: 95-102, 1996.
- Slaney, S. F.; Wilkie, A. O.; Hirst, M. C.; Charlton, R.; McKinley, M.; Pointon, J.; Christodoulou, Z.; Huson, S. M.; Davies, K. E.: DNA testing for fragile X syndrome in schools for learning difficulties. *Arch. Dis. Child.* Jan; 72(1): 33-7, 1995.
- Smeets, H. J. M.; Smits, A. P. T.; Verheij, C. E.; Theelen, J. P. G.; Willemsen, R.; van de Burgt, I.; Hoogeveen, A. T.; Oosterwijk, J. C.; Oostra, B. A. : Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum. Molec. Genet.* 2103-2108, 1995.
- Smits, A. P. T.; Dreesen, J. C. F. M.; Post, J. G.; Smeets, D. F. C. M.; de Die-Smulders, C.; Spaans-van der Bijl, T.; Govaerts, L. C. P.; Warren, S. T.; Oostra, B. A.; van Oost, B. A.: The fragile X syndrome: no evidence for any recent mutations. *J. Med. Genet.* 30: 94-96, 1993.
- Smits, A.; Smeets, D.; Dreesen, J.; Hamel, B.; de-Haan, A.; van-Oost, B.: Parental origin of the fra(X) gene is a major determinant of the cytogenetic expression and the CGG repeat length in female carriers. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15 May 1;

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- 43(1-2): 261-7, 1992.
- Smits, A.; Smeets, D.; Hamel, B.; Dreesen, J.; de-Haan, A.; van-Oost, B.: Prediction of mental status in carriers of the fragile X mutation using CGG repeat length. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 497-500, 1994.
- Snow, K.; Doud, L.; Hagerman, R.; Hull, C.; Hirst, M. C.; Davies, K.E.; Thibodeau, S. L.: Analysis of mutations at the fragile X locus using the DNA probe Ox1.9. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15-May 1; 43(1-2): 244-54, 1992.
- Snow, K.; Doud, L.; Hagerman, R.; Pergolizzi, R. G.; Erster, S. H.; Thibodeau, S. L.: Analysis of a CGG sequenca at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 1217-1228, 1993.
- Snow, K.; Tester, D. J.; Kruckeberg, K. E.; Schaid, D. J.; Thibodeau, S. N.: Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum. Mol. Genet.* Sep; 3(9): 1543-51, 1994.
- Snyder, F. F.; Lin, C. C.; Harasym, C. A.; Jamro, H. K.; Kushnig, M. L.; Lowe, J. K.; O'Brien, S. I.: Evidence for close association between the fragile X(q27-28) chromosome site and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) but not with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 37: 587 only, 1984.
- Sobesky, W. E.; Pennington, B. F.; Porter, D.; Hull, C. E.; Hagerman, R. J.: Emotional and neurocognitive deficits in fragile X. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 378-85. 1994.
- Soysa, P.; Senanayahe, M.; Mikkelsen, M.; Poulsen, H.: Martin-Bell syndrome fra(X)(q28) in a Sri Lankan family. *J. Ment. Defic. Res.* 26: 251-257, 1982.
- Spinelli, M.; Rocha, A. C.; Giacheti, C. M.; Richieri-Costa, A.: Word-finding difficulties, verbal paraphasias, and verbal dyspraxia in ten individuals with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* Feb 27; 60 (1): p39-43, 1995.
- Steyaert, J.; Borghgraef, M.; Fryns, J. P.: Apparently enhanced visual information processing in female fragile X carriers:

- preliminary findings. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 374-7, 1994.
- Sutcliffe, J. S.; Nelson, D. L.; Zhang, F.; Pieretti, M.; Caskey, C. T.; Saxe, D.; Warren, S.T.: DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* Sep; 1(6): 397-400, 1992.
- Sutherland, G. R.: Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 197: 265-266, 1977.
- Sutherland, G. R.: Heritable fragile sites on human chromosomes. II. Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.* 31: 136-148, 1979.
- Sutherland, G. R. and Ashford, P. L. C.: X-linked mental retardation with macro-orchidism and the fragile site at Xq27 or 28. *Hum. Genet.* 48: 117-120, 1979.
- Sutherland, G. R. and Baker, E.: Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum. Molec. Genet.* 1: 111-113, 1992.
- Sutherland, G. R.; Gedeon, A.; Kornman, L.; Donnelly, A.; Byard, R. W.; Mulley, J. C.; Kremer, E.; Lynch, M.; Pritchard, M.; Yu, S.; Richards, R. I.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *New Eng. J. Med.* 325: 1720-1722, 1991.
- Sutherland, G. R.; Richards, R. I.: Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Apr 25; 92(9): 3636-41, 1995.
- Sved, J. A. and Laird, C. D.: The X-inactivation imprinting model can explain the incidence of the fragile-X syndrome of mental retardation in mother-offspring pairs. *Brain Dysfunction* 1: 245-254, 1988.
- Sved, J. A.; Laird, C. D.: Population genetic consequences of the fragile X syndrome, based on the X-inactivation imprinting model. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 443-451, 1990.
- Syrrou M; Patsalis PC; Georgiou I; Hadjimarcou MI; Constantinou-Deltas, C. D.; Pagoulatos, G.: Evidence for

## BIBLIOGRAFÍA

---

- high-risk haplotypes and (CGG)<sub>n</sub> expansion in fragile X syndrome in the Hellenic population of Greece and Cyprus. *Am J Med Genet* Jul 12. 64 (1): p234-8, 1996.
- Szabo, P.; Purrello, M.; Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Alhadeff, B.; Filippi, G.; Toniolo, D.; Martini, G.; Luzzatto, L.; Siniscalco, M.: Cytological mapping of the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene distal to the fragile-X site suggests a high rate of meiotic recombination across this site. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 7855-7859, 1984.
- Tarleton, J.; Richie, R.; Schwartz, C.; Rao, K.; Aylsworth, A. S.; Lachiewicz, A.: An extensive de novo deletion removing FMR1 in a patient with mental retardation and the fragile X syndrome phenotype. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1973-1974, 1993.
- Tarleton, J.; Wong, S.; Schwartz, C.: Direct analysis of the FMR-1 gene provides an explanation for an exceptional case of a fragile X negative, mentally retarded male in a fragile X family. *J. Med. Genet.* Dec; 29(12): 919-20, 1992.
- Thake, A.; Tood, J.; Webb, T.; Bunday S.: Children with the fragile X chromosome at schools for the mildly mentally retarded. *Dev. Med. Child Neurol.* 29:711-719, 1987.
- Thibodeau, S. N.; Dorkins, H. R.; Faulk, K. R.; Berry, R.; Smith, A. C. M.; Hagerman, R.; King, A.; Davies, K. E.: Linkage analysis using multiple DNA polymorphic markers in normal families and in families with fragile X syndrome. *Hum. Genet.* 79: 219-227, 1988.
- Thompson, N. M.; Gulley, M. L.; Rogness, G. A.; Clayton, R. J.; Johnson, C.; Hazelton, B.; Cho, C. G.; Zellmer, V.T.: Neurobehavioral characteristics of CGG amplification status in fragile X females. *Am. J. Med. Genet.* Dec 15; 54(4): 378-83, 1994.
- Tranebjaerg, L.; Hilling, S.; Jessen, J.; Lind, D.; Hansen, M. S.: Prevalence of fra(X) in the county of Funen in Denmark is lower than expected. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 423-7, 1994.
- Trottier, Y.; Imbert, G.; Poustka, A.; Fryns, J. P.; Mandel, J.



- L.: Male with typical fragile X phenotype is deleted for part of the FMR1 gene and for about 100 kb of upstream region. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 454-7, 1994.
- Turner, G.; Brookwell, R.; Daniel, A.; Selikowitz, M.; Zilibowitz, M.: Heterozygous expression of X-linked mental retardation and X-chromosome marker fra(X)(q27). *New Eng. J. Med.* 303: 662-664, 1980.
- Turner, G.; Daniel, A.; Frost, M.: X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. *J. Pediat.* 96: 837-841, 1980.
- Turner, G.; Eastman, C.; Casey, J.; McLeay, A.; Procopis, P.; Turner, B.: X-linked mental retardation associated with macro-orchidism. *J. Med. Genet.* 12: 367-371, 1975.
- Turner, A. M.; Robinson, H.; Wake, S.; Laing, S. J.; Leigh, D.; Turner, G.: Counselling risk figures for fragile X carrier females of varying band sizes for use in predicting the likelihood of retardation in their offspring. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 458-62, 1994.
- Turner, G.; Till, R.; Daniel, A.: Marker X chromosomes, mental retardation and macro-orchidism. (Letter) *New Eng. J. Med.* 299: 1472 only, 1978.
- Turner, G.; Webb, T.; Wake, S.; Robinson, H.: Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* Jul 12, 64 (1): p196-7, 1996.
- Usdin, K.; Woodford, K. J.: CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucleic. Acids. Res.* Oct 25; 23(20): 4202-9, 1995.
- Vaisanen, M. L.; Kahkonen, M.; Leisti, J.: Diagnosis of fragile X syndrome by direct mutation analysis. *Hum. Genet.* Feb; 93(2): 143-7, 1994.
- Van-den-Ouweland, A. M. W.; Deelen, W. H.; Kunst, C. B.; Uzielli, M.-L. G.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.; Oostra, B. A.; Halley, D. J. J.: Loss of mutation at the FMR1 locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes. *Hum.*

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Molec. Genet. 3: 1823-1827, 1994.
- Van-den-Ouweland, A. M.; de-Vries, B. B.; Bakker, P. L.; Deelen, W. H.; de-Graaff, E.; van-Hemel, J. O.; Oostra, B.A.; Niermeijer, M. F.; Halley, D. J.: DNA diagnosis of the fragile X syndrome in a series of 236 mentally retarded subjects and evidence for a reversal of mutation in the FMR-1 gene. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 482-5, 1994.
- Van Roy, B. C.; De Smedt, M. C.; Raes, R. A.; Dumon, J. E.; Leroy, J. G.: Fragile X trait in a large kindred: transmission also through normal males. *J. Med. Genet.* 20: 286-289, 1983.
- Verheij, C.; Bakker, C. E.; de Graaff, E.; Keulemans, J.; Willemsen, R.; Verkerk, A. J. M. H.; Galjaard, H.; Reuser, A. J. J.; Hoogeveen, A. T.; Oostra, B. A.: Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 363: 722-724, 1993.
- Verheij, C.; de Graaff, E.; Bakker, C. E.; Willemsen, R.; Willems, P. J.; Meijer, N.; Galjaard, H.; Reuser, A. J. J.; Oostra, B. A.; Hoogeveen, A. T.: Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum. Molec. Genet.* 4: 895-901, 1995.
- Verkerk, A. J.; deVries, B. B.; Niermeijer, M. F.; Fu, Y. H.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.; Majoor-Krakauer, D. F.; Halley, D. J.; Oostra, B. A.: Intragenic probe used for diagnostics in fragile X families. *Am. J. Med. Genet.* Apr 15-May 1; 43(1-2): 192-6, 1992.
- Verkerk, A. J. M. H.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J. S.; Fu, Y. H.; Kuhl, D. P. A.; Pizzuti, A.; Reiner, O.; Richards, S.; Victoria, M. F.; Zhang, F.; Eussen, B. E.; van Ommen, G. J. B.; Blonden, L. A. J.; Riggins, G. J.; Chastain, J. L.; Kunst, C. B.; Galjaard, H.; Caskey, C. T.; Nelson, D. L.; Oostra, B. A.; Warren, S. T.: Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65: 905-914, 1991.
- Voelckel, M. A.; Mattei, M. G.; N'Guyen, C.; Philip, N.; Birg,

- F.; Mattei, J. F.: Dissociation between mental retardation and fragile site expression in a family with fragile X-linked mental retardation. *Hum. Genet.* 80: 375-378, 1988.
- Vogel, F.; Crusio, W. E.; Kovac, C.; Fryns, J.-P.; Freund, M.: Selective advantage of fra (X) heterozygotes. *Hum. Genet.* 86: 25-32, 1990.
- Von-Koskull, H.; Gahmberg, N.; Salonen, R.; Salo, A.; Peippo, M.: FRAXA locus in fragile X diagnosis: family studies, prenatal diagnosis, and diagnosis of sporadic cases of mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 486-9, 1994.
- Wagener, C.; Epplen, J. T.; Erlich, H.; Peretz, H.; Vihko, P.: Molecular biology techniques in the diagnosis of monogenic diseases. *Clin. Chim. Acta.* Feb; 225(1): S35-50, 1994.
- Wang, Q.; Green, E.; Bobrow, M.; Mathew, C. G.: A rapid, non-radioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J. Med. Genet.* Mar; 32(3): 170-3, 1995.
- Wang, Z.; Taylor, A. K.; Bridge, J. A.: FMR1 fully expanded mutation with minimal methylation in a high functioning fragile X male. *J Med Genet.* May. 33 (5): p376-8, 1996.
- Warren, S. T.: The expanding world of trinucleotide repeats. *Science.* 271: 1374-1375. 1996.
- Warren, S. T.; Ashley, C. T. Jr.: Triplet repeat expansion mutations: the example of fragile X syndrome. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 77-99, 1995.
- Warren, S. T.; Glover, T. W.; Davidson, R. L.; Jagadeeswaran, P.: Linkage and recombination between fragile X-linked mental retardation and the factor IX gene. (Letter) *Hum. Genet.* 69: 44-46, 1985.
- Warren, S. T.; Knight, S. J. L.; Peters, J. F.; Stayton, C. L.; Consalez, G. G.; Zhang, F. P.: Isolation of the human chromosomal band Xq28 within somatic cell hybrids by fragile X site breakage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87: 3856-3860, 1990.
- Warren, S. T.; Zhang, F.; Licameli, G. R.; Peters, J. F.: The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of fragile sites. *Science* 237: 420-423, 1987.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Warren, S. T.; Zhang, F. P.; Sutcliffe, J. S.; Peters, J. F.: Strategy for molecular cloning of the fragile X site DNA. *Am. J. Med. Genet.* 30: 613-623, 1988.
- Webb, T.; Jacobs, P. A.: Fragile Xq27.3 in female heterozygotes for the Martin-Bell syndrome. *J. Med. Genet.* 27: 627-631, 1990.
- Willemsen, R.; Bontekoe, C.; Tamanini, F.; Galjaard, H.; Hoogeveen, A.; Oostra, B.: Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun* Aug 5. 225 (1): p27-33, 1996.
- Willemsen, R.; Mohkamsing, S.; De Vries, B.; Devys, D.; van den Ouweland, A.; Mandel, J. L.; Galjaard, H.; Oostra, B.: Rapid antibody test for fragile X syndrome. *Lancet* 345: 1147-1148, 1995.
- Willemsen, R.; Oosterwijk, J. C.; Los, F. J.; Galjaard, H.; Oostra, B. A.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome [letter]. *Lancet.* Oct 5. 348 (9032): p967-8, 1996.
- Winter, R. M.; Pembrey, M. E.: Analysis of linkage relationships between genetic markers around the fragile X locus with special reference to the daughters of normal transmitting males. *Hum. Genet.* 74: 93-97, 1986.
- Wohrle, D.; Hennig, I.; Vogel, W.; Steinbach, P.: Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nature Genet.* 4: 140-142, 1993.
- Wohrle, D.; Hirst, M. C.; Kennerknecht, I.; Davies, K.E.; Steinbach, P.: Genotype mosaicism in fragile X fetal tissues. *Hum. Genet.* Apr; 89(1): 114-6, 1992.
- Wohrle, D.; Kotzot, D.; Hirst, M. C.; Manca, A.; Korn, B.; Schmidt, A.; Barbi, G.; Rott, H.-D.; Poustka, A.; Davies, K. E.; Steinbach, P.: A microdeletion of less than 250kb including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 299-306, 1992.
- Yamauchi, M.; Nagata, S.; Seki, N.; Toyama, Y.; Harada, N.; Niikawa, N.; Masuno, I.; Kajii, T.; Hori, T.: Prenatal

- diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the dynamic mutation due to an unstable DNA sequence. *Clin. Genet.* 44: 169-172, 1993.
- Yu, S.; Mulley, J.; Loesch, D.; Turner, G.; Donnelly, A.; Gedeon, A.; Hillen, D.; Kremer, E.; Lynch, M.; Pritchard, M.; Sutherland, G. R.; Richards, R. I.: Fragile-X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 968-980, 1992.
- Yu, S.; Pritchard, M.; Kremer, E.; Lynch, M.; Nancarrow, J.; Baker, E.; Holman, K.; Mulley, J. C.; Warren, S. T.; Schlessinger, D.; Sutherland, G. R.; Richards, R. I.: Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252: 1179-1181, 1991.
- Zaslav, AL. y Brown T.: Simultaneous expression of the rare and common fragile sites on the X chromosome. *Clin. Genet.* 40: 423-429, 1991.
- Zoll, B.; Arnemann, J.; Krawczak, M.; Cooper, D. N.; Pescia, G.; Wahli, W.; Steinbach, P.; Schmidtke, J.: Evidence against close linkage of the loci for fraXq of Martin-Bell syndrome and for factor IX. *Hum. Genet.* 71: 122-126, 1985.
- Zhong, N.; Kajanoja, E.; Smits, B.; Pietrofesa, J.; Curley, D.; Wang, D.; Ju, W.; Nolin, S.; Dobkin, C.; Ryyananen, M.; Brown, W. T.: Fragile X founder effects and new mutations in Finland. *Am. J. Med. Genet.* Jul 12. 64 (1): p226-33, 1996.
- Zhong, N.; Liu, X.; Gou, S.; Houck, G. E. Jr; Li, S.; Dobkin, C.; Brown, W. T.: Distribution of FMR-1 and associated microsatellite alleles in a normal Chinese population. *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 417-22, 1994.
- Zhong, N.; Yang, W.; Dobkin, C.; Brown, W. T.: Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.* Aug; 57(2): 351-61, 1995.
- Zhong, N.; Ye, L.; Dobkin, C.; Brown, W. T.: Fragile X founder chromosome effects: linkage disequilibrium or microsatellite heterogeneity? *Am. J. Med. Genet.* Jul 15; 51(4): 405-11, 1994.

