



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Facultad de Ciencias Biológicas

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

“Detección citogenética y molecular de expansión de trinucleótidos repetidos CCG y del estado de metilación del gen FMR1 en pacientes con síndrome de X-frágil”

Tesis que como requisito parcial para optar el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Genética
presenta la

BIOL. CATALINA GARCIA VIELMA

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Noviembre 2004

TM

Z5320

FCB

2004

.G378



1020150217



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Subdirección de Postgrado

**“Detección citogenética y molecular de expansión de
trinucleótidos repetidos CGG y del estado de metilación del gen
FMR1 en pacientes con síndrome de X-frágil “**

Tesis que como requisito parcial para optar el grado de Maestro en
Ciencias con Especialidad en Genética presenta la

BIOL. CATALINA GARCIA VIELMA

San Nicolás de los Garza, N.L.

Noviembre 2004.

s
B
204
.E378



FONDO
TESIS



**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Subdirección de Postgrado**

Tesis que como requisito parcial para optar el grado de Maestro en Ciencias con
Especialidad en Genética presenta la
Biol. CATALINA GARCIA VIELMA

**“Detección citogenética y molecular de expansión de trinucleótidos
repetidos CGG y del estado de metilación del gen FMR1 en pacientes con
síndrome de X-frágil “**

COMITÉ DE TESIS

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Presidente

Handwritten signature of Roberto Montes de Oca Luna in black ink, positioned above a horizontal line.

DR. CARLOS HUMBERTO LEAL GARZA
Secretario

Handwritten signature of Carlos Humberto Leal Garza in black ink, positioned above a horizontal line.

DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Vocal

Handwritten signature of Odila Saucedo Cardenas in black ink, positioned above a horizontal line.

DR. MARIO MORALES VALLARTA
Vocal

Handwritten signature of Mario Morales Vallarta in black ink, positioned above a horizontal line.

DR. JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS
Vocal

Handwritten signature of Jose Antonio Heredia Rojas in black ink, positioned above a horizontal line.

San Nicolás de los Garza, N.L.

Noviembre de 2004.

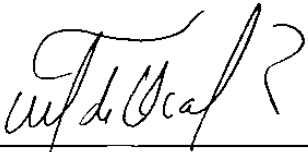
“Detección citogenética y molecular de expansión de trinucleótidos repetidos CGG y del estado de metilación del gen FMR1 en pacientes con síndrome de X-frágil “

Por

Biol. Catalina García Vielma

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Manipulación Genética del Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, en colaboración con el Laboratorio de Neurogenética Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS y el Departamento de Genética de Laboratorios de Análisis Clínico Médicos “Dr. Moreira”.

FIRMAS



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director Interno



Dr. Carlos H. Leal Garza
Director Externo



Dra Odila Saucedo Cárdenas
Director Externo

San Nicolás de los Garza, N.L.

Noviembre de 2004.

DEDICATORIA

A mis padres Raúl y Mónica que siempre están presentes en mi mente y mi corazón y que de alguna manera me cuidan desde el cielo.

A Amaury, mi esposo, gracias por todo tu apoyo y comprensión para que pudiera lograr una más de mis metas en la vida y por enseñarme que todo se logra con dedicación, esfuerzo y algo de paciencia.

A mis hermanas Mona y Garde por estar conmigo en todo momento, por que con su apoyo y su amor me impulsan siempre a seguir adelante.

A Luis y Edgar que ya son parte de mi familia, gracias por su amistad.

A Puffy y Smucker por acompañarme siempre.

Al resto de mi familia.

A Dios.

AGRADECIMIENTOS

A los familiares y pacientes con Síndrome de X-frágil por su cooperación e interés en la realización de este trabajo.

A la Dra. Betty De la Fuente quien comprende una parte muy importante en el presente trabajo ya que fue la responsable de valorar y brindar asesoría genética a los pacientes con probable Síndrome de X-frágil. Gracias por tu gran amistad y por el apoyo incondicional de siempre. A la Dra. Clara Elisa Ortiz de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Toluca, por su amistad y por la canalización de pacientes para el presente trabajo.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna gracias por sus enseñanzas, su paciencia y por permitirme haber realizado este trabajo en su laboratorio y bajo su asesoría.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y al Dr. Carlos Leal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste por su apoyo, sus consejos y por su asesoría en la realización del mismo.

Al Dr. Luis René Garza, Dr. Luis Ángel Ceceñas y Dr. Roberto Moreira Flores de Laboratorios de Análisis Clínico Médicos “Dr. Moreira” por haber permitido que parte de este trabajo se llevara a cabo en sus instalaciones, gracias por confiar en mi y por la gran oportunidad que me brindan de colaborar con ustedes en esa gran empresa.

A los miembros del comité de tesis Dr. Mario Morales Vallarta y Dr. José Antonio Heredia, por sus consejos y apoyo para este proyecto.

A mis amigos, especialmente a Carito quien siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, gracias por tu ayuda tus consejos y gracias por ser mi amiga.

A todos mis compañeros de la Unidad de Manipulación Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas, muy especialmente a Areli Herrera, quien fue un gran apoyo en la realización de este trabajo; gracias por todo.

A mis compañeros del Centro de Investigación Biomédica del Noreste por su ayuda y apoyo en los momentos difíciles y por su amistad.

A mis colegas de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.: Rossy y Carmen gracias por su amistad.

ÍNDICE

Portada	i
Comité de Tesis	ii
Directores internos y externos	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tablas	xii

RESUMEN	1
----------------------	----------

INTRODUCCIÓN	2
---------------------------	----------

ANTECEDENTES

A) Historia.....	5
B) Aspectos clínicos.....	6
C) Aspectos moleculares.....	9
D) Proteína FMRP.....	14
E) Paradoja de Sherman.....	17
F) Diagnóstico.....	20

1. Diagnóstico Clínico.....	20
2. Diagnóstico Citogenético.....	20
Otros sitios frágiles.....	22
G) Otras enfermedades relacionadas con amplificación de reptición de trinucleótidos.....	24
3. Diagnóstico Molecular.....	26
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES	
A) Pacientes.....	34
B) Reactivos y Materiales.....	35
MÉTODOS	
- Estrategia General.....	37
- Estandarización de Procedimientos.....	38
A) Estudio Citogenético	
1) Técnica para la expresión de X-frágil usando medio deficiente en ácido fólico.....	39
2) Técnica de bandas GTG.....	40
3) Interpretación de los resultados del estudio citogenético.....	42

B) Estudio Molecular

1) Aislamiento de DNA genómico por el método TSNT.....	42
2) Modificación del DNA por bisulfito de sodio.....	43
3) Amplificación de las secuencias a estudiar.....	46
4) Electroforesis.....	49
5) Interpretación de los resultados del estudio molecular.....	50

RESULTADOS

1) Estudio citogenético.....	51
2) Estudio Molecular.....	54

DISCUSIÓN	68
------------------------	----

CONCLUSIONES	74
---------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	76
---------------------------	----

APÉNDICE I. Preparación de Soluciones	85
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Características fenotípicas de individuos afectados por el Síndrome de X-frágil	8
Figura 2	Gen FMR1	10
Figura 3	Modelo hipotético de la función de la proteína FMRP	16
Figura 4	Paradoja de Sherman	19
Figura 5	Fotografía al microscopio de luz que muestra la expresión de FRAXA	21
Figura 6	Fotografía del cromosoma X-frágil con técnica de bandas GTG	22
Figura 7	Modificación del DNA por bisulfito de sodio	29
Figura 8	Modificación del DNA por bisulfito de sodio para amplificación de las repeticiones CGG	31
Figura 9	Modificación del DNA por bisulfito de sodio para amplificación de las islas CpG	32
Figura 10	Cariotipo armado con tinción normal del paciente FRA 4	52
Figura 11	Metafase con tinción normal del paciente FRA 14	53
Figura 12	Aislamiento de DNA genómico	54
Figura 13	Estandarización de las reacciones de amplificación	55
Figura 14	Árbol genealógico de la Familia 1	58
Figura 15	Análisis Molecular de la Familia 1	59
Figura 16	Árbol genealógico de la Familia 5	60
Figura 17	Amplificación de las islas CpG de la Familia 5	61
Figura 18	Árbol genealógico de la Familia 6	62

Figura 19	Análisis Molecular de la Familia 6	63
Figura 20	Árbol genealógico de la Familia 10	64
Figura 21	Detección molecular de las islas CpG del gen FMR1 de la Familia 10 y pacientes FRA 48 y FRA 50	65
Figura 22	Análisis de las repeticiones CGG del gen FMR1 de los pacientes FRA 39-44, 46, 47, 52 y 53	66
Figura 23	Amplificación de las islas CpG de los pacientes FRA 45, 49 y 51	67
Figura 24	Amplificación de las repeticiones CGG de los pacientes FRA 45, 49 y 51	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Otras enfermedades con expansión de trinucleótidos repetidos	25
Tabla 2	Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 1	59
Tabla 3	Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 5	61
Tabla 4	Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 6	63
Tabla 5	Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 10	65

RESUMEN

El síndrome de X-frágil es considerado la primera causa de retraso mental familiar y la segunda causa de retraso mental en general; los afectados presentan cara alargada, orejas grandes en asa, macroorquidismo y retraso mental que puede ser de leve a severo. El riesgo de retraso mental está relacionado con la ubicación en el árbol genealógico.

Este síndrome es originado por una mutación dinámica en una región no codificante en el extremo 5' del gen FMR1, localizado en Xq27.3 y relacionado con la expresión de un sitio frágil en esta posición cromosómica. Esta región está compuesta por una serie de repeticiones del trinucleótido CGG, los cuales son altamente inestables y tienden a expandirse. Si esto ocurre las citosinas de las repeticiones y de las islas CpG adyacentes al gen se metilan lo que ocasiona la pérdida de transcripción, ausencia de la proteína FMRP y la expresión de la enfermedad.

Hasta la fecha, se han reportado gran cantidad de métodos para apoyar el diagnóstico de este padecimiento. El cariotipo en linfocitos de sangre periférica donde se evidencia el sitio frágil, detecta únicamente al 30% de los afectados. En el área de diagnóstico molecular se han tenido algunos problemas debido al alto contenido de citosinas y guaninas presentes en el gen y en sus regiones adyacentes.

En el presente trabajo, describimos una metodología de diagnóstico molecular basada en PCR más sencilla y reproducible, basada en la modificación del DNA por bisulfito de sodio y su posterior amplificación. Con esta metodología se estudiaron 51 individuos logrando detectar a 7 de ellos con síndrome de X-frágil, en base al número de repeticiones CGG y al estado de metilación en el gen FMR1.

La importancia de este trabajo radica en la estandarización de una metodología que sea sencilla, reproducible y que facilite el diagnóstico de este padecimiento, además de que es el primer estudio que se realiza en nuestra región .

INTRODUCCIÓN

El síndrome de X-frágil se considera la primera causa de retraso mental familiar y la segunda forma más común de retraso mental general, después del síndrome de Down. Tiene una frecuencia de 1:1200 varones y 1:2500 mujeres en la población general. El gen responsable (FMR1) está localizado en los brazos largos del cromosoma X, exactamente en la posición Xq27.3. Este padecimiento está asociado con la expresión de un sitio frágil (FRAXA), en esa posición, inducido *in vitro* bajo condiciones deficientes en ácido fólico (1, 2, 3).

Clínicamente los afectados cursan con retraso de leve a severo, facies características con cara alargada, orejas grandes en asa, macroorquidismo, además de problemas de lenguaje y conducta.

Este padecimiento tiene un patrón de herencia no tradicional o no mendeliano denominado repetición de trinucleótidos, en un árbol genealógico semeja un patrón de herencia dominante ligado al X, pero atípico con penetrancia incompleta, ya que existen hombres y mujeres afectados, mujeres portadoras y hombres normales transmisores de la mutación dentro de una misma genealogía. Además el 30% de las mujeres portadoras muestran cierto grado de retraso mental y el 20% de los varones portadores son fenotípicamente normales. El riesgo de retraso mental está relacionado con la ubicación en el árbol genealógico y a este hallazgo tan característico se le conoce como Paradoja de Sherman (1).

El Síndrome de X-frágil es causado por una mutación dinámica que es un tipo de alteración genética identificada en los últimos años y que consiste en un incremento superior al rango normal en el número de repeticiones de un determinado trinucleótido, en este caso el CGG, localizado en una región no codificante que se encuentra en el extremo 5' del gen FMR1. Estas repeticiones son altamente inestables y tienden a expandirse.

Existen 4 categorías de alelos del gen FMR1, dependiendo del número y la inestabilidad de las repeticiones CGG: normales , intermedios, premutados y mutaciones completas (4). Cuando la expansión de las repeticiones es de más de 200 copias, las citosinas de las repeticiones CGG y de las islas CpG adyacentes al gen se metilan lo que ocasiona la inactivación del gen, la ausencia de la proteína, y por lo tanto la expresión de la enfermedad, siendo esta la base molecular del síndrome de X-frágil. Cuando esta mutación es transmitida por mujeres el número de repeticiones se expande en tanto que si es transmitida por varones casi no cambia o se reduce (1).

En la actualidad el gen FMR-1 aún sigue en estudio se sabe que codifica para una proteína denominada FMRP (Fragil Mental Retardation Protein) de unión al RNA (5, 6, 7). Esta proteína se expresa en casi todos los tejidos encontrándose en mayor cantidad en cerebro, testículos, ovarios y no se ha localizado en músculo, corazón, aorta y leucocitos (8).

El diagnóstico de este padecimiento puede realizarse de manera citogenética mediante la realización de un cariotipo, sin embargo, este diagnóstico no es del todo confirmatorio ya que no todos los afectados expresan el sitio frágil y además existen otros sitios frágiles en el cromosoma X que se localizan cercanos a Xq27.3 y que se confunden fácilmente. Debido a esto, es necesario recurrir al diagnóstico molecular estudiando directamente el gen FMR1. Sin embargo, se han presentado muchas complicaciones debido a que el gen presenta un alto contenido de citosinas y guaninas lo cual dificulta la amplificación.

En el presente proyecto describimos una metodología de diagnóstico molecular basada en PCR, más sencilla y reproducible para el diagnóstico del síndrome de X-frágil. Se basa en la modificación del DNA por bisulfito de sodio y su posterior amplificación con oligonucleótidos específicos para determinar el número de repeticiones CGG y el estado de metilación de las islas CpG adyacentes al gen FMR1.

ANTECEDENTES

SÍNDROME DE X-FRÁGIL

A) HISTORIA

El sitio frágil tipo A, denominado FRAXA o FRAXQ27*RFA por las reglas de nomenclatura, es un sitio frágil raro, isocromatídico, dependiente de folatos que fue descrito por primera vez en 1943 por Martin y Bell en una familia con retraso mental. En esta familia los varones presentaban alteraciones fenotípicas con un mecanismo hereditario ligado al cromosoma X (9). Posteriormente Lubs en 1969 reportó una familia con retraso mental asociado a un marcador citogenético presente en los hombres afectados y en las mujeres portadoras. Este marcador se presentaba como un "gap" o constricción en la parte distal del brazo largo del cromosoma X. La confirmación de este descubrimiento fue hecha por Giraud y colaboradores en 1976 y casi simultáneamente por Harvey y colaboradores en 1977 quienes describieron casos de retraso mental con herencia ligada al X y asociados con el marcador cromosómico (10 ,11).

Por otro lado, se observó que la expresión de este marcador dependía del tipo de medio de cultivo utilizado. Esa constricción o "gap" en el cromosoma X le da la apariencia de ser lábil, por lo que se le asignó el nombre de sitio frágil. Al cromosoma X con esta anomalía se le conoce como X-frágil y a partir de entonces se reconoció que era una de las formas más comunes de retraso mental ligado al X, posteriormente con la implementación de las técnicas de bandeo se determinó la localización exacta en Xq27.3 (12, 13, 14, 15, 16).

B) ASPECTOS CLÍNICOS

1. CUADRO CLÍNICO

Varones afectados

Los afectados con el síndrome de X-frágil presentan cara alargada, mandíbula prominente que no es un verdadero prognatismo; orejas grandes, prominentes y de implantación alta; macroorquidismo y la característica principal de la enfermedad que es el retraso mental que puede ser de leve a severo, este cuadro clínico se presenta aproximadamente en el 80% de los afectados (Figura 1). Además pueden tener aumento del perímetro cefálico, frente amplia, miopía, paladar alto y arqueado, pectum excavatum, prolapso de la válvula mitral, dilatación aórtica, pie plano y problemas de la piel.

El diagnóstico clínico del síndrome de X-frágil es difícil en el recién nacido ya que solo algunas de las características clínicas se observan en la niñez y otras como el macroorquidismo se presentan después de la pubertad.

El retraso mental es variable en severidad aún en miembros de una misma familia. Se conoce que aproximadamente el 90% de los afectados tienen un coeficiente intelectual (CI) de 20-60, con una media de entre 30-45. Los pacientes pueden presentar falta de atención, hiperactividad, torpeza, hipotonía muscular, movimientos estereotipados de las manos, problemas de lenguaje, en ciertos casos automutilación y algunas veces autismo (1, 13).

Mujeres afectadas

Tienen un fenotipo variable ya que pueden presentar problemas de lenguaje, facies característica, problemas en el aprendizaje, hasta retraso mental severo (1, 17).

Hombres transmisores normales

Aunque los hombres son hemicigotos para los genes localizados en el cromosoma X, 20% de los que portan la mutación son clínicamente normales y no expresan el sitio frágil usando los métodos de inducción estándar. A estos hombres se les denomina “hombres normales transmisores” por ser portadores obligados de la mutación (1,17).

Mujeres portadoras

Presentan un fenotipo extremadamente variable: dos terceras partes de las heterocigotas son clínicamente normales y la otra tercera parte presenta retraso mental que va de moderado a severo e incluso autismo. Los rasgos faciales son similares a los varones afectados y pueden o no expresar el sitio frágil. Actualmente se cree que los mejores criterios para el diagnóstico en mujeres jóvenes son: sobrecrecimiento, problemas de lenguaje, de atención, timidez o ansiedad (1,17).



Figura 1. Características fenotípicas de individuos afectados por el síndrome de X-frágil. (A) Varón afectado y (D) Mujer afectada : Se puede observar en estos dos pacientes la cara alargada con mandíbula prominente, orejas grandes y facies característica; **(B) Niño afectado y (C) Niña afectada:** En estos paciente de menor edad aún no pueden detectarse todas las características fenotípicas del síndrome, solo el retraso mental.

C) ASPECTOS MOLECULARES

El síndrome de X-frágil es causado por una mutación dinámica que consiste en la amplificación de las repeticiones del trinucleótido CGG localizado en el extremo 5' en una región no codificante del gen FMR1 ("Fragile Mental Retardation 1") (Figura 2). Este gen se identificó en 1991 con el uso de estrategias de clonación posicional e hibridación de células somáticas las cuales contenían fragmentos de translocaciones de cromosomas de ratón con cromosomas humanos específicamente en la región del sitio frágil en el cromosoma X, que contenían de Xpter-q27.3 o Xq27.3-qter, además de un sitio altamente polimórfico. Estos fragmentos se insertaron en cromosomas artificiales de levadura (YAC's) , se clonaron y se identificaron (18,19).

Posteriormente, se utilizaron como sondas en DNA cromosómico de personas normales y de pacientes con síndrome de X-frágil, encontrando que el fragmento obtenido variaba de tamaño dentro de las familias, indicando que la región era inestable (17).

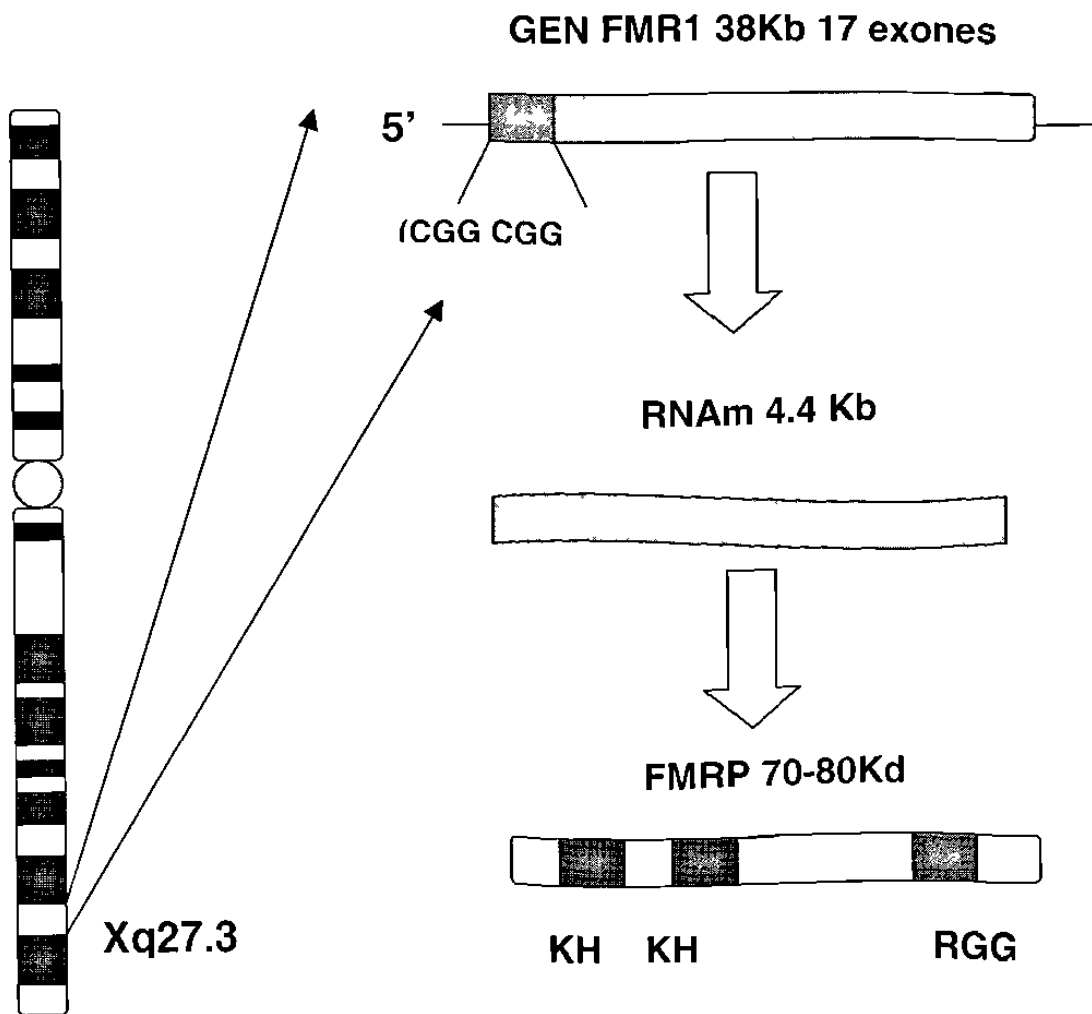


Figura 2. Gen FMR1. Se representa esquemáticamente la localización del gen FMR1 en Xq27.3, el RNAm producto de la transcripción del gen y la proteína FMRP de 70-80 kd con dominios KH y una caja RGG que son sitios de unión a RNA.

La presencia de la secuencia repetida de nucleótidos CGG fue descrita por Kremer y colaboradores en 1991. Ellos demostraron que los cromosomas X normales tenían 40 más menos 25 copias del trinucleótido CGG y que dentro de esos límites la secuencia era estable. Sin embargo, el genotipo X-frágil se caracterizaba por el incremento de esas repeticiones y el alelo se hace inestable (17).

El gen FMR1 se encuentra localizado en la banda 27.3 de los brazos largos del cromosoma X (Xq27.3) mide 38 Kb y posee 17 exones (Figura 2). Es un gen conservado a través de la evolución ya que se ha encontrado desde Drosophila, levadura, Caenorhabditis elegans, hasta todas las especies de mamífero sugiriendo que tiene un papel "housekeeping", pero su función normal se desconoce (20,21). Transcribe un RNA de aproximadamente 4.4 kb.

Se ha encontrado que el número de repeticiones CGG es variable dentro de la población, encontrando alelos de 6-32 repeticiones, siendo las más comunes de 28 a 30 CGG. Estas repeticiones se encuentran divididas por dos triplete AGG en las posiciones 10 y 25, que son importantes para la estabilidad del gen, ya que la pérdida de uno de ellas, parece predisponer a la inestabilidad de los alelos (22,23,24).

Se han clasificado 4 diferentes alelos del gen FMR1 dependiendo del número de repeticiones CGG:

- a) **Alelos normales:** contienen menos de 40 repeticiones CGG, y se encuentran en los individuos normales.
- b) **Alelos intermedios:** que van de 40 a 60 repeticiones y que se han localizado en mujeres portadoras.
- c) **Alelos premutados:** de 55 a 200 repeticiones del triplete, se han encontrado en mujeres portadoras y hombres normales transmisores.
- d) **Alelos con mutación completa:** más de 200 repeticiones CGG y se localizan en los hombres y mujeres afectados.

Los límites entre estas categorías aún no están bien definidos, lo que dificulta clasificar los alelos inestables y determinar el riesgo de expansión. Cuando existen más de 200 repeticiones CGG, las citosinas de las repeticiones y de las islas CpG adyacentes al gen se metilan, lo que ocasiona la inactivación del gen, la ausencia de la proteína FMRP y la aparición del síndrome de X-frágil (23,25,26,27).

Además se ha visto que las premutaciones son meióticamente inestables y mitóticamente estables, mientras que las mutaciones completas son meiótica y mitóticamente inestables, lo que da por resultado un patrón de mosaicismo al realizar el análisis de DNA en algunos afectados. Devye y colaboradores en 1992 demostraron que el patrón de mosaicismo fue idéntico en 3 pares de gemelos monocigotos estudiados, indicando que la metilación anormal y la heterogeneidad somática son establecidas en el desarrollo temprano (17).

Morton y Macpherson en 1992 y Chakravarti en el mismo año realizaron estudios de genética de poblaciones del síndrome de X-frágil, basándose en los estudios de árboles genealógicos de familias afectadas y clasificaron los alelos en 4 tipos de acuerdo a sus frecuencias:

1. N=normal: con una frecuencia de 0.9751.
2. S=estable: con una frecuencia de 0.0225 y una media de 90 generaciones.
3. Z=inestable: que tiene una frecuencia de 0.0014 y con una media de 2 generaciones.
4. L=mutación: cuya frecuencia es del 0.0010 y con una media de 1.4 generaciones (17).

Hasta la fecha se ha determinado que FMR1 es el único gen involucrado en el síndrome de X-frágil. La expansión del trinucleótido CGG asociado a metilación es la primera causa para la expresión del síndrome y se encuentra en el 95% de los afectados. Además, se han descrito pacientes con deleciones y mutaciones puntuales en el gen FMR1 y si expansión del trinucleótido, pero con las mismas características fenotípicas del síndrome, lo que confirma la participación del gen en la enfermedad. (28,29,30). También existen reportes de pacientes con mosaicismo somático (31,38).

En cambio, se ha encontrado la participación del gen FMR1, en otros 2 síndromes, además del X-frágil, que son la Falla ovárica prematura (POF) y el síndrome de X-frágil asociado a temblores/ataxia en edad adulta (FXTAS). Ambos,

se han descrito en individuos con expansión de repeticiones CGG entre 50 y 200 y se asocian con producción incrementada de RNAm. Esto sugiere que puede existir un efecto de ganancia de función del gen, pero esto aún sigue en estudio (32,33,34,35).

En el 2001 Hagerman y colaboradores reportaron 5 hombres mayores de 60 años con la premutación para X-frágil, con alelos entre las 78 y 98 repeticiones con temblores, movimientos parkinsonianos, déficit de conocimiento, atrofia generalizada e impotencia, presentándose de manera progresiva. En estos individuos los niveles de RNAm del gen FMR1 eran de 2-4 veces mayores de lo normal (17). Así mismo, Leehey y colaboradores en el 2003, reportaron 2 varones de 58 y 49 años con temblores en etapas iniciales, además de atrofia cerebral progresiva. Ambos eran portadores de una premutación en el gen FMR1 de 90 y 160 repeticiones respectivamente. También presentaban niveles elevados de RNAm (17).

D) PROTEINA FMRP

El resultado traduccional del RNAm del gen FMR1 es la proteína FMRP cuya función aún no se conoce del todo. Se ha localizado en grandes cantidades en cerebro, ovario, testículo, esófago, timo, ojos y vejiga; con moderada expresión en colon, útero, tiroides e hígado y no se ha encontrado en corazón, aorta y músculo (36,37,38).

El análisis de la secuencia de aminoácidos revela que no tiene homología con otras proteínas descritas. Sin embargo posee dos dominios KH, que son dominios de homología a la ribonucleoproteína K, y una región de residuos arginina y glicina, denominados caja RGG, lo cual sugiere que sea una proteína de unión al RNA (Figura 2). La proteína se une a RNA *in vitro*, además de que se obtiene junto con ribosomas al realizar separación de organelos celulares. Tiene una señal de localización nuclear y una señal de exportación nuclear lo que sugiere que sea una proteína que entra y sale del núcleo (Figura 3) (39,40).

FMRP también se cree que sea un componente de los RNP's asociado a polirribosomas, formando dímeros. Esto sugiere que FMRP puede modular el movimiento y la inestabilidad del RNAm *in vivo* (24).

En otros estudios se demostró que FMRP se localiza en polisomas intraneuronales en dendritas y espinas dendríticas, lo que sugiere que la proteína juega un papel importante en la traducción de proteínas relacionadas con la función dendrítica. Se cree que FMRP acarrea RNAm que codifican proteínas importantes para la función de las dendritas, las cuales al estar ausentes en los pacientes con X-frágil causa retraso mental (40).

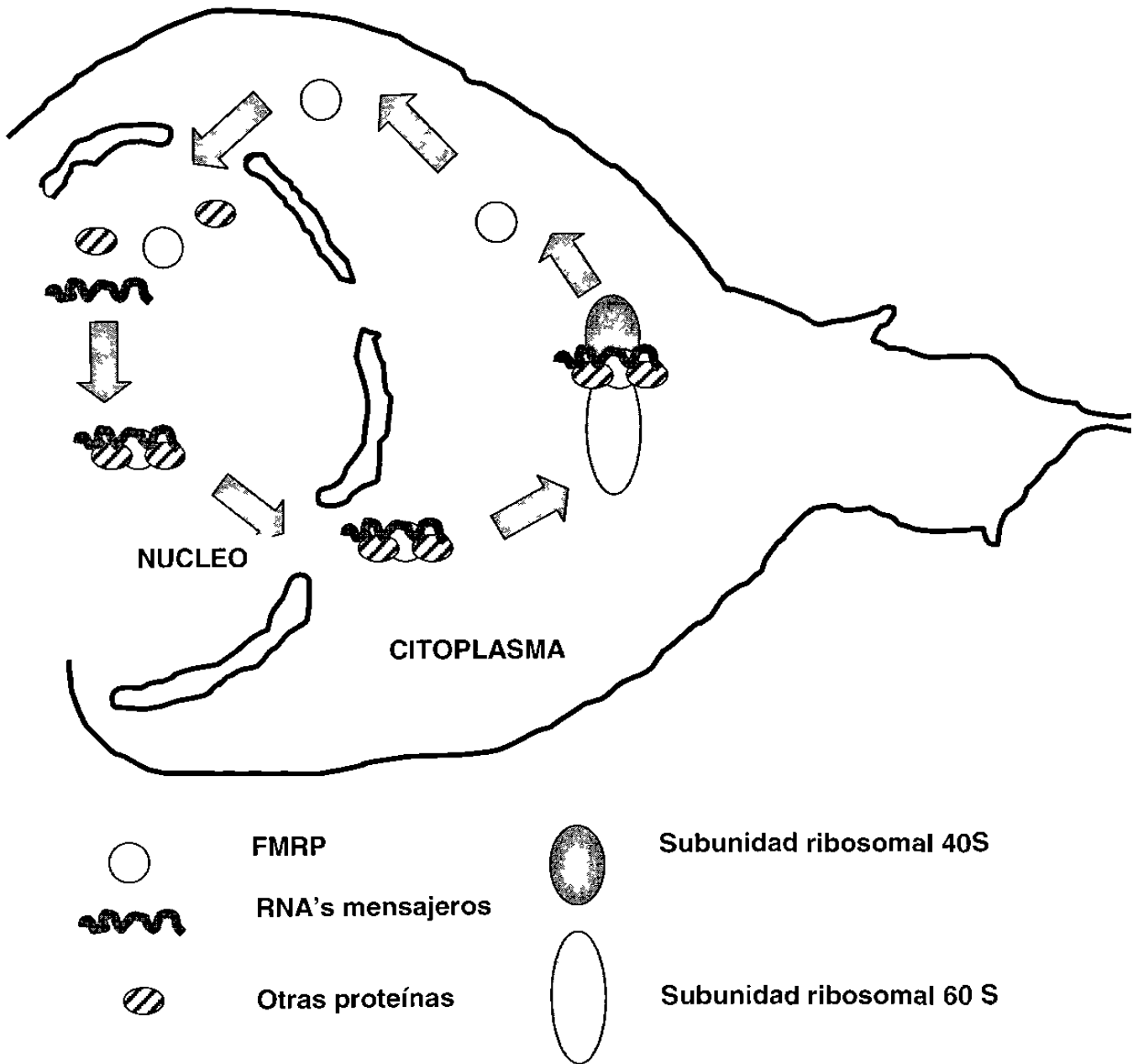


Figura 3. Modelo hipotético de la función de la proteína FMRP. Posee señales de importación y exportación nuclear por lo que puede viajar de núcleo a citoplasma. Se cree que se asocia con algunas proteínas para acarrear RNAs mensajeros hasta las subunidades ribosomales 40 S y 60 S (40).

E) PARADOJA DE SHERMAN

Sherman en 1985 trabajando con familias con síndrome de X-frágil describió un patrón singular de segregación del padecimiento a lo largo del árbol genealógico que indicaba que la probabilidad de retraso mental se incrementa con el número de generaciones por las cuales la mutación ha pasado.

Observó que cuando la premutación era transmitida por mujeres aumentaba de tamaño dando como resultado hombres o mujeres afectados, en cambio si era transmitida por varones casi no cambia o en ocasiones disminuye el tamaño. Esto indica la alta inestabilidad meiótica que presentan las premutaciones en las mujeres portadoras (1,41)(Figura 4).

Así, se propuso que la penetrancia y segregación del gen en sucesivas generaciones se caracteriza por una serie de hechos que no tienen explicación, a lo que se le llamó Paradoja de Sherman y que incluye lo siguiente:

1. El sexo y el coeficiente intelectual del portador influyen en la expresión de retraso mental en sus hijas.
2. La probabilidad de una mujer normal portadora de una premutación de procrear:
 - a) hijos varones con retraso mental es del 0.38%.

- b) hijos varones normales portadores de la premutación es del 0.12%.
 - c) hijas portadoras con retraso mental es del 0.16%.
 - d) e hijas portadoras de la premutación pero con fenotipo normal es del 0.34%.
3. La probabilidad de las mujeres portadoras con inteligencia subnormal de tener:
- a) Hijos con retraso mental es del 0.5%
 - b) Hijos portadores normales es del 0%
 - c) Hijas portadoras con retraso mental es del 0.28%
 - d) Hijas portadoras normales es del 0.22%
4. Los varones portadores normales, tienen un riesgo de 0% de tener hijos con retraso mental, hijos portadores normales e hijas portadoras con retraso mental, pero tienen un riesgo del 1% de tener hijas portadoras normales.
5. Los hijos con síndrome de X-frágil de madres afectadas tienen un 100% de penetrancia, es decir manifiestan la enfermedad (1,42).

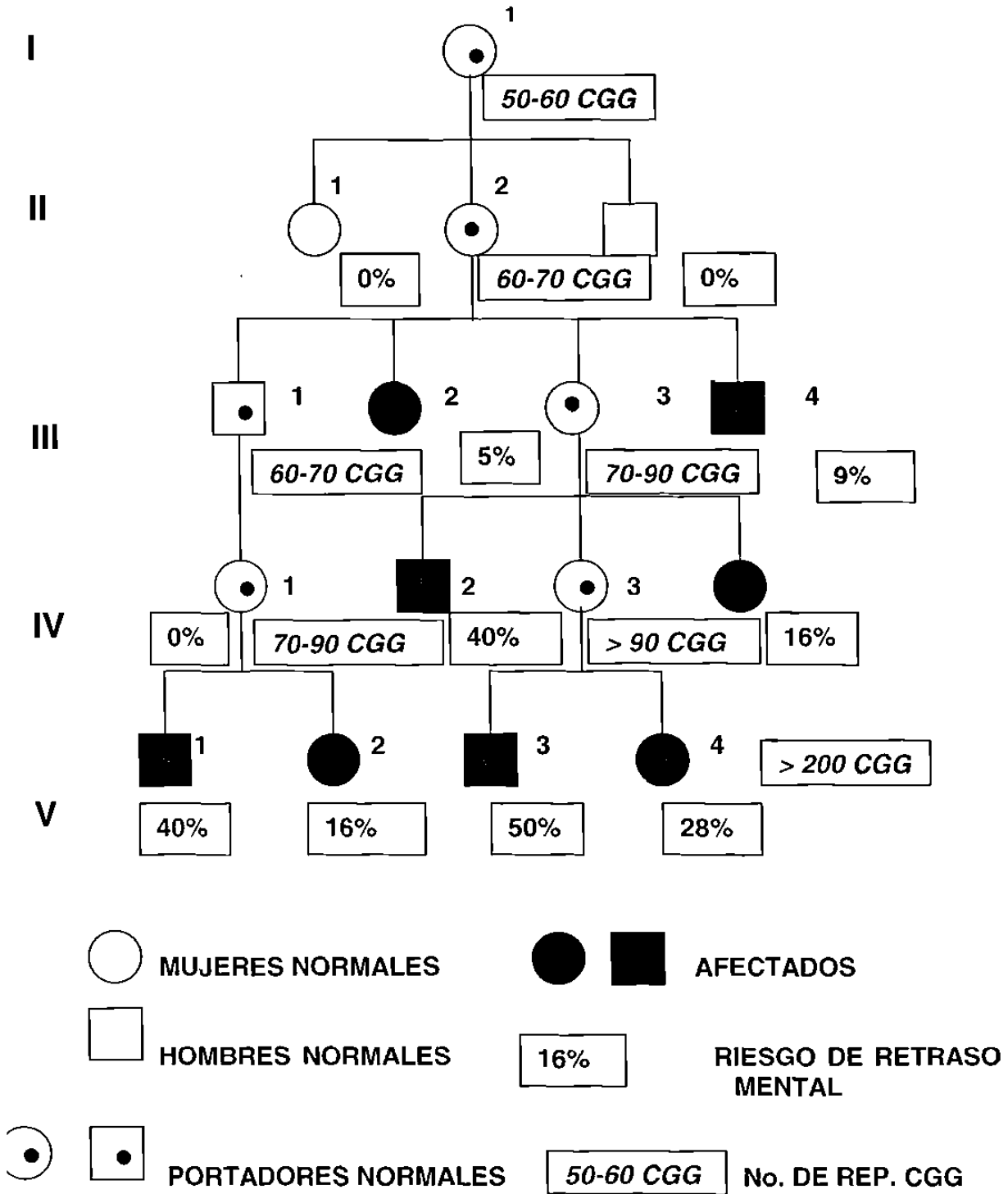


Figura 4. Paradoja de Sherman. Muestra que dependiendo de la posición en el árbol genealógico aumenta el número de repeticiones CGG y el riesgo de retraso mental (1,42).

F) PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Para realizar el diagnóstico clínico de el síndrome se realiza una historia clínica-genética basada en la exploración minuciosa del paciente buscando alguno de los signos característicos de la enfermedad, así como la elaboración del árbol genealógico tomando en cuenta todos los antecedentes familiares en relación al caso. Todo este favorece para orientar a un buen diagnóstico clínico y no confundirlo con otro tipo de retraso mental.

En algunas instituciones se le realizan al paciente una serie de test, con la finalidad de evaluar su coeficiente intelectual.

2. DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO

En este caso se realizan cultivos de linfocitos de sangre venosa periférica en un medio deficiente de ácido fólico el cual permite la expresión del sitio frágil que con las técnicas habituales no se visualiza. Las preparaciones se tiñen de manera directa con Giemsa y se analizan 100 metafases buscando intencionadamente el sitio frágil en el cromosoma X, se considera positivo si el 4% de las mitosis exhiben el sitio frágil (Figura 5). Para confirmar que el cromosoma con la fragilidad es el X, se realiza a la misma preparación la técnica de bandas GTG, con las cuales se obtiene un patrón específico de bandas para cada cromosoma (Figura 6).



Figura 5. Fotografía al microscopio de luz que muestra la expresión de FRAXA en un cultivo de linfocitos de sangre venosa periférica con medio deficiente en ácido fólico, empleando tinción normal con giemsa.

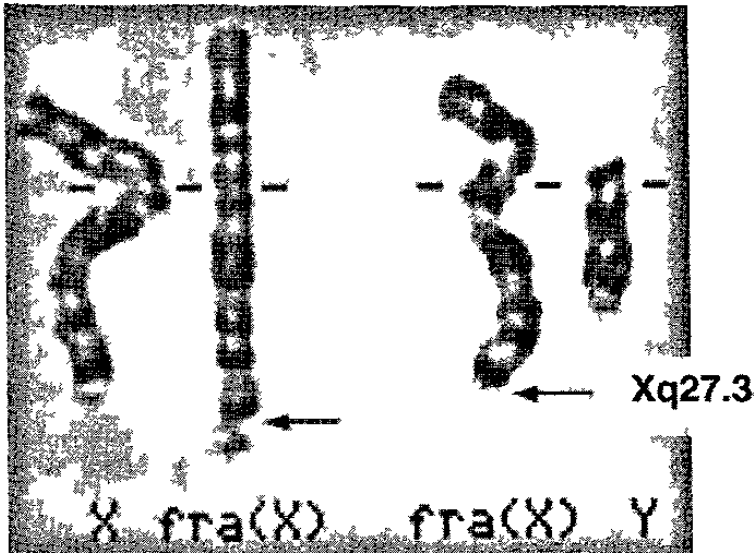


Figura 6. Fotografía del cromosoma X-frágil con técnica de bandeo GTG. Se muestra la localización del sitio frágil en Xq27.3 (señalado por flecha).

OTROS SITIOS FRÁGILES

El resultado citogenético no es definitivo para establecer el diagnóstico de X-frágil en el paciente, ya que a la fecha se han reportado otros tres sitios frágiles proximales a FRAXA (43). El primero de ellos se denomina FRAXE que fue descrito por Sutherland y Becker en una familia con 3 hermanos X-frágil positivos, de los cuales solo uno presentaba retraso mental, lo que hace suponer que la expresión del sitio frágil y el retraso mental no están asociados. La mayoría de las familias en las que se detectó este sitio frágil habían sido diagnosticados como síndrome de X-frágil por la expresión del sitio frágil en el cromosoma X y la presencia de retraso mental. Estos pacientes fueron negativos en el estudio molecular para la amplificación del número de repeticiones CGG. Por otro lado,

Romain y colaboradores reportaron una familia en la que FRAXE segregaba en toda la familia sin evidencia de retraso mental (44).

Estudios moleculares han demostrado que FRAXE se encuentra localizado en Xq28 entre 150 a 600 Kb distal a FRAXA y también es sensible a deficiencia de folatos. Esta compuesto por el trinucleótido repetido GCC teniendo la misma base molecular que FRAXA: expansión de trinucleótidos. En una persona normal se encuentran de 6-25 copias del trinucleótido, mientras que en individuos con más de 200 copias se expresa el sitio frágil. La naturaleza molecular de FRAXE aún no está bien establecida así como si tiene o no relación con retraso mental (44,45,46,47,48).

El segundo sitio frágil es FRAXD el cual está localizado en Xq27.2 y se ha relacionado con retraso mental familiar. Es un sitio frágil folato sensitivo cuya naturaleza molecular aún se desconoce y se confunde comúnmente con FRAXA (41,46,49).

El tercer sitio frágil denominado FRAXF fue localizado por Hirst y colaboradores con técnica de FISH, se encuentra distal a FRAXA y FRAXE en Xq27-28 y también es sensible a deficiencia de folatos. Este sitio frágil fué descrito por primera vez en una familia con algunos miembros afectados con retraso mental, cuyo árbol genealógico semejaba X-frágil, sin embargo el sitio frágil fue encontrado aún en miembros de la familia que no tenían retraso mental por lo que

se excluyó que estuviera relacionado la expresión del sitio frágil con la presencia de retraso mental (50).

Los tres sitios frágiles anteriores se confunden fácilmente con FRAXA, por lo cual el cariotipo es poco informativo para el diagnóstico del síndrome de X-frágil. Por lo anterior se tiene que realizar el diagnóstico de tipo molecular, analizando directamente las repeticiones CGG y el estado de metilación en el gen FMR1 en aquellas familias en las que se sospeche síndrome de X-frágil.

OTRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON AMPLIFICACIÓN DE REPETICIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS

A partir de 1991, año en que se describió que el síndrome de X-frágil era causado por la amplificación de un trinucleótido repetido, a la fecha se han descrito por lo menos 10 enfermedades genéticas que implican este mecanismo etiológico. En 1993 las entidades relacionadas fueron: Distrofia Miotónica (DM), Atrofia muscular espino-bulbar o enfermedad de Kennedy (AMEB), Corea de Huntington (CH) y Ataxia espinocerebelar tipo I (AEC1). En fechas más recientes se agregó la Atrofia dentorrubropalidoluisina (ADRPL). La cantidad de enfermedades vinculadas a repeticiones inestables aumenta con rapidez (Tabla 1) (1).

En la mayoría de los casos, estas mutaciones dinámicas ocurren en enfermedades cuyas características no corresponden a los patrones hereditarios mendelianos, como son la variabilidad en la expresión dentro de la hermandad,

penetrancia incompleta en las primeras generaciones, aumento de la gravedad en la ultimas generaciones e inicio más precoz de la enfermedad en cada nueva generación dentro de la misma genealogía, lo que se conoce como fenómeno de anticipación.

Tabla 1.

	FRAXA	FRAXE	AMEB	DM	CH	AEC1	ADRPL
Herencia	LXD	LX	LXR	AD	AD	AD	AD
Gen	FMR1	¿?	Receptor androgénico	DM	IT15	¿?	B37
Localización cromosómica	Xq27.3	Xq27	Xq11-12	19q13.3	4p16.3	6p22-23	12q
Triplete	CGG	CCG	CAG	CAG	CAG	CCG	CAG
No. Normal de repeticiones	6-54	6-25	11-31	5-35	9-36	25-36	7-33
No. Patológico	Hasta 200 es premutación o alelo intermedio, >200 mutación completa	Hasta 200 es premutación, >200 mutación completa	40-62	De 50-80 es protomutación, de 80-200 afectados	37-100	43-81	49-77
Proteína	FMRP	¿?	Receptor androgénico	Proteína quinasa	Huntingtina	¿?	¿?
Mecanismo patógeno	Silenciación transcripcional por metilación anómala	¿?	Proteína anormal, probable ganancia de función	Alteración de la concentración de RNA/proteína ¿?	Proteína anormal, probable ganancia de función	Proteína anormal, probable ganancia de función	Proteína anormal, probable ganancia de función

Otras enfermedades relacionadas con la expansión de trinucleótidos repetidos.

FRAXA: X frágil tipo A, FRAXE: X-frágil tipo E, AMEB: Atrofia Muscular Espinobulbar, DM: Distrofia Miotónica, CH: Corea de Huntington, AEC1: Atrofia Espinocerebelar tipo 1, ADRPL: Atrofiadentorrubropalidoluisina, LX: Ligada al X., LXD: Ligada al X dominante, LXR: Ligada al X recesiva., AD: Autosómica dominante (1).

Otra de las desventajas es que los geles no pueden ser teñidos con bromuro de etidio debido a que el 7-deaza-dGTP altera la estructura electrónica del DNA impidiendo que fluoresca (56,57,58,71). Varios autores han propuesto que sustituyendo parcialmente el análogo de base en una proporción 3:1, se logran amplificar y teñir secuencias de tamaño normal, sin embargo existen reportes de que se ha intentado reproducir esta metodología sin haber tenido éxito. En nuestro laboratorio, por espacio de varios meses, intentamos llevar a cabo este procedimiento sin lograr los resultados esperados (56-60).

Debido a lo anterior se tuvo la necesidad de implementar una metodología de diagnóstico basado en PCR pero que pudiera amplificar las regiones ricas en citosinas y guaninas. La modificación del DNA por bisulfito de sodio fue descrita por Shapiro y colaboradores y por Hayatsu y colaboradores en 1970, con el objeto de evitar los residuos 5-metilcitosina (5^mC), que participan en la metilación del DNA y que dan lugar a la inactivación de algunos genes durante el desarrollo (61-64).

Este procedimiento ha logrado conocimientos importantes sobre el papel que tiene la metilación de algunos genes durante el desarrollo. Actualmente se ha propuesto su uso para evitar las estructuras secundarias y lograr amplificar secuencias repetidas ricas en CG (65-69).

Recientemente, se ha propuesto la modificación del DNA para determinar el estado de metilación del gen FMR1 y la detección de la secuencia repetida CGG. De tal manera que se podría utilizar un PCR simple sin el uso de análogos de base visualizando el producto directamente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (56).

En el presente trabajo estandarizamos esta metodología en nuestro laboratorio para el diagnóstico del Síndrome de X-frágil, basados en los resultados obtenidos por Reynoso en 1999 en pacientes de Guadalajara, Jalisco, México (70).

Este tratamiento consta de tres pasos para llevar a cabo la modificación:

1. La adición del bisulfito de sodio al doble enlace de los carbonos 5-6 de la citosina.
2. Desaminación hidrolítica del complejo citosina-bisulfito, que da lugar a un complejo uracilo-bisulfito.
3. Remoción del grupo sulfonado por tratamiento con un álcali, resultando en un uracilo (61-65) (Figura 7).

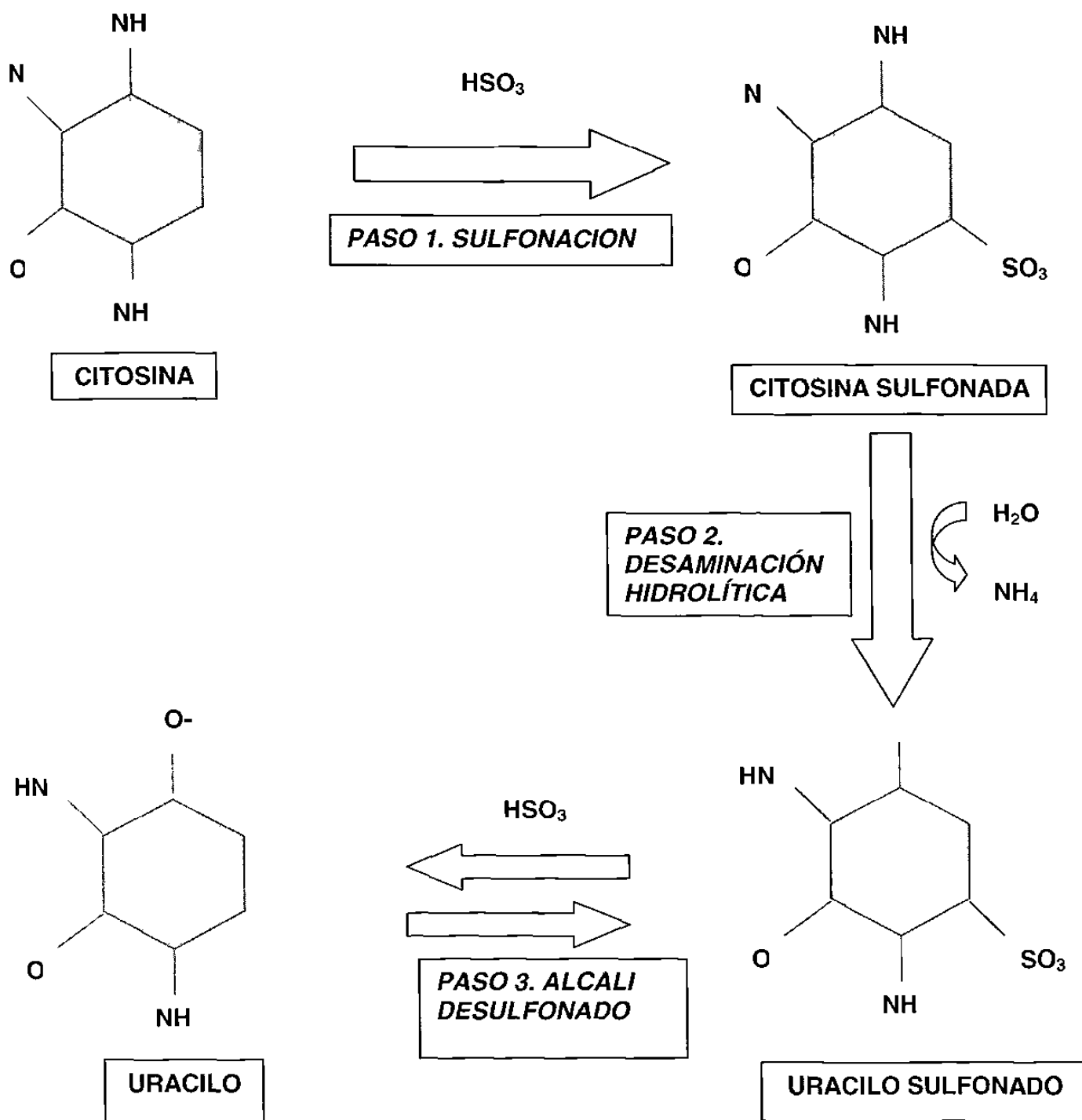


Figura 7. Modificación del DNA por bisulfito de sodio. Se muestran los pasos en los que se lleva a cabo la modificación de las citosinas a uracilos (56).

Una de las características del DNA tratado con bisulfito es que las cadenas resultantes ya no son complementarias una de otra. Obviamente es necesario diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar este DNA modificado (56,61,66,68,69).

El efecto del bisulfito en las cadenas varía dependiendo del estado de metilación del gen, esto significa que en la cadena 5'-3' de individuos sanos y portadores de la premutación, las citosinas de las secuencias repetidas CGG y de las islas CpG adyacentes (no metiladas), son convertidas en uracilo (UGG y UpG), mientras que en la cadena 3'-5', las 2 citosinas de la secuencia repetida CCG son convertidas en uracilos (UUG). Por otro lado, en aquellos individuos con la mutación completa, la secuencia repetida CGG y las islas CpG en la cadena 5'-3' se encuentran metiladas, por lo que la modificación no ocurre, mientras que en la cadena 3'-5', en la que una de las citosinas está metilada (C^mCG), ocurre modificación de la C no metilada CⁿUG (56) (Figuras 8 y 9).

Con el tratamiento con bisulfito, la cadena antisentido (3'-5') disminuye en un 67% su contenido de guaninas mientras que en la cadena con sentido (5'-3') disminuye solo un 33% (56). Todo lo anterior se muestra a continuación de manera gráfica:

DNA DE UN INDIVIDUO NORMAL

5'-AGGGGCTCATTACGCTCGATTAATGCATAGGCGGTCTCCG-3'

3'-TCCCCGAGTAATGCGAGCTAATTACGTATCCGCCAGAGGC-5'



DESNATURALIZACIÓN Y TRATAMIENTO CON BISULFITO DE SODIO



DNA MODIFICADO

5'-AGGGGUTCATTAUGUTUGATTAATGUATAGGUGGTUTUUG-3'

FR754F →

3'-TUUUUGAGTAATGUGAGUTAATTAUGTATUUGUUAGAGGU-5'

← FR526R

Figura 8. Modificación del DNA con bisulfito de sodio para amplificación de las repeticiones CGG.

DNA DE UN INDIVIDUO AFECTADO

5'-AGTCCGGCGGGCGGACGGCGGGCGGGCGGACGGCGG-3'
3'-TCAGGCCGCGCCTGCCGCCGCCGCCCTGCCGCC-5'



DESNATURALIZACIÓN Y TRATAMIENTO CON BISULFITO DE SODIO



5'-AGTCCGGCGGGCGGACGGCGGGCGGGCGGACGGCGG-3'
FR690F →
3'-TCAGGCCUGCUGCCTGCUGCUGCUGCUGCCTGCUGCU-5'
← FR611R

Figura 9. Modificación del DNA con bisulfito de sodio para amplificación de las islas CpG.

OBJETIVOS

- I. Detectar clínicamente a los afectados por síndrome de X-frágil mediante la elaboración de una historia clínico-genética.

- II. Determinar mediante el estudio citogenético la presencia del sitio frágil FRAXA mediante cultivos de linfocitos de sangre periférica en medio deficiente en ácido fólico en los individuos que se sospeche síndrome de X-frágil.

- III. Establecer un procedimiento molecular para detectar la región repetida y el estado de metilación del gen FMR1.

- IV. Analizar el DNA de los individuos con probable síndrome de X-frágil para detectar el número de repeticiones CGG y el estado de metilación de las islas CpG del gen FMR1.

MATERIAL Y MÉTODOS

A) PACIENTES

Para este trabajo se estudiaron 51 individuos que incluyen 29 propósitos provenientes de la consulta de Genética del Hospital Universitario "Dr. José E. González" y Facultad de Medicina, U.A.N.L. y de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Toluca. Se les valoró clínicamente y se obtuvo muestras de aquellos pacientes en los que se sospechaba síndrome de X-frágil. Además fueron incluidos en el estudio 22 de sus familiares, en algunos casos para ver si era posible detectar portadores de la enfermedad en la familia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con retraso mental que mediante la elaboración de la historia clínico-genética se sospeche el síndrome de X-frágil.
- Familiares de los pacientes con probable X-frágil que se sospeche puedan ser afectados o portadores del padecimiento.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes con retraso mental que pueda ser explicado por otras causas y no se sospeche síndrome de X-frágil.

B) REACTIVOS Y MATERIALES

1. Estudio citogenético

Para la toma de muestra de sangre venosa periférica se utilizaron jeringas PLASTIPAK de 3ml y solución de heparina 1000 UI. Para la siembra de la muestra se utilizó medio de cultivo 199 GIBCO No. de catálogo 12340-014; fitohemaglutinina liofilizada GIBCO No. de catálogo 10576-015; suero fetal de ternera GIBCO No. de catálogo 10082-022. En la cosecha para la obtención de cromosomas se emplearon: metanol, ácido acético, cloruro de potasio, de productos químicos Monterrey; así como colchicina marca SIGMA.

En la elaboración y tinción de laminillas se utilizaron portaobjetos y cubreobjetos marca MADESA, pipetas pasteur de plástico, tripsina marca GIBCO, pastillas para preparar buffer 6.8 y 7.2, colorante de Giemsa marca SIGMA y resina de secado rápido marca MERCK .

2. Aislamiento de DNA

Se utilizó Tritón 100X, NaCl, SDS, fenol saturado, cloroformo, alcohol isoamílico , etanol y TE1X, todos los reactivos de la marca SIGMA.

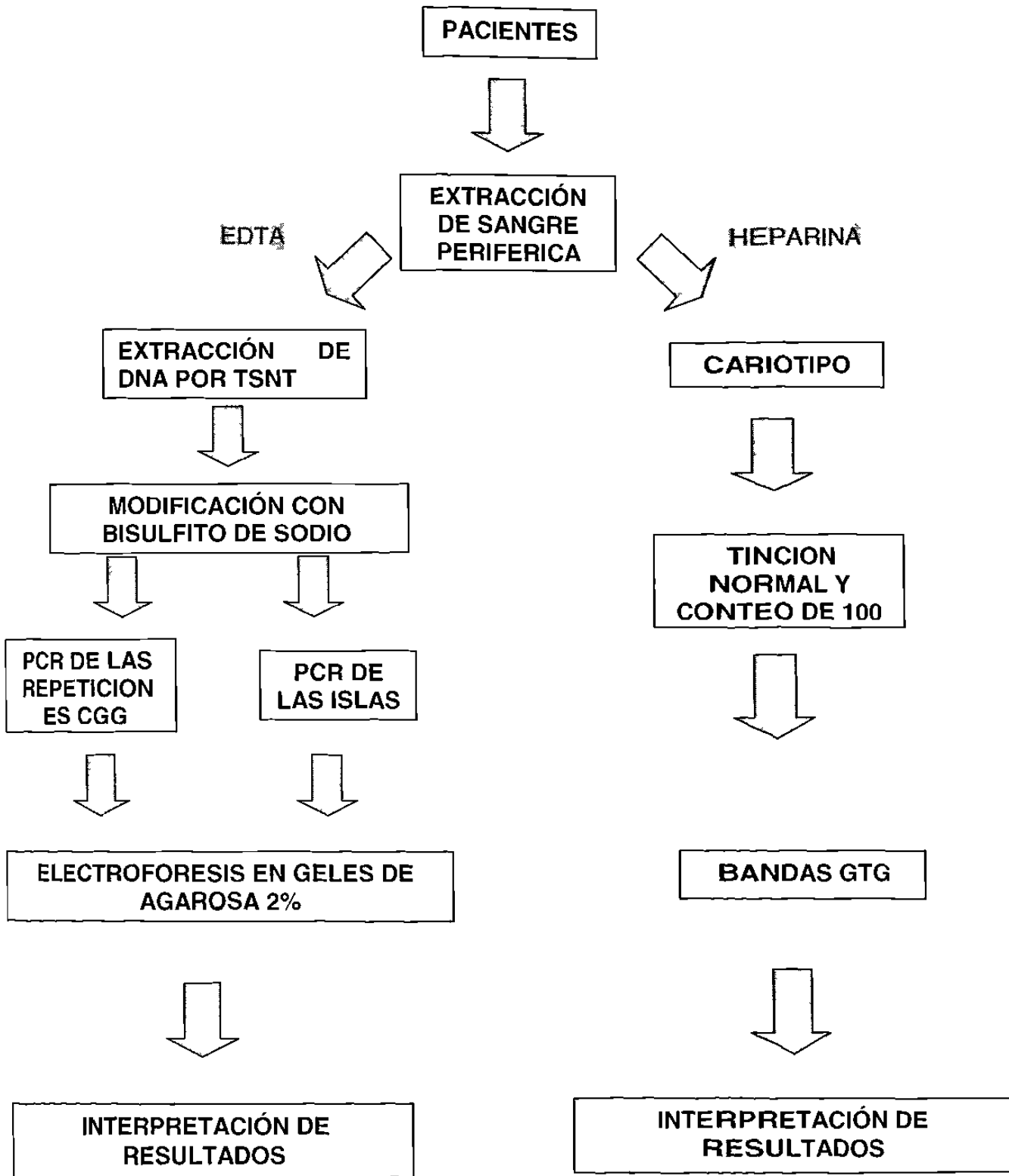
3. Modificación del DNA

Se usó bisulfito de sodio, hidroquinona, agua estéril grado HPLC, aceite mineral estéril, kit DNA clean-up de Promega # catálogo A7280, jeringas de 3ml estériles PLASTIPAK, isopropanol, NaOH, acetato de amonio y etanol, todos de SIGMA.

4. Amplificación y electroforesis de las secuencias a estudiar.

Kit de Taq polimerasa que contiene: $MgSO_4$, PCR enhancer, amplibuffer y la taq platinum. Los oligonucleótidos FR526R y FR754F para las repeticiones CGG y los oligos FR611R y FR690F para las islas CpG. Además se utilizaron dNTP's, agua estéril grado HPLC, agarosa y bromuro de etidio.

MÉTODOS: ESTRATEGIA GENERAL



ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

Las técnicas citogenéticas y moleculares utilizadas en el presente trabajo se estandarizaron con muestras de individuos normales que sirvieron como controles: 5 varones y 5 mujeres. Posteriormente se analizaron las muestras de los pacientes. Cabe aclarar que las cantidades de los especímenes biológicos tomados a los controles y a los pacientes fueron las mismas.

TOMA DE MUESTRA

A cada uno de los individuos a estudiar se les tomaron 3 ml de sangre periférica anticoagulada con heparina para el estudio citogenético y 1 ml de sangre venosa anticoagulada con EDTA para el estudio molecular. Ambas muestras fueron tomadas en una sola punción y con la mayor asepsia posible desinfectando perfectamente el área en la que se realizará la punción. Las muestras fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para su proceso.

A) ESTUDIO CITOGENÉTICO

1. TÉCNICA PARA LA EXPRESIÓN DE X-FRÁGIL USANDO MEDIO DEFICIENTE EN ÁCIDO FÓLICO

Para realizar el cultivo de linfocitos de sangre venosa periférica se utilizó la técnica descrita por Sutherland en 1987.

1. En un frasco de vidrio estéril conteniendo 5 ml de medio de cultivo 199 deficiente en ácido fólico con l-glutamina, añadir 1 ml de suero fetal bovino más 0.1 ml de fitohemaglutinina y 8 gotas de sangre venosa periférica anticoagulada con heparina. Realizar este procedimiento dentro de una campana de flujo laminar vertical y con la mayor asepsia posible.
2. Incubar durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y con humedad relativa del 100%.
3. Añadir 0.1 ml de una solución de colchicina 0.4 % e incubar a 37°C por espacio de 1 hora.
4. Pasar el cultivo a tubos cónicos y centrifugar a 1500 revoluciones por minuto durante 8 minutos. Retirar el sobrenadante cuidando de no remover el botón celular.
5. Posteriormente añadir gota a gota 5 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M precalentada a 37°C, resuspender e incubar 20 minutos a 37°C. Centrifugar a 1500 revoluciones por minuto durante 8 minutos.

6. Retirar el sobrenadante y añadir muy lentamente y por las paredes del tubo 5 ml de fijador de Carnoy frío. Resuspender el botón celular y centrifugar a 1500 revoluciones por minuto por 8 minutos.

7. Hacer de 3 a 4 lavados con fijador de Carnoy repitiendo el paso 6 hasta que el sobrenadante quede transparente y el botón celular blanco.

8. Para realizar las preparaciones cromosómicas centrifugar por última vez, decantar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml aproximadamente de fijador. Tomar con una pipeta Pasteur la suspensión celular y de una altura aproximada de 30 cm dejar caer 5-7 gotas en un portaobjetos limpio y desengrasado con etanol frío. Pasar el portaobjetos a la flama 2 veces y dejar secar.

9. Teñir las preparaciones cromosómicas en una solución de trabajo de Giemsa por 3 minutos.

10. Enjuagar en agua destilada, dejar secar y observar al microscopio.

11. Analizar 100 mitosis de cada individuo buscando intencionalmente rupturas en los cromosomas del grupo C para descartar fragilidad del cromosoma X.

2. TÉCNICA DE BANDAS GTG:

En los casos en los que se observaron sitios frágiles y que se sospechara que estuvieran en el cromosoma X, se realizó la técnica de bandas GTG en la misma laminilla, que consiste en tratar las preparaciones con una enzima proteolítica (tripsina) y teñir con Giemsa. Con esta metodología cada cromosoma adquiere un patrón de bandas específicas, pudiendo establecer con certeza que

se trate del cromosoma X, y además identificar la posición citogenética de la ruptura en Xq27.3.

Nota: Antes de iniciar el bandeo, la preparación cromosómica tiene que estar libre de aceite de inmersión, esto puede lograrse introduciendo la laminilla en xilol y dejar secar. Posteriormente la laminilla se desteñirá para continuar con lo siguiente:

1. Sumergir la preparación cromosómica en una solución de tripsina a temperatura ambiente por espacio de 30 segundos (el tiempo dependerá de la madurez de la preparación, entre más viejas sean requerirán de mayor tiempo de exposición a la tripsina).
2. Enjuagar en buffer pH 7.2 por dos ocasiones dejando 30 minutos la preparación en el segundo lavado.
3. Teñir en una solución de trabajo de Giemsa durante 3 minutos.
4. Enjuagar en agua destilada y dejar secar.
5. Revisar al microscopio para checar la calidad del bandeo . En caso de que el bandeo haya sido exitoso, montar la preparación con cubreobjetos y resina. En caso de que no haya habido bandeo, la laminilla puede volver a desteñirse e intentar de nueva cuenta el bandeo.

3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEL ESTUDIO CITOGENÉTICO

Este estudio se considera positivo si se encuentran más de 4 células con la fragilidad cromosómica en Xq27.3 confirmada por bandas GTG.

B) ESTUDIO MOLECULAR

1. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO POR EL METODO TSNT

1. En un tubo eppendorf colocar 300 µl de sangre anticoagulada con EDTA. Agregar 200 µl de buffer de lisis y 500 µl de fenol saturado.
2. Mezclar por inversión aproximadamente 1 minuto.
3. Agregar 100 µl de SEVAG. Vórtex 5 minutos.
4. Agregar 200 µl de TE 1X y mezclar por inversión.
5. Centrifugar 16,000 revoluciones por minuto durante 15 minutos.
6. Transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorf .
7. Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol al 100% frío.
8. Centrifugar a 16,000 revoluciones por minuto durante 2 minutos.
9. Decantar el sobrenadante.

10. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Dejar secar por 24 horas.

11. Resuspender en plataforma de movimiento la pastilla en TE 1X a 37°C durante 30 minutos. Etiquetar y utilizar inmediatamente o almacenar a -20°C.

2. MODIFICACIÓN DEL DNA POR BISULFITO DE SODIO

El DNA de cada paciente fue sometido al proceso de modificación con bisulfito de sodio que consiste en 3 pasos:

- a) Tratamiento con bisulfito de sodio
- b) Limpiado del DNA.
- c) Tratamiento alcalino

a) TRATAMIENTO CON BISULFITO DE SODIO

1. En un tubo eppendorf colocar 30 µl de DNA del paciente a estudiar.
2. Desnaturalizar el DNA a 95°C durante 5 minutos.
3. Transcurrido el tiempo introducir el tubo en hielo inmediatamente.
4. Agregar 22 µl de NaOH 1M.
5. Incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Añadir 400 µl de solución de bisulfito de sodio e hidroquinona, recién preparada, más 48 µl de agua estéril grado HPLC. Agitar y centrifugar 2 pulsos.

7. Añadir 150 µl de aceite mineral estéril .

8. Incubar a 55°C y 300 revoluciones por minuto durante 16 horas exactamente.

b) LIMPIADO DEL DNA

1. Tomar con una micropipeta el DNA modificado y pasarlo a otro tubo eppendorf, cuidando de no pasar aceite mineral.

2. Añadir 1 ml de resina del kit.

3. Mezclar varias veces por inversión de manera suave.

4. Con una micropipeta pasar todo el contenido del tubo a un barril de una jeringa de 3 ml nueva, que contendrá en su punta una columna del kit, y colocar el émbolo de la jeringa presionando un poco.

5. Dejar que la solución baje lentamente, cuando se detenga, presionar un poco el émbolo.

6. Quitar el émbolo y añadir 2 ml de isopropanol 80% a temperatura ambiente, y colocar nuevamente el émbolo y presionar poco a poco.

7. Quitar la columna y pasarla a otro tubo eppendorf nuevo y desechar la jeringa.

8. Centrifugar a 10,000 revoluciones por minuto durante 2 minutos, para eliminar el isopropanol.

9. Transferir la columna a otro tubo eppendorf y añadir 50 μ l de agua estéril grado HPLC a 70°C. Esperar 1 minuto exactamente.

10. Centrifugar el tubo con la columna a 10,000 revoluciones por minuto por 20 segundos.

11. Eliminar la columna.

c) TRATAMIENTO ALCALINO

1. Al tubo eppendorf conteniendo el DNA modificado, añadir 24 μ l de NaOH 1M. Incubar a 37°C por 15 minutos. Añadir 6 μ l de agua estéril grado HPLC.

2. Neutralizar la solución agregando 120 μ l de acetato de amonio 5M, agitar con vórtex.

3. Precipitar el DNA añadiendo 600 μ l de etanol 100% frío.

4. Centrifugar a 10,000 revoluciones por minuto por 6 minutos.

5. Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla por 24 horas a temperatura ambiente.

6. Resuspender en 50 μ l de TE1X. Incubar a 37°C y 300 revoluciones por minuto durante 20 minutos.

7. Etiquetar y almacenar a 4°C.

3. AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS A ESTUDIAR

A cada uno de los pacientes se les realizó una doble estrategia diagnóstica mediante PCR: 1. Amplificación de la región del gen FMR1 que contiene las repeticiones CGG y 2. Amplificación de un fragmento que contiene las islas CpG adyacentes al gen para evaluar su estado de metilación. Los iniciadores están diseñados específicamente para el DNA metilado.

REPETICIONES CGG

Para esta estrategia los iniciadores están diseñados para amplificar la cadena 3'-5' (antisentido) y se pegarán a ésta solamente cuando las citosinas no metiladas hayan sido convertidas en uracilo, lo que significa que los iniciadores se alinearán únicamente con la secuencias de individuos sanos y portadores de la premutación, (Figura 8) la secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

- **FR526R:** (GGG AGT TTG TTT TTG AGA GGT GGG) N = 24
- **FR754F:** (CAA CCT CAA TCA AAC ACT CAA CTC CA) N = 26

Por la ubicación y tamaño de los iniciadores utilizados, el fragmento esperado es de 215 pb, más el tamaño de la secuencia de las repeticiones CGG que será diferente en cada uno de los individuos a estudiar, tanto controles como pacientes. Para determinar el número de repeticiones CGG se utilizará la siguiente fórmula:

N° de repeticiones CGG = Tamaño del amplificado en pares de bases - 215

3

ISLAS CpG

En varones afectados con la mutación completa y en mujeres sanas (por el X inactivo) se amplificarán las islas CpG del gen FMR1 que están metiladas. En ambos casos los iniciadores están diseñados para amplificar únicamente las secuencias que tienen citosinas y que no fueron modificadas por estar metiladas. Se espera un amplificado de 80 pb (Figura 9). La secuencia de los iniciadores para amplificar islas CpG es la siguiente:

- **FR611R:** (CGT CGT CGC GTT GTC GTAC) N = 19
- **FR690F:** (AAC GAC GAA CCG ACG ACG) N = 18

a) Mezcla de reacción para la amplificación de las repeticiones CGG.

En un tubo eppendorf de 0.5 ml colocar para cada muestra a analizar:

<u>REACTIVO</u>	<u>1X (μl)</u>
Agua estéril grado HPLC	10.05
Amplibuffer 10X kit	2.5
MgSO ₄ 50mM	1.0
DNTP's 10 mM	2.0
Oligonucleótido FR526R 100 ng/μl	1.85

Oligonucleótido FR754F 100 ng/μl	1.90
Potenciador PCR	2.5
DNA modificado	3.0
Taq platinum kit	0.2

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Paso 1. 94°C durante 5 minutos.

Paso 2. 93°C durante 1 minuto.

Paso 3. 58°C durante 1 minuto.

Paso 4. 74°C durante 2 minutos.

Paso 5. Repetir paso 2-4 31 ciclos.

Paso 6. 74°C durante 10 minutos.

Paso 7. 4°C durante 10 minutos.

Paso 8. fin

b) Mezcla de reacción para la amplificación de las islas CpG:

En un tubo eppendorf de 0.5 ml colocar para cada una de las muestras:

<u>REACTIVO</u>	<u>1X (μl)</u>
Agua estéril grado HPLC	11.80
Amplibuffer 10X kit	2.5
MgSO ₄ 50mM	1.0
DNTP's 10 mM	2.0

Oligonucleótido FR611R 100 ng/μl	1.0
Oligonucleótido FR690F 100 ng/μl	1.0
Potenciador PCR	2.5
DNA modificado	3.0
Taq platinum kit	0.2

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Paso 1. 94°C durante 5 minutos.

Paso 2. 93°C durante 30 segundos.

Paso 3. 65°C durante 30 segundos.

Paso 4. 74°C durante 30 segundos.

Paso 5. Repetir paso 2-4 31 ciclos.

Paso 6. 74°C durante 10 minutos.

Paso 7. 4°C durante 10 minutos.

Paso 8. fin

4. ELECTROFORESIS

Los productos amplificados fueron corridos en geles de agarosa 2%, a 80V, durante aproximadamente 1 hora. Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio durante 5 minutos, visualizados en luz ultravioleta y fotografiados.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR

Tomando como base el tamaño de los iniciadores utilizados en cada amplificación y su sitio de inicio se puede establecer al tamaño esperado de los fragmentos. Los resultados esperados son los siguientes:

	PCR de repeticiones CGG	PCR de las islas CpG
Hombres normales	Amplifican un fragmento de aprox. 300 pb.	Negativo
Mujeres normales	Amplifican un fragmento de aprox. 300 pb., correspondiente a los dos alelos normales.	Positivo con un fragmento de aprox. 80 pb, debido al X inactivo
Hombres portadores	Amplifican un fragmento mayor a 300 pb.	Negativo
Mujeres portadoras	Amplifican un fragmento mayor a 300 pb del alelo intermedio o premutado y uno de aprox. 300 pb, del alelo normal.	Positivo con un fragmento de aprox. 80 pb, debido al X inactivo
Hombres afectados	No amplifican debido al alto número de repeticiones CGG	Positivo con un fragmento de aprox. 80 pb, debido a la metilación del gen FMR1.
Mujeres afectadas	Amplifican un fragmento de aprox. 300 pb y el otro alelo no amplifica debido al alto número de repeticiones CGG.	Positivo con un fragmento de aprox. 80 pb, debido al X inactivo y a la metilación del gen FMR1.

RESULTADOS

Para este trabajo se estudiaron un total de 51 individuos pertenecientes a 25 familias que incluyeron 29 propósitos, enviados con diagnóstico clínico de síndrome de X-frágil de la consulta de Genética del Hospital Universitario “Dr. Eleuterio González” y Facultad de Medicina, U.A.N.L. y 22 de sus familiares que fueron incluidos en algunos casos.

Primero se procedió a estandarizar las metodologías de diagnóstico citogenéticas y moleculares en 10 individuos control, 5 hombres y 5 mujeres normales y sin antecedentes de retraso mental. Posteriormente se analizaron las muestras de los pacientes.

1. Estudio Citogenético

En el estudio citogenético de linfocitos de sangre periférica se encontró que 2 de los 51 individuos estudiados (4%) expresaban la fragilidad cromosómica. Los pacientes fueron FRA 4 y FRA 14, con 4% y 16% de expresión del sitio frágil respectivamente (Figuras 10 y 11). Sin embargo, al realizar el estudio molecular de las repeticiones CGG se encontró que amplificaban fragmentos de aproximadamente 300 pb lo que corresponde a 28 repeticiones CGG que está dentro del rango normal. Además de que resultaron negativos para el análisis de metilación en las islas CpG del gen FMR1, lo que indica que no está metilado.

150217

No se encontró fragilidad cromosómica en los 10 individuos empleados como controles.

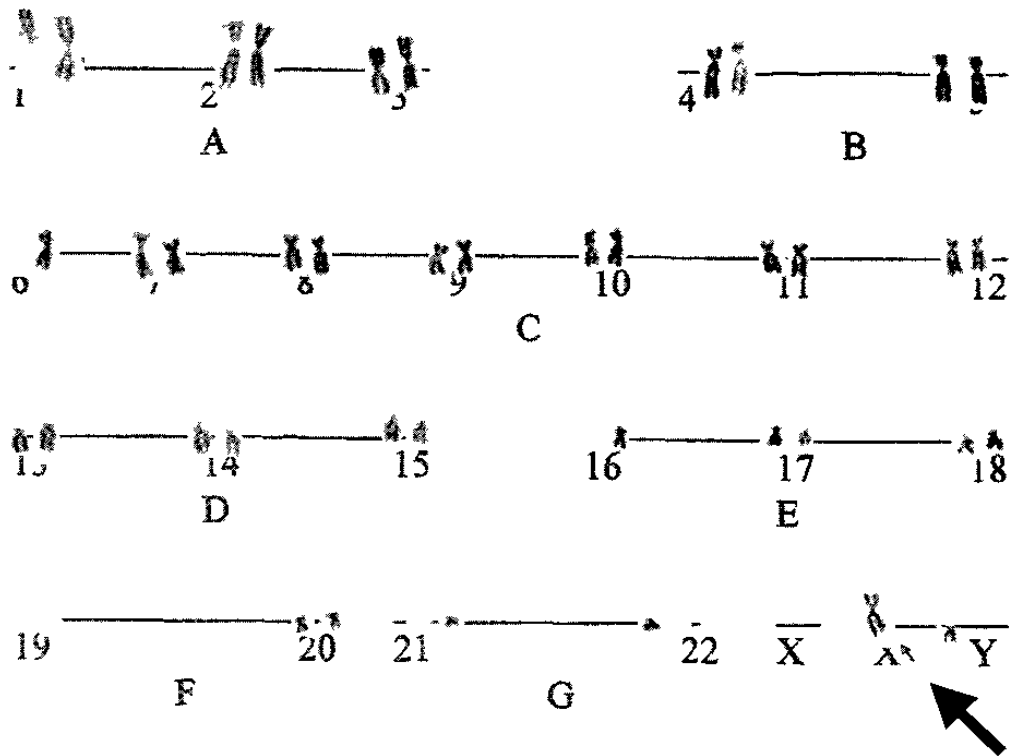


Figura 10. Cariotipo armado con tinción normal del paciente FRA 4. Se encontró un 4% de expresión del sitio frágil (marcado por flecha), resto del cariotipo normal.

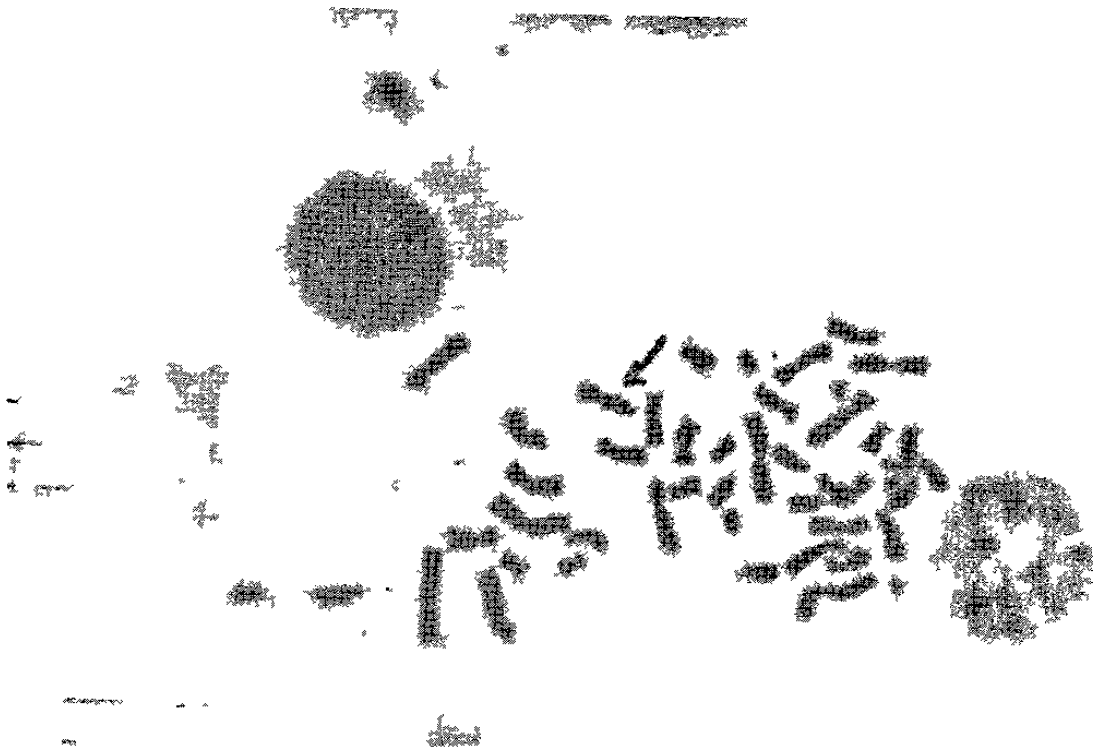


Figura 11. Metafase con tinción normal del paciente FRA 14. En este paciente se encontró un 16% de expresión del sitio frágil en el cromosoma X (indicado por flecha), resto del cariotipo normal.

2. Estudio Molecular

Aislamiento del DNA

Para la estandarización de la técnica para aislar DNA, mediante el método de TSNT, se emplearon primero las 10 muestras de individuos controles. Algunos de los resultados del aislamiento son los siguientes:

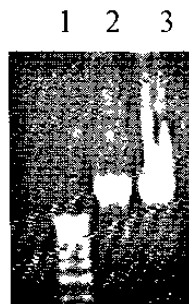


Figura 12. Aislamiento de DNA genómico. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb; carriles 2 y 3, DNA aislado de individuos controles mediante el método TSNT. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

a) Estandarización de los PCR's para amplificar las repeticiones CGG y las islas CpG del gen FMR1.

Los 10 individuos controles, 5 hombres y 5 mujeres incluidos en este estudio fueron positivos para el PCR de las repeticiones CGG con alelos de 300 pb correspondientes a 28 repeticiones, considerado como normal.

En el PCR de las islas CpG no se encontró amplificación en los varones controles, debido a que su gen FMR1 está activo. Sin embargo las mujeres controles fueron positivas para este PCR, amplificando un fragmento de 80 pb, que representa el X inactivo normal (Figura 13).

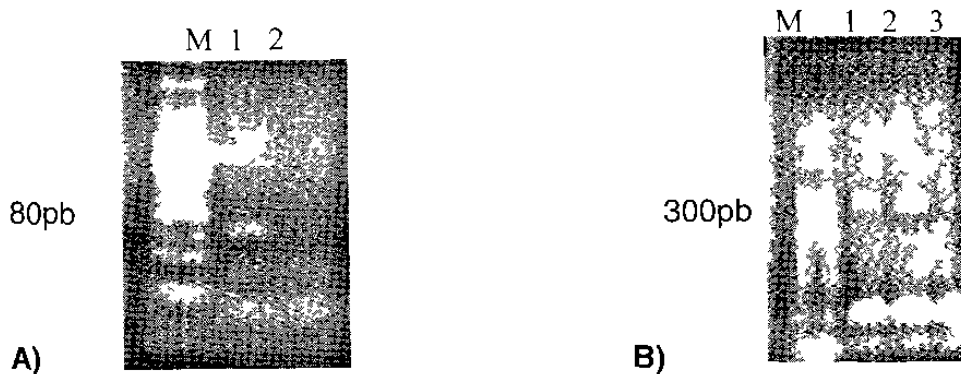


Figura 13. Estandarización de las reacciones de amplificación para FRAXA. Se muestran algunos de los resultados obtenidos en los individuos control. **A**, amplificación con los oligonucleótidos FR611 y FR690 de las islas CpG metiladas adyacentes a las repeticiones CGG en el gen FMR1; Carril 1: mujer normal en el que se amplifica cromosoma X metilado. Carril 2: Negativo, sin DNA. M: Marcador de peso molecular de 25pb. **B**, Carriles 1y 2: producto amplificado de aproximadamente 300 pb correspondiente a las repeticiones CGG en un individuo normal (aprox. 28 CGG)l, obtenido con los oligonucleótidos FR754 y FR526. Carril 3: Negativo, sin DNA. M: Marcador de peso molecular de 50pb.

Resultados de pacientes:

De los 51 individuos analizados molecularmente mediante la amplificación por PCR de DNA modificado, se logró detectar lo siguiente:

- **5 propósitos varones (10%) con mutación completa** de más de 120 repeticiones CGG. Estos alelos fueron detectados por no amplificación en el PCR de las repeticiones CGG, debido al alto número de repeticiones del trinucleótido y por lo tanto al alto contenido de Citosinas y Guaninas. Estos pacientes además fueron positivos para el análisis de metilación de las islas CpG, con un fragmento de 80 pb, lo que indica que el gen FMR1 está metilado.
- **2 propósitos varones con mosaico somático (4%)**. Uno de ellos amplificó un fragmento de 410 pb para las repeticiones CGG que comprende 65 repeticiones del trinucleótido y otro paciente amplificó un fragmento de 500 pb aproximadamente 95 repeticiones CGG, ambos poseían otro alelo con más de 120 repeticiones CGG, que no era visualizado por el alto contenido de repeticiones y de citosinas y guaninas, pero que fue detectado debido a que amplificaban el fragmento de 80 pb del PCR de las islas CpG que detecta el estado de metilación del gen FMR1.
- **2 propósitos varones (4%) con alelos intermedios** de 40 repeticiones CGG y con islas CpG negativas, lo que indica que el gen no está metilado.
- **42 individuos hombres y mujeres (82%) con alelos entre el rango normal** entre 28 y 35 repeticiones CGG. Estos incluyeron 25 pacientes que fueron enviados como propósitos. Además 14 fueron mujeres normales que

resultaron positivas para el análisis de las islas CpG, debido a la inactivación de uno de los cromosomas X .

A continuación se presentan los resultados de los pacientes incluidos en el estudio. Se presenta el análisis familiar en aquellos en los que fue posible analizar a varios miembros de su familia, incluyendo una breve descripción de las características clínicas, árbol genealógico indicando a los individuos propósitos del estudio y resultados obtenidos. En los pacientes en los que no fue posible analizar mas miembros de la familia se incluye solo la descripción clínica y los resultados.

FAMILIA 1

DESCRIPCIÓN:

Consta de dos hijos varones afectados con retraso mental: FRA1 (II-1) Y FRA 2 (II-2) con diagnóstico clínico de X-Frágil. La madre de los afectados FRA3 (I-1) también fue incluida en el estudio. Pertenece a familia con múltiples antecedentes de individuos con retraso mental, solo se muestra parte del árbol genealógico (Figura 14). El análisis molecular de las repeticiones CGG e islas CpG confirmó que ambos hijos eran afectados. Además fué posible determinar que el miembro II-1 presentaba mosaicismo, es decir que tenía dos líneas celulares diferentes una con un alelo con la mutación completa, lo que le daba el estado de afectado, y otra con una premutación. Ambos fueron diagnosticados como síndrome de X-frágil. La madre amplificó un alelo de 300 pb aproximadamente 28 repeticiones CGG y fue positiva para el PCR de las islas CpG, por el X normal inactivo, no fue posible identificar el alelo premutado .

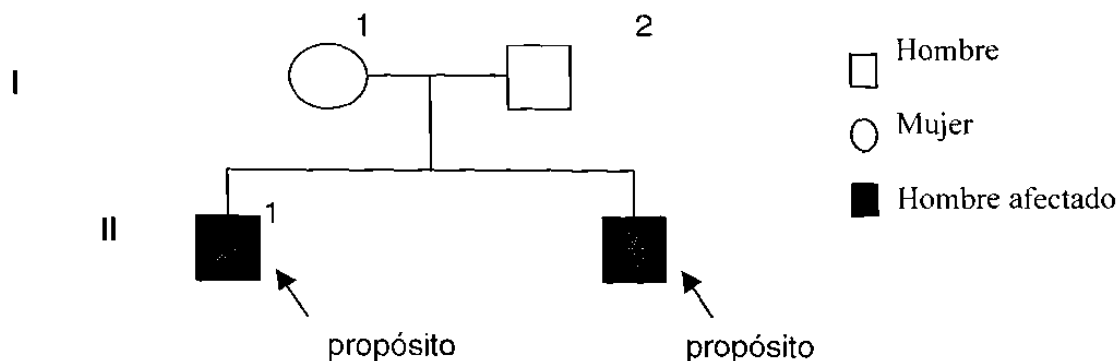


Figura 14. Árbol genealógico de la Familia 1: I-1: Padre de los afectados (no incluido en el estudio); I-2: madre de los afectados, identificada para el presente estudio como FRA 3; II-1: Individuo afectado con retraso mental identificado como FRA 1; II-2: individuo afectado con retraso mental, identificado como FRA 2.

ANÁLISIS MOLECULAR:

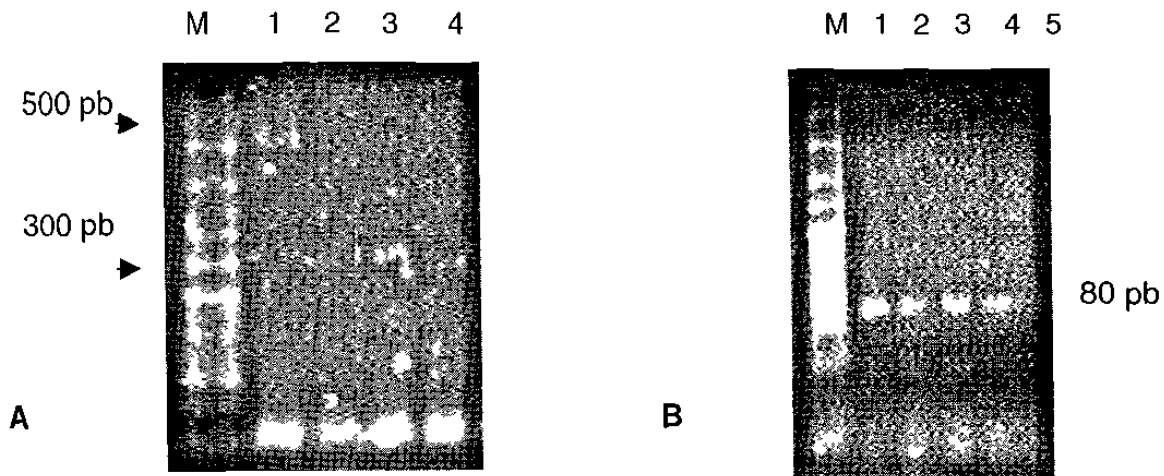


Figura 15. Análisis molecular de la Familia 1. (A) Detección molecular de las repeticiones CGG del gen FMR1. Carril 1:(II-1, FRA1) varón afectado con premutación, el producto amplificado es de aproximadamente 500 pb que corresponden a 95 repeticiones. Carril 2: (II-2, FRA 2) varón afectado, sin amplificación. Carril 3: (I-2, FRA 3) madre de los afectados. Carril 4: Negativo, sin DNA. M : Marcador de peso molecular 25pb. Agarosa al 2.5% **(B) Detección molecular de islas CpG del gen FMR1.** Carriles 1 y 2: Pacientes II-1, II-2 respectivamente. Carril 3: (I-2) Madre de los afectados, Carril 4: Control positivo de la amplificación, con un producto esperado de 80pb. Carril 5: Negativo, sin DNA. M: Marcador de peso molecular. Agarosa al 2.5%.

TABLA 2.

No.	CGG	PB.	No. CGG	ISLAS CpG 80 PB.	INTERPRETACION
FRA 1	+	500	95	+	Mosaico somático con un alelo premutado de 65 CGG y otro con mutación completa que no amplifica de mas de 200 CGG metilado.
FRA 2	-	-	Más de 200	+	Mutación completa mas de 200 CGG, metilado
FRA 3	+	300	28	+	Un alelo normal de 28 CGG e islas CpG positivas por inactivación del X normal. O probable mosaico somático ¿????

**Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 1.
FAMILIA 5**

DESCRIPCIÓN:

Cuenta con un miembro afectado por retraso mental FRA 14 (II-5) con diagnóstico clínico de X-frágil. Se analizaron: el hermano gemelo del afectado FRA 15 (II-6) y sus 3 hermanas FRA 18 (II-2), FRA 19 (II-4) Y FRA 20 (II-7), sus padres FRA 16 (I-2) Y FRA 17 (I-1), además de su tío FRA 21 (I-3) y su prima FRA 22 (II-8) (Figura 16).

El propósito fue positivo para el estudio citogenético con una expresión del sitio frágil del 14%. Sin embargo fue negativo para el estudio molecular. Su hermano gemelo resultó negativo para el estudio citogenético y el molecular así como el resto de los familiares analizados.

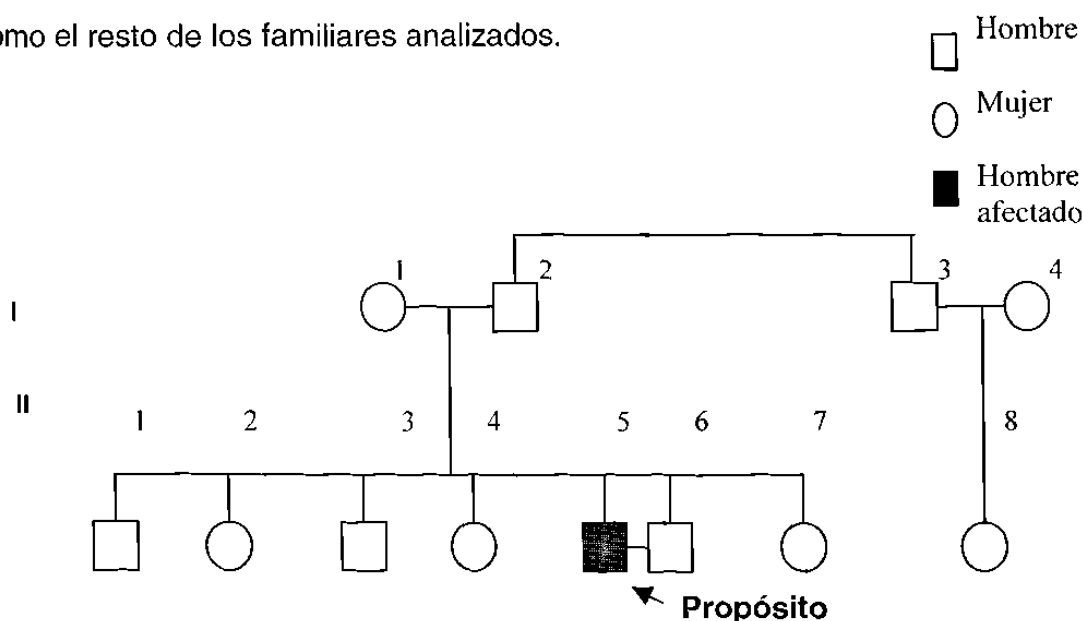


Figura 16. Árbol genealógico de la Familia 5. I-1: padre del afectado, identificado para el presente estudio como FRA 17; I-2: madre del afectado (FRA 16); I-3: tío del afectado (FRA 21); II-2, II-4 y II-7 hermanas del afectado identificadas como FRA 18, 19 y 20 respectivamente; II-5, individuo con retraso mental, propósito del estudio, identificado como FRA 14; II-6, hermano gemelo del propósito (FRA 15); II-8: prima del afectado (FRA22). El resto de los individuos no fueron incluidos en el estudio.

ANÁLISIS MOLECULAR:

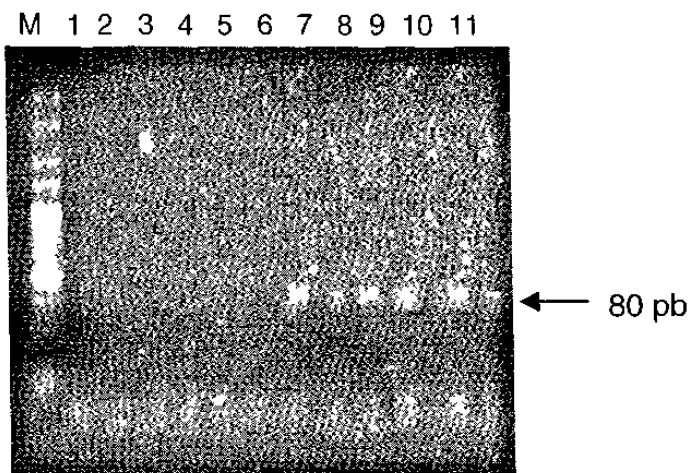


Figura 17. Amplificación de las islas CpG de la Familia 5.. Carril 1: FRA 14 (II-5) Varón afectado (sin amplificación); Carril 2: FRA 15 (II-6); Carril 3: FRA 16 (I-2); Carril 4: FRA 21(I-3). Carril 5: FRA 17 (I-1); Carril 6:FRA 18 (II-2); Carril 7: FRA 19 (II-4); Carril 8: FRA 20 (II-7); Carril 9 FRA 20 (II-7); Carril 10: FRA 22 (II-8); Carril 11: Control positivo. M: Marcador de peso molecular 25 pb. Gel de agarosa 2.5%.

Tabla 3.

No.	CGG	PB	No. CGG	ISLAS CpG 80 PB	INTERPRETACION
RA 14	+	300	28	-	Normal
RA 15	+	300	28	-	Normal
RA 16	+	300	28	-	Normal
RA17	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.
RA 18	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.
RA 19	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.
RA 20	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.
RA 21	+	300	28	-	Normal.
RA 22	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.

Interpretación de Análisis Molecular de la Familia 5.

FAMILIA 6

DESCRIPCIÓN:

En esta familia, solo uno de los pacientes tiene diagnóstico clínico presuntivo de X-frágil. Se incluyeron en el estudio el afectado FRA 23 (II-1), su hermana FRA24 (II-2) y su mamá FRA 25 (I-2), estas últimas para ver si eran portadoras de un alelo intermedio o premutado (Figura 18). Mediante el análisis molecular se comprobó el diagnóstico positivo para X-frágil en éste paciente, aunque no se detectó la premutación en su madre y hermana.

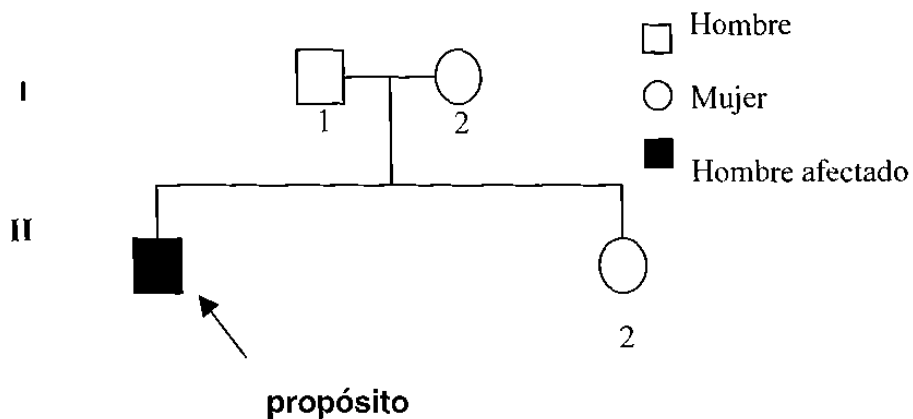


Figura 18. Árbol genealógico de la Familia 6. I-1, padre del propósito (no incluido en el estudio); I-2: madre del afectado, identificada para el presente estudio como FRA 25; II-1, individuo propósito del estudio afectado con retraso mental (FRA 23), II-2: hermana del propósito (FRA 24).

ANÁLISIS MOLECULAR:

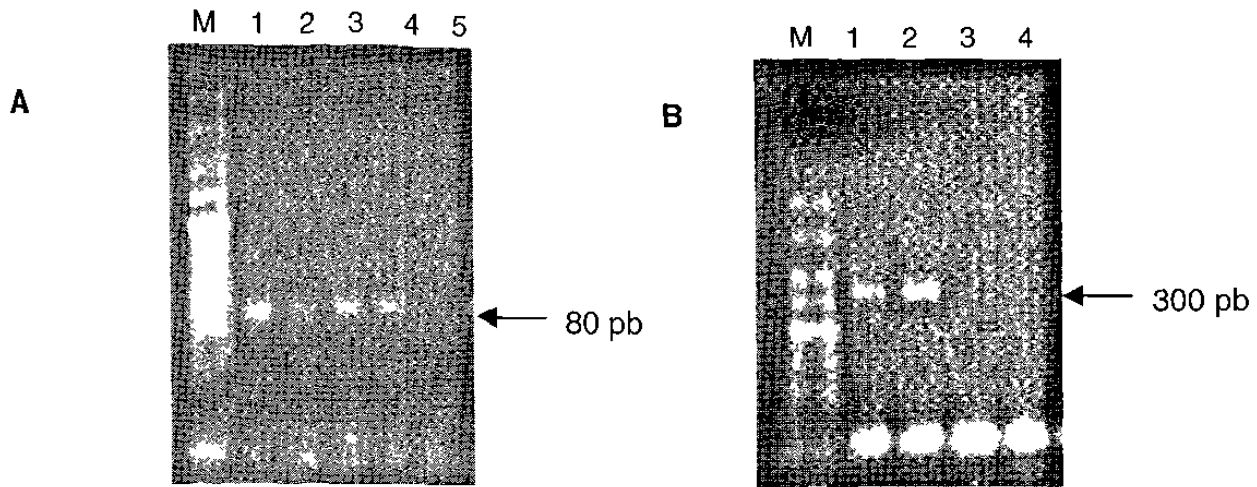


Figura 19. Análisis Molecular de la Familia 6: A) Amplificación de las islas CpG. Carril 1: FRA 23 (II-1), afectado; Carril 2: FRA 24 (II-2), hermana del afectado; Carril 3: FRA 25 (I-2), madre del afectado; Carril 4: Control positivo. Carril 5: Control Negativo. M: Marcador de peso molecular 25 pb. Agarosa 2-5% **B) Repeticiones CGG del gen FMR1.** Carril 1:FRA25 (I-2): Madre del afectado; Carril 2: FRA 24 (II-2), Hermana del afectado; Carril 3: FRA 23 (II-1) afectado; Carril 4: Negativo, sin DNA. M: Marcador de peso molecular 25 pb. Gel agarosa 2.5%

TABLA 4.

No.	CGG	PB	No. CGG	ISLAS CpG 80 PB	INTERPRETACION
FRA 23	-	-	Mas de 200	+	Mutación completa mas de 200 CGG, metilado
FRA 24	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.
FRA 25	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.
FRA 26	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X.

Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 6

FAMILIA 10

DESCRIPCIÓN:

Esta familia tiene múltiples antecedentes de retraso mental. Para este estudio solo fueron incluidos un afectado con retraso mental y dos de sus familiares. Solo se muestra una parte del árbol genealógico. Miembro FRA 36(III-2) afectado, FRA 37 (II-2) mamá de afectado y FRA 38 (III-1) primo de afectado.

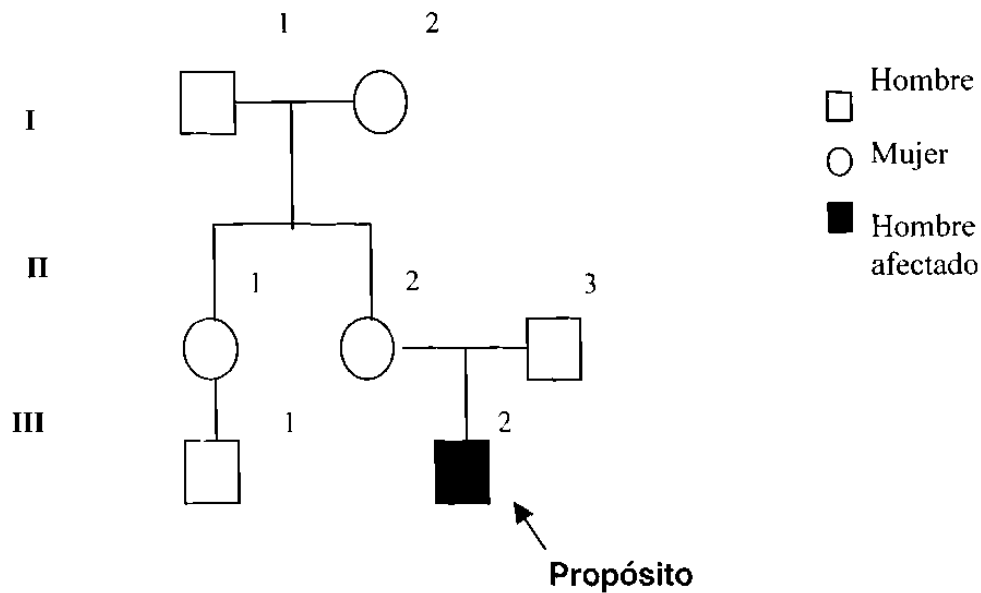


Figura 20. Árbol genealógico de la Familia 10. II-2 mamá del propósito del estudio, identificada como FRA 37; III-2: propósito del estudio, individuo afectado con retraso mental (FRA 36); III-1: primo del afectado (FRA 38). El resto de los individuos del árbol genealógico no fueron incluidos en el estudio.

Por razones de rapidez en el análisis, fueron incluidos también los pacientes FRA 48 y FRA 50, ambos pacientes son varones y fueron referidos al estudio por presentar retraso mental, son individuos no relacionados y no se incluyó a ningún miembro de su familia en el presente estudio.

ANÁLISIS MOLECULAR:

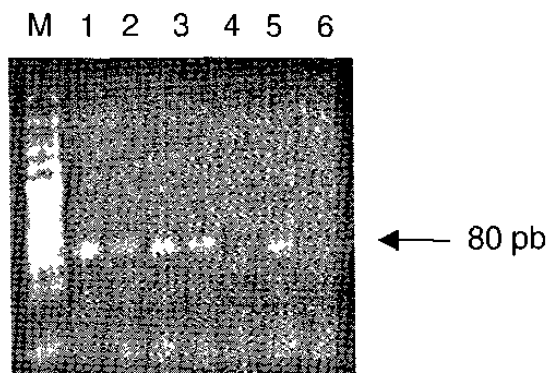


Figura 21. Detección molecular de islas CpG del gen FMRI de la Familia 10 (FRA 36, 37 y 38) y pacientes FRA 48, FRA 50. Carril 1: Paciente FRA 48; Carril 2: Paciente FRA 50; Familia 10: Carril 3, Paciente FRA 36 (III-2); Carril 4; FRA 37 (II-2); Carril 5: FRA 38 (III-1), Carril 6: control positivo, Carril 7: Negativo, sin DNA. M: Marcador de peso molecular 25pb. Agarosa al 2.5%.

TABLA 5.

NO.	CGG	PB	NO. CGG	ISLAS CPG 80 PB	INTERPRETACIÓN
FRA 36	-	-	Mas de 200	+	Mutación completa mas de 200 CGG, metilado
FRA 37	+	300	28	+	Normal. Islas CpG + por Inactivación del X
FRA 38	+	300	28	-	Normal

Interpretación del Análisis Molecular de la Familia 10.

A continuación se presentan los resultados del análisis de los pacientes en los que no fue posible analizar a otros miembros de la familia. Todos los pacientes son varones y fueron incluidos en el estudio por presentar retraso mental. Se muestran solo algunos de ellos.

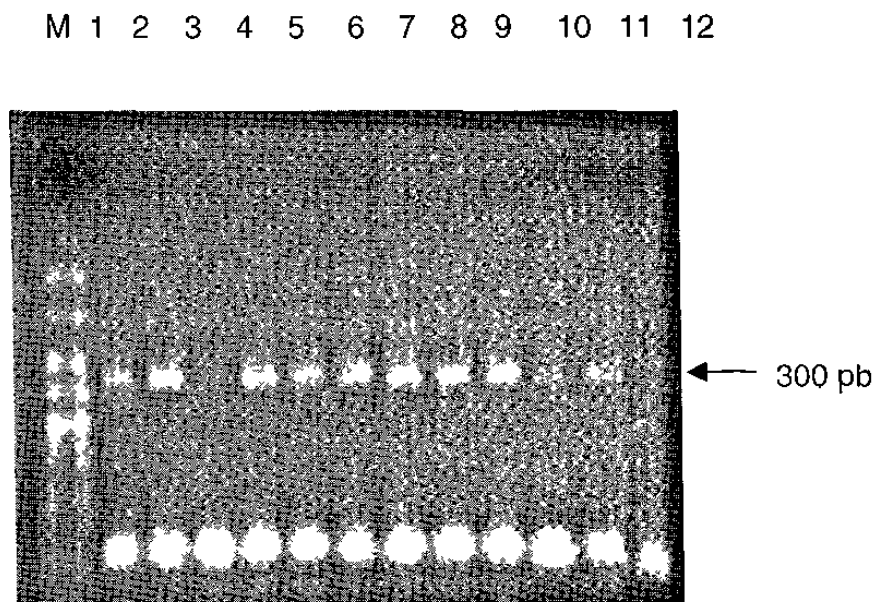


Figura 22. Análisis de las repeticiones CGG del gen FMR1 de los pacientes FRA 39-44, 46, 47, 52 y 53. Todos los pacientes amplificaron un fragmento de aproximadamente 300 pb, correspondiente a 28 repeticiones CGG. Carriles 1: FRA 39, Carril 2: FRA 40, Carril 3: FRA 41, Carril 4: FRA 42; Carril 5: FRA 43; Carril 6: FRA 44; Carril 7: FRA 46; Carril 8: FRA 47; Carril 9: FRA 52; Carril 10: FRA 53; Carril 11: FRA 54; Carril 12: Negativo, sin DNA. M: Marcador de peso molecular 25 pb. Gel agarosa 2.5%

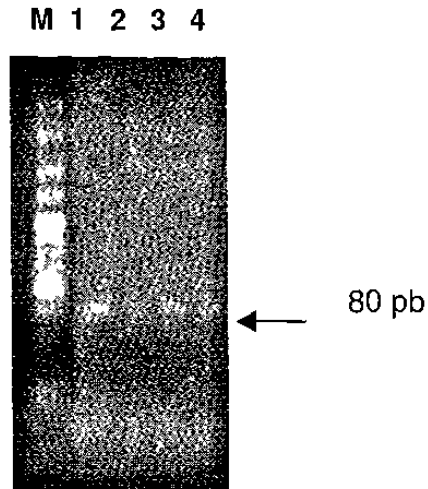


Figura 23. Amplificación de las islas CpG de los pacientes FRA 45, 49 y 51. Carril 1: FRA 45; Carril 2: FRA 49; Carril 3: FRA 51; Se puede observar que los 3 pacientes amplificaron el fragmento de aproximadamente 80 pb, que indica que el gen FMR1 está metilado; Carril 4: Control negativo sin DNA. M: Marcador de peso molecular 25 pb. Gel de agarosa 2.5%.

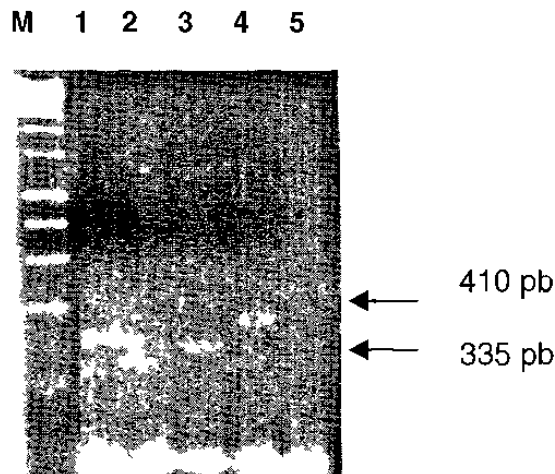


Figura 24. Amplificación de las repeticiones CGG de los pacientes FRA 45, 49 y 51. Carril 1: FRA 45 amplifica un fragmento de aproximadamente 335 pb correspondientes a 40 repeticiones CGG; Carril 2: FRA 51 amplifica un fragmento de aproximadamente 335 pb correspondientes a 40 repeticiones CGG; Carril 3: FRA 49 amplifica un fragmento de aproximadamente 410 pb correspondientes a 65 repeticiones CGG; Carril 4: Control negativo sin DNA. M= Marcador de peso molecular. Gel de agarosa 2.5%.

B

DISCUSIÓN

A partir de 1991, año en que se descubrió que la expansión de la secuencia repetitiva CGG en el gen FMR1 es la causa del síndrome X-Frágil, varios métodos de laboratorio han sido propuestos para determinar el tamaño de dicha secuencia, y por lo tanto para el diagnóstico del síndrome, algunos de ellos sin mucho éxito. Los métodos basados en Southern blot resultan complejos y costosos, en tanto que los basados en la amplificación del segmento repetitivo mediante PCR resultan ineficientes.

Por lo tanto, una propuesta basada en la modificación del DNA mediante tratamiento con bisulfito de sodio, seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores sobre la cadena antisentido, que permite determinar tanto el tamaño de la secuencia repetitiva como el estado de metilación del gen FMR1, resulta sumamente interesante y de fácil realización. En estas circunstancias nos propusimos estandarizar esta metodología en nuestro laboratorio, basándonos en los resultados obtenidos por Reynoso 2001 en Guadalajara, Jal., México con la intención de validar el procedimiento en su utilidad para diagnosticar molecularmente, en forma fácil y eficiente, los pacientes con presunción diagnóstica de síndrome X-Frágil.

En este estudio se analizaron 51 individuos pertenecientes a 25 familias. En el estudio citogenético se encontraron 2 pacientes positivos FRA4 y FRA 14 para la expresión del sitio frágil en el cromosoma X, con 4 y 16% de expresión respectivamente, esto indica que de 29 propósitos con diagnóstico presuntivo de

síndrome de X-frágil solo 2 de ellos (7%) fueron evidenciados mediante la metodología citogenética, aunque cabe aclarar que estos pacientes resultaron negativos en el diagnóstico molecular, es decir amplificaron normalmente un fragmento de aproximadamente 300 pb en las repeticiones CGG lo que corresponde a 28 repeticiones y fueron negativos para el estudio de las islas CpG. Todo lo anterior indica que estos pacientes no corresponden al diagnóstico de síndrome de X-frágil y que la fragilidad cromosómica observada en el estudio citogenético puede ser debida a otro tipo de sitio frágil que mapee muy cercano a FRAXA, como FRAXE, FRAXF o FRAXD, los cuales también cursan con retraso mental, y en los que se requiere otro tipo de diagnóstico molecular. El paciente FRA 14, tiene un hermano gemelo que también fue incluido en el estudio y resultó negativo tanto para el estudio citogenético como para el estudio molecular.

El hecho de que solo 2 de los 29 propósitos analizados hayan sido positivos para el estudio citogenético es porque esta metodología tiene un bajo porcentaje de detección de afectados ya que menos del 30% de los individuos con síndrome de X-frágil expresan el sitio frágil.

En el estudio molecular de los 29 casos índices, en 5 individuos no se logró la amplificación de la secuencia repetitiva CGG. Esto es interpretado como evidencia indirecta de que la secuencia repetitiva es demasiado grande (más de 120 tripletes) para ser amplificada por este procedimiento. Sin embargo, el hecho de que en estos mismos pacientes sí pudo ser amplificada la región de islas CpG, nos demuestra que estas regiones están metiladas, lo que como sabemos ocurre

únicamente si la secuencia repetitiva CGG sobrepasa los 200 tripletes (mutación completa). Los dos resultados, en conjunto, nos aseguran el diagnóstico molecular de X-Frágil en estos pacientes.

En 2 propósitos varones (4%) se encontró que eran mosaicos somáticos, es decir, presentaban 2 alelos diferentes en sus células somáticas del gen FMR1. El primer paciente: FRA 1 perteneciente a la familia 1 amplificó un fragmento de aproximadamente 410 pb que son 65 repeticiones CGG, y corresponde a un alelo premutado, mientras que también amplifica un fragmento de 80 pb en el PCR de las islas CpG, que indica que tiene otro alelo metilado con mutación completa, siendo este resultado confirmatorio de síndrome de X-frágil. El hermano de este paciente FRA 2 quien presentaba síntomas de la enfermedad también fue estudiado y resultó negativo para la amplificación de las repeticiones CGG y positivo para las islas CpG lo que también confirma el diagnóstico de síndrome de X-frágil. La madre de estos pacientes FRA3 amplificó un fragmento aproximado de 300 pb, que corresponde a 28 repeticiones CGG, que está dentro del rango normal y fue positiva para las islas CpG por el X inactivo normal, lo que podría indicarnos que ella es normal o bien podría ser un mosaico somático y portar una mutación completa que no pudo ser detectada por ser de más de 120 repeticiones CGG y que el resultado de las islas CpG sea enmascarado por la metilación del X, normal, todo esto en base de que tiene mas probabilidades de ser portadora por el hecho de tener 2 hijos afectados.

El segundo paciente con mosaico somático fue FRA 49, quien amplificó un fragmento de aproximadamente 500 pb lo que corresponde a 120 repeticiones CGG, y también fue positivo para el PCR de las islas CpG con un fragmento de 80 pb, lo que indica que posee otro alelo metilado de más de 200 repeticiones y que no puede ser detectado por esta metodología, con lo que se confirma el diagnóstico clínico de síndrome de X-frágil.

En la familia 6, el propósito FRA 23, resultó negativo para las repeticiones CGG, lo que indica que tiene un alelo de más de 200 repeticiones CGG, considerado como mutación completa, y positivo para las islas CpG, con lo que se confirma su diagnóstico de síndrome de X-frágil, mientras que su hermana FRA 24, su mamá FRA 25 y su prima FRA 26 amplificaron un fragmento de 300 pb =28 repeticiones CGG y el fragmento de 80 pb en las islas CpG, debido a su cromosoma X inactivo, pero fueron consideradas negativas para el estudio molecular.

La familia 10 resultó tener un miembro afectado por el síndrome de X-frágil con mutación completa en el gen FMR1 fue FRA 36 cuyo diagnóstico fue confirmado por biología molecular ya que no amplificó el fragmento correspondiente a las repeticiones CGG y fue positivo para las islas CpG lo que indica el estado de metilación del gen FMR1. Mientras que su madre y su primo fueron negativos para el diagnóstico molecular.

Los pacientes FRA 48 y FRA 50 fueron encontrados positivos para el diagnóstico de síndrome de X-frágil ya que no amplificaron las repeticiones CGG y si amplificaron el fragmento correspondiente a las islas CpG, lo que indica la metilación del gen y la presencia de más de 200 repeticiones CGG, considerado como mutación completa, en el gen FMR1.

Por otra parte en los pacientes FRA 45 y FRA 51 son dos varones en los que se encontraron alelos de 40 repeticiones CGG con un amplificado de aproximadamente 335 pb en el PCR de las repeticiones CGG, mientras que fueron negativos para el análisis de metilación del gen, lo que indica que son portadores de alelos intermedios para el gen FMR1, recordemos que los alelos intermedios no son considerados como premutaciones por lo que no pueden considerarse como varones portadores de la enfermedad, pero que si tienen un riesgo particular para que su alelo se amplifique y tener hijas portadoras o hijas afectadas. Aunque la literatura reporta que el alelo generalmente aumenta de tamaño si es transmitido por la mamá no por el papá, y en cambio si es transmitido por meiosis paterna puede disminuir de tamaño, procreando hijas normales. No existe ninguna posibilidad de que estos pacientes tengan varones afectados porque el cromosoma que se hereda a los hijos varones es el Y.

En todas las 14 mujeres analizadas se logró la amplificación de las islas CpG adyacentes a la secuencia repetitiva CGG en el gen FMR1. Esta amplificación se logra, según la estrategia implementada, sólo en los casos en los que esta región se encuentra metilada. Esto ocurre en el cromosoma X inactivo de

D

las mujeres y en el cromosoma X de los varones cuando el gen FMR1 se metila por la presencia de una secuencia repetida igual o mayor de 200 triplete CGG. Aunque por el procedimiento utilizado, solo podemos suponer que la secuencia amplificada en las mujeres estudiadas, corresponde al cromosoma X inactivo normal, el hecho de que en todas ellas se logró la amplificación de las secuencias repetidas CGG, apoya fuertemente esta presunción.

En el presente estudio se encontraron 42 individuos hombres y mujeres con alelos en un rango de 28-40 repeticiones CGG, dentro del rango normal. Estos resultados son similares al estudio realizado por Reynoso en 2001, en pacientes de Guadalajara, Jal., México, quién encontró alelos normales en un rango de 5-31 repeticiones.

CONCLUSIONES

1. La metodología basada en la modificación del DNA por bisulfito de sodio empleada en este estudio, el cual sustituye las citosinas no metiladas por uracilo, permite amplificar mediante PCR y el uso de oligonucleótidos específicos las secuencias ricas en C y G presentes en el gen FMR1 y además de que sean visualizadas directamente en un gel teñido con bromuro de etidio.
2. El uso de una doble estrategia diagnóstica analizando el número de repeticiones del trinucleótido CGG y el estado de metilación del gen FMR1, permite detectar y comprobar la presencia de mutaciones completas y detectar mosaicos somáticos en algunos pacientes.
3. Es una metodología fácil de utilizar y relativamente de bajo costo comparada con otras descritas en la literatura.
4. Lleva poco tiempo realizarla y en una semana se pueden tener resultados.
5. Es más efectiva que el diagnóstico citogenético porque se puede determinar el número de repeticiones CGG presentes en el gen FMR1 y además evaluar el estado de metilación del mismo.

6. La imposibilidad para amplificar secuencias de más de 120 tripletes CGG resulta en una seria limitante de este procedimiento para la detección de secuencias en estado permutado.

7. Puede ser implementada para el diagnóstico de otro tipo de patologías con repeticiones de trinucleótidos como la corea de Huntington o la Distrofia Miotónica o bien para estudiar estados de metilación en otros genes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guízar-Vázquez (1994) *Genética Clínica*. Segunda edición. Editorial El Manual Moderno.
2. Vennema, H.; Beverstock, C.; De Koning, Th.; Pearson, P.L.; Van De Kamp, J.J.P. (1988) The fragile X-chromosome; an evaluation of the results in routine cytogenetic laboratory in the period 1981-1986. *Clin Genet*, 33:410-417.
3. Jenkins, E.C.; Brown, W.T.; Brooks, J.; Duncan, C.J.; Sanz, M.M.; Silverman, W.P.; Lele, K.P.; Masia, A.; Katz, E.; Lubin, R.A.; Nolin, S.L. (1986) Low frequencies of apparently fragile X chromosomes in normal control cultures: a possible explanation. *Expl Cell Biol*, 54:40-48.
4. Terraciano, A.; Pompon, M.G.; Marino, G.M.; Chiurazzi, P.; Rinaldi, M.; Dobosz, M.; Neri, G. (2004) Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet*, Jan 21 (Epub a head of print).
5. Devys, D.; Lutz, Y.; Rouyer, N.; Belloq, J-P.; Mandel, J-L. (1993) The FMR1 protein is cytoplasmic most abundant in neurons and appears normal en carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*, 4:335-340.
6. Siomi, H.; Siomi, M.C.; Nussbaum, R. , Dreyfuss, G. (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*, 74:291-298.
7. Jin, P; Warren, S.T. (2000) Understanding the molecular basis of fragil X syndrome. *Hum Mol Genet*, 9: 901-908.

8. Hinds, H.L.; Ashley, C.T.; Sutcliffe, J.S.; Nelson, D.L.; Warren, S.T.; Housman, D.E.; Schalling, M. (1993) Tissue specific expression of FMR1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet*, 3:36-43.
9. Martin, J.P.; Bell J. (1943) A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 6:154.
10. Giraud, F; Ayme, S.; Mattie, J.F. (1976) Constitutional chromosomal breakage. *Hum Genet*, 34:125-136.
11. Staley, L.W.; Hull, C.E.; Mazzocco, M.M.; Thibodeau, S.N.; Snow, K.; Wilson, V.L.; Taylor, A.; McGavran, L.; Weiner, D.; Riddle, J.; O'Connor, R.; Hagerman, R.J. (1993) Molecular-Clinical correlations in children and adults with fragile syndrome *Am J Dysm Clin*, 147:723-726.
12. Pérez-Cabrera, A. (1992) Sitios frágiles: Aspectos citogenéticos y moleculares y su correlación con el síndrome de X-frágil. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Sutherland, G.R. (1985) Heritable fragile sites on human chromosomes. *Ann Hum Genet*, 49: 153-161.
14. Sutherland, G.R. (1979) Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* , 31:125-135.
15. Petit, P.; Fryns, P.; van der Berghe, H.; Hecht, F. (1986) Population cytogenetics of autosomal fragile sites. *Clin Genet*, 29:96-100.
16. Mittelman, G. (1995). An International System of Chromosome Nomenclature Editorial Karger.

17. McKusick, V.A. (1992) Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. Tomo 2. 10 edición. *The Johns Hopkins University Press*.
18. Verkerk, A.J.M.H.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J.S.; Fu; Y.H.; Kuhl, D.P.A. (1991) Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65:905-914.
19. 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.; Warren, S.T.; Oostra, B.A.; Nelson, D.L.; Caskey, T. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67:1047-1058.
20. Eichler, E.E.; Kunst, C.B.; Lungenbeel, K.A.; Ryder, O.A.; Davison, D.; Warren, S.T.; Nelson, D.L. (1995) Evolution of the cryptic FMR1 CGG repeat. *Nat Genet*, 11:301-308.
21. Price, D.K.; Ahang, F.; Ashley, C.T.; Warren, S.T. (1996) The chicken FMR1 gene is highly conserved with a CTT 5'-untranslated repeat and encodes a RNA-binding protein. *Genomics*, 31:3-12.
22. Jara, L.; avendano, I.; Aspillaga, M.; Blanco, R. (1996) Molecular and genetic features of fragile X syndrome. *Rev Med Chil*, 124:865-72.
23. Nolin, S.L.; Brown, W.T.; Glicksman, A.; Houck, G.E. Jr; Gargano, A.D.; Sullivan, A.; Biancalana, V.; Brondum-Nielsen, K.; Hjalgrim, H.; Holinski-Feder, E.; Kooy, F.; Longshore, J.; Macpherson, J.; Mandel, J.L.; Matthijs, G.; Rosseau, F.; Dteinbanch, P.; Vaisanen, M.L.; von Koskull, H.; Sherman, S.L. (2003) Expansion

of the fragile X cgg repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet*, 72:454-64.

24. Jin, P; Warren, S.T. (2000) Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, 9:901-908.

25. Terraciano, A.; Pompon, M.G.; Marino, G.M.; Chiurazzi, P.; Rinaldi, M.; Dobosz, M.; Neri, G. (2004) Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet*, 21:108-110.

26. Aziz, M.; Stathopulu, E.; Callias, M.; Taylor, C.; Turk, J.; Oostra, B.; Willemsen, R.; Patton, M. (2003) Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. *Am J Med Genet*, 21:119-21.

27. Dombrowski, C.; Levesque, S.; Morel, M.L.; Roulland, P.; Morgan, K.; Rosseau, F. (2002) Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10,572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet*, 11:371-378.

28. Wohrle, G. (1992) Expression of the FMR1 gene. *Cytogenet Genome Res*, 100 (1-4):124-8

29. Geadon, T. (1992) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, 5:1083-1091.

30. Tarleton, R. (1993) Biological implications of the DNA structures associated with disease causing triplet repeats. *Am J Hum Genet*, 64:346-353.

31. Devys, S. (1992). Methylation analysis on individual Chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22:695-696.

32. Berry, E.; Lewin, F.; Wu, J.; Leehey, M.; Hagerman, R.; Hagerman, P.; Goetz, C.G. (2003) Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. *Ann Neurol*, 53:616-23.
33. Oostra, B.A.; Willemsen, R. (2003) A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet*, 15:249-57.
34. Leavitt, B. (2003) Something lost in the translation: "premutations" in the FMR1 gene cause Fragile X tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Clin Genet*, 64:106-108.
35. Kogan, C.S.; Boutet, I.; Cornish, K.; Zangenehpour, S.; Mullen, K.T.; Holdenn, J.; Der Kaloustian, V.M.; Andermann, E.; Chaudhuri, A.. (2004) Differential impact of the FMR1 gene on visual processing in fragile X syndrome. *Brain*, 21:259-264.
36. Tamanini, F.; Meijer, N.; Verheij, C.; Willems, P.J.; Galjaard, H.; Oostra, B.A., Hoogeveen, A.T. (1996) FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genetics*, 5:809-813.
37. Nakahori, Y.; Knight, S.J.L.; Holland, J.; Swartz, C.; Roche, A.; Tarleton, J.; Wong, S.; Flint, T.J.; Froster-Iskenius, U.; Bentley, D.; Davies, K.E., Hirst, M.C. (1991) Molecular heterogeneity of the fragile X syndrome. *Nuc Ac Res*, 19:4355-4359.
38. Reyniers, E.; Wolff, G.; Tariverdian, G.; De Boule, K.; Strom, K.; Kooy, R.F., Willems, P.J. (1996) Severe mental retardation and macroorchidism without in the FMR1 gene. *Am J Med Genet*, 64:408-412.
39. Eberhart, D.E.; Malter, H.E.; Feng, Y.; Warren, S.T. (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, 5:1083-1091.

40. Feng, Y.; Gutekunst, C-A.; Eberhart, D.E.; Yi, H.; Warren, S.T., Hersch, S. M. (1997) Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J of Neurosc*, 17:1539-1547.
41. Nelson, D.L. (1993) Fragile X syndrome: Review and current status. *Growth*, 9:1-4.
42. Sherman, S, Jacobs, P, Morton, N. (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.*, 69:289-299.
43. Reidy J.A. (1988) Role of deoxyuridine incorporation and repair in the expression of human chromosomal fragile sites. *Mutat Res*, 200:215-220.
44. Sutherland, G.R.; Baker, E. (1992) Characterisation of a new rare site easily confused with the fragile X. *Hum Mol Genet*, 1:111-113.
45. Hamel, B.C.J.; Smits, A.P.T.; de Graaf, E.; Smeets, D.F.C.M.; Schoute, F.; Eussen, B.H.J.; Knight, S.J.L.; Davies, K.E.; Assman-Hulsmans, C.F.C.H.; Oostra, B.A. (1994) Segregation of FRAAXE in a large family: clinical, psychometric, cytogenetic and molecular data. *Am J Hum Genet*, 55:923-931.
46. Allingham-Hawkins, D.J.; Ray, P.N. (1995) FRAAXE expansion is not common etiological factor among developmentally delayed males. *Am J Hum Genet*, 56:72-76.
47. Mulley, J.C.; Yu, S.; Loesch, D.Z.; Donnelly, A.; Gedeon, A.K.; Carbonell, P.; Glover, G.; López, I.; Gabarrón, I.; Yu, P.W.L.; Baker, E.; Haan, E.A.; Hockey, A.; Knight, S.J.L.; Davies, K.E.; Richards, R.I.; Sutherland, G.R. (1995) FRAAXE and mental retardation. *J Med Genet*, 32:162-169.

48. Sutherland, G.R.; Richards, R.I. (1995) The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Curr Op Genet Develop*, 5:323-327.
49. Jenkis, E.C.; Genovese, M.J.; Duncan, C.J.; Gu; H.; Stark-Houck, S.L.; Lele, K.; Li; S-Y.; Krawczun, M.S. (1992) Fra(X)(q27.2), the common fragile site, observed in only one 760 cases studied for the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 43:136-141.
50. Hirst, M.C.; Barnicoat, A.; Flynn, G.; Wang, Q.; Daker, M.; Buckle, V.J.; Davies, K.E.; Bobrow, M. (1993) The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum Mol Genet*, 2:197-200.
51. Brown W Ted, MD, PhD; E. George. (1993) Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA*, 270:1569-1575.
52. Sinden Richard R. (1999) Biological implications of the DNA structures associated with disease causing triplet repeats. *Am J Hum Genet*, 64:346-353.
53. Landre P. A, Gelfand D.H; Watson R.M. (1995) The use of cosolvents to enhance amplification by the polymerasa chain reaction. PCR strategies *Acedemic Prees, Inc.* pp.3-16.
54. Abramsom Richard D. (1995) Thermostable DNA polymerasa. PCR strategies *Academic Press, Inc*, pp.39-57.
55. Levinson Gene, Anne Maddalena, Palmer Frances T. (1994) Improved Sizing of Fragile X CGG repeats by nester polymerase Chain reaction. *Am J Med Genet*, 51:527-534.

56. Panagopoulos Ioannis, Lassen Carin, Kristoffersson Ulf, Aman Pierre (1999). Methylation PCR approach for detection of fragile X syndrome. *Hum Mutation*, 14:71-79.
57. Seela Frank; Rölling Angelica. (1991) 7-Deazapurine containing DNA: efficiency of C7 GdTP, C7 AdTP and C7 IdTP incorporation during PCR amplification and protection from endodeoxyribonuclease hydrolysis. *Nucleic Acids Research*, 20:55-61.
58. Condorelli DF, Dell Milana G. (1996) Routine clinical application of the FRAXA Pfu PCR assay: limits and utility. *Clin Genet*, 50:366-371.
59. Chong Samuel S, Eichler Evan E. (1994) Robust Amplification and Ethidium visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am J Med Genet.*, 51:522-526.
60. Wang Qin, Green Elizabeth, Bobrow Martin. (1995) A rapid, non-radioactive Screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J Med Genet*, 32:170-173.
61. Shapiro Robert, Braverman Barbara. (1973) Nucleic Acid reactivity and conformation. *J Biol Chem*, 248:4060-4064.
62. Martienssen Robert A. ; Richards Erick J. (1995) DNA methylation in eukariotes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 5:234-242.
63. Brandeis Michael, Ariei Mira ; Cedar Howard. (1993) Dynamics of DNA methylation durind development. *Bioessays*, 15:709-713.
64. Razin Aharon; Riggs Arthur D. (1980) DNA methylation and gene function. *Science*, 210:604-610.

65. Clark Susan J, Harrison Janet. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*, 22:2290-2297.
66. Olek Alexander, Joachim Oswald, Jörn Walter. (1996) A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 24:5064-50.
67. Grunau Christoph, Schattevoy Ruben, Mache Niels. (2000) MethTools – a Toolbox to visualize and analyse DNA methylation data. *Nucleic Acids Research*, 28:1053-1058.
68. Frommer Marianne, Mc Donald Louise E, Millar Douglas S. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1827-1831.
69. Fiel Robert, Charlton Jillian, Bird Adrian P. (1994) Methylation analysis on individual Chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22:695-696.
70. Rosales-Reynoso, M.A. (1999) Detección, mediante RCP en ADN modificado de las secuencias repetidas CGG y del estado de metilación de las islas CpG en el gen FMR1. Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. Universidad de Guadalajara; Guadalajara, Jalisco, México.
71. P Latimer Laura J, S Lee Jeremy. (1991) Ethidium bromide does not fluoresce when intercalated adjacent to 7-Deazaguanine in duplex DNA. *J Biol Chem*, 266:13849-13851.

APÉNDICE I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A) ESTUDIO CITOGENÉTICO

Solución hipotónica: Pesar 5.534 gr de KCl y disolver en agua destilada. Aforar a 1 litro. Se mantiene a temperatura ambiente. Estable por 1 año a partir de su fecha de preparación.

Fijador de Carnoy: Mezclar 3 partes de metanol con 1 de ácido acético glacial. Mantener a 4°C. Estable por 6 meses a partir de su fecha de preparación.

Solución stock de Giemsa: Pesar 1 gr de Giemsa y disolverlo en plataforma agitadora en 66 ml de metanol, agregar poco a poco 66 ml de glicerol. Se puede calentar un poco para que la mezcla se homogenice en menor tiempo. Filtrar. Se conserva a temperatura ambiente. Estable por 6 meses a partir de su fecha de preparación.

Solución de trabajo de Giemsa: Disolver 3 ml de solución stock de Giemsa en 47 ml de buffer de fosfatos pH 6.8. Se prepara al momento en que se va a utilizar.

Solución de tripsina: Pesar 0.0625 gr de tripsina y disolver en 50 ml de buffer de fosfatos pH 7.2. Se prepara al momento en que se va a utilizar.

Buffer de fosfatos pH 7.2: Pesar 9 gr de NaCl y disolver en agua destilada, agregar 1 pastilla para buffer pH 7.2 GURR y disolver. Aforar a 1 litro. Se mantiene a temperatura ambiente. Estable por 1 año a partir de su fecha de preparación.

buffer de fosfatos pH 6.8: Disolver 1 pastilla para buffer pH 6.8 GURR en agua destilada. Aforar a 1 litro. Se mantiene a temperatura ambiente. Estable por 1 año a partir de su fecha de preparación.

Solución stock de colchicina: Pesar 4 gr de colchicina y disolver en campana de flujo laminar en 10 ml de solución salina estéril. Se mantiene a 4°C y es estable por 1 año a partir de su fecha de preparación.

Solución de trabajo de colchicina: Mezclar en frasco estéril y en campana de flujo laminar, 1 ml de solución stock de colchicina más 9 ml de solución salina estéril. Se conserva a 4°C y es estable por 1 mes a partir de su preparación.

B) ESTUDIO MOLECULAR

Buffer de lisis: Mezclar 1 ml de Triton 100X, 5 ml de SDS 10%, 5 ml de NaCl 1M y 0.5 ml de Tris-HCl pH 8.0 1M, aforar a 50 ml. Se mantiene a temperatura ambiente.

Sevage: Mezclar 24 partes de cloroformo por 1 de alcohol isoamílico. Se mantiene a temperatura ambiente.

TE1X: Se prepara a partir de TE 100X: Mezclar 25 ml de Tris-HCl 2M pH 7.5, 10 ml de EDTA 500 mM y 15 ml de agua ultrapura. Esterilizar en autoclave. Se mantiene a temperatura ambiente.

NaOH 1M: Pesar 2 gr de NaOH y disolver en 50 ml de agua estéril grado HPLC. Se mantiene a temperatura ambiente.

Solución de bisulfito de sodio e hidroquinona: Pesar 4 gr de bisulfito de sodio y disolver en 8 ml de agua estéril grado HPLC. Ajustar a pH 5.0 exactamente e

incorporar 0.0068 gr de hidroquinona. Mezclar perfectamente y aforar a 10 ml. Esta solución debe ser utilizada y desechar el sobrante.

Acetato de amonio 5M: Pesar 3.854 gr de acetato de amonio y disolver en 10 ml de agua estéril grado HPLC. Se mantiene a temperatura ambiente.

