



Universidad  
Zaragoza



# Evaluación de la implicación de los alelos premutado (55-200 CGGs) y gris (45-54 CGGs) del gen *FMR1* en el autismo

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Juan Lerma Irureta

Curso 2022/23

Tutor: Dra Silvia Izquierdo Álvarez

Servicio de Bioquímica Sección de Genética Clínica

Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)

## ABSTRACT

The gene *FMR1* codes for the protein FMRP, which regulates protein synthesis in neurons and therefore it is implicated in the development and maturation of these cells. In the UTR5' region it contains a repetition of the triplet Cytosine-Guanine-Guanine (CGG), whose length determines for different alleles: normal (<45 CGGs), grey or intermediate (45-54 CGGs), premutation (55-200 CGGs) and full mutation (>200 CGGs). The last causes the gene silencing by methylation of the cytosines in this repetition. In the grey allele and premutation carriers, instead, it has been observed and excessive transcription of the gene but a smaller quantity of the protein in neurons. The lack of the FMRP causes the loss of neuronal function and plasticity, which are the origin of a series of neuropsychiatric phenotypes, one of which possibly being the autism spectrum disorders (ASD).

Therefore, it is interesting the evaluation of the implication of both alleles in this pathology. For this, we will work with a pseudoanonymized database created in the Clinical Genetics Laboratory of the HUMS between 2014 and 2022 (9 years) which includes the length of the repetition in patients whose *FMR1* gene has been studied by TP-PCR and capillary electrophoresis.

The results suggest that the grey allele is indeed implicated in the ASD, whose prevalence in the carriers is 50.8%. The pathophysiology mechanism is still unknown, but it is probably due to the deregulation of multiple neuronal systems at the same time. This demonstrates the importance of the FMRP function.

## RESUMEN

El gen *FMR1* codifica para la proteína FMRP, que regula la traducción proteica en las neuronas, por lo que está implicada en el desarrollo y la maduración neuronales. En su región UTR5' contiene una repetición del triplete Citosina-Guanina-Citosina (CGG) cuya longitud permite definir cuatro alelos: normal (<45 CGGs), gris o intermedio (45-54 CGGs), premutación (55-200 CGGs) y mutación completa (>200 CGGs). Esta última provoca el silenciamiento génico por metilación de las citosinas de la expansión. En cambio, en los portadores del alelo gris y/o premutado se ha observado un aumento de la transcripción de este gen pero una disminución en la cantidad de proteína. Esta falta de FMRP provoca una pérdida de función y plasticidad neuronales, lo que genera una serie de fenotipos neuropsiquiátricos, entre los que se podrían encontrar los Trastornos del Espectro Autista (TEA).

Por tanto, es interesante evaluar la posible implicación de ambos alelos en este contexto clínico. Para ello, se trabajará en una base de datos pseudoanonimizada creada en la Sección de Genética Clínica del HUMS en el periodo del 2014 al 2022 (9 años) en la que se han recogido la longitud de las expansiones determinada por TP-PCR y electroforesis capilar de los pacientes a los que se les ha solicitado el estudio genético del gen *FMR1*.

Los resultados obtenidos parecen apoyar la implicación sobre todo del alelo gris en la clínica de los TEA, con una frecuencia de 50,8% de esta en los portadores de los estos alelos. Todavía se desconoce el mecanismo fisiopatológico, pero probablemente se deba a una desregulación de varios sistemas neuronales a la vez. Esto demuestra la importancia de la función de la FMRP.

## **ABREVIATURAS**

- ChIP: Chromatin Immunoprecipitation
- CNV: Copy Number Variant
- DGK: diacilglicerol quinasa
- FMR1: Fragile X Mental Retardation 1
- FMRP: Fragile X Mental Retardation Protein
- FXG: Fragile X Granules
- FXR: Fragile X Related
- FXS: Fragile X Syndrome
- LTP: Long Term Potentiation
- LTD: Long Term Depression
- mGluR: metabotropic Glutamate Receptor
- RAN: Repeat AUG Non-associated
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism
- SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier
- TEA: Trastornos del Espectro Autista
- TP-PCR: Triplet Primed repeat Polymerase Chain Reaction
- UTR: Untranscribed Region

## ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	
1.1 Gen FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1)	6
1.2 Fenotipos patológicos asociados al FMR1	7
1.3 Proteína FMRP	8
1.4 FMRP y plasticidad neuronal	11
1.5 FMRP y disfunción neuronal presináptica	12
1.6 FMRP y disfunción neuronal postsináptica	13
1.7 Regulación del sistema GABAérgico por la FMRP	14
1.8 Alteraciones metabólicas de premutados	14
1.9 Trastorno del Espectro Autista (TEA)	15
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	17
4. Material y métodos	17
4.1 Fundamento de la TP-PCR	18
4.2 Electroforesis capilar con FOP-7	18
4.3 Análisis del electroferograma	19
5. Resultados	20
6. Discusión	22
7. Limitaciones del estudio	23
8. Conclusión	23
9. Referencias bibliográficas	23
10. Anexos	26

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Aspectos del metabolismo del RNA regulados por la FMRP.....	9
Figura 2: Regulación del efecto de la FMRP sobre la traducción por la señalización de mGluR5 y modificaciones postraduccionales.....	11
Figura 3: Implicación de la proteína FMRP en la plasticidad neuronal postsináptica y efecto de su ausencia.....	12
Figura 4: Electroferograma que se visualiza con el reactivo AmpliDeX® FMR1 Controls cuando se analiza con el AmpliDeX® PCR/CE FMR1 Kit y con el que se realiza la curva de calibración.....	19
Figura 5: Electroferograma de un varón normal con un alelo de 27±1 repeticiones CGG y 2 interrupciones AGG.....	19
Figura 6: Electroferograma de una mujer premutada, con dos alelos de 29±1 y 70±3 repeticiones CGG y 2 interrupciones AGG.....	20
Figura 7: Electroferograma de una mujer con la mutación completa del gen <i>FMR1</i> , con un alelo sano de 31±1 CGGs y el expandido de 322±10, y 2 interrupciones AGG.....	20
Tabla 1: Resultados de los estudios genéticos completos de los cinco pacientes con el alelo gris a los que se les ha encontrado otra mutación o variante.....	20
Tabla 2: Frecuencias obtenidas para cada uno de los rasgos del TEA en los alelos analizados.....	21

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. 1. Gen FMR1

El gen *FMR1* (locus Xq27.3) codifica para la proteína FMRP, que regula el transporte y la traducción de los mRNA de las proteínas que afectan la plasticidad y maduración neuronales. Tiene en su región UTR5' una repetición del triplete Citosina Guanina Guanina (CGG), cuya longitud es altamente polimórfica y permite definir cuatro formas alélicas: normal (<45CGG), intermedio o gris (45-54 CGG), premutado (55-200 CGG) y de mutación completa (>200 CGG) (1).

En general, el alelo más común es de 29 y 30 CGG, independientemente de la raza y sexo del individuo. Por otra parte, el alelo gris tiene una prevalencia de 1:66 en mujeres y 1:112 en hombres y el alelo intermedio de 1:209 en mujeres y 1:430 en hombres. En estos casos, sí que se han observado diferencias entre razas étnicas: la prevalencia del alelo gris en mujeres se mantiene, mientras que en hombres blancos es un poco más baja que en otras razas; en el caso del alelo premutado es más alta en mujeres de raza negra y menor en hombres de la misma raza (2).

Este gen forma parte de la familia de genes FX, que está compuesta además por dos genes autosómicos llamados *FXR1* y *FXR2* (Fragile X Related 1 and 2). Estos son homólogos al gen *FMR1* en un 86% y un 60%, respectivamente (3).

En la célula, el triplete CGG puede formar estructuras secundarias diferentes de la doble hélice de Watson-Crick (Figura 2). Estas podrían retrasar la progresión de la horquilla de replicación durante la fase S del ciclo celular, lo que podría facilitar la expansión del triplete. La más común es una horquilla, que se forma cuando una hebra tiene una secuencia palindrómica en la que se pueden formar apareamientos intracatenarios. También se pueden formar estructuras en cuádruplex por formación de interacciones de hidrógeno de tipo Hogsteen entre cuartetos de guanina de la hebra codificante. Por último, durante la transcripción, la cadena de RNA naciente puede hibridar con la hebra codificante y liberar la no codificante, formando un R-loop. La hebra liberada puede, a su vez, formar estructuras secundarias (4).

La expansión del triplete puede ser debida a elementos en trans (errores en la replicación o reparación del DNA) y a elementos cis, siendo los más importantes la longitud de la repetición y el número de interrupciones AGG. Estas se suelen encontrar en el extremo 5' de la repetición y su función es desestabilizar las configuraciones del DNA diferentes a la hélice de tipo B, con lo que se reduce la probabilidad de expansión durante la meiosis y formación de gametos (4).

Existe un umbral de inestabilidad de 34-38 repeticiones CGG sin interrupciones a partir del cual es mucho más común la formación de otras estructuras del DNA. Aproximadamente el 95% de los individuos normales tienen dos interrupciones Adenina Guanina Guanina (AGG) y en general aquellos individuos con alelos más largos suelen tener menos o ninguno de estos tripletes (5). La pérdida de las interrupciones se podría deber a una transversión en el DNA, de manera que el AGG pasa a ser CGG (este tipo de mutaciones es común en el genoma humano) (6). La expansión más significativa que se ha observado es la de un alelo premutado de 59 CGG sin AGG a uno de mutación completa(7).

En general, el alelo gris se suele transmitir de forma estable en un 73% de los casos (Nolin et al. (2003)). Los que lo hacen de forma inestable, suele ser por tener una longitud cercana a la del alelo premutado y el grado de inestabilidad suele ser mayor en el caso de transmisión paterna (7).

El alelo premutado siempre sufre expansión cuando se transmite por una mujer y el riesgo de llegar a una mutación completa depende de la longitud de la repetición, siendo de casi el 100% cuando se tienen más de 100CGG. Las diferencias en el sexo biológico de la descendencia no son estadísticamente significativas, por lo que se ha concluido que la expansión a mutación completa es independiente del este. Al contrario, cuando se transmite por un hombre, la longitud de la repetición se suele mantener (7).

De la misma manera, se han observado casos en los que la longitud de la repetición disminuía desde un alelo premutado a uno gris o normal (o de uno gris a uno normal o uno gris más pequeño) cuando se transmitía por una mujer. La estabilidad de este nuevo alelo se desconoce (7).

Cuando el número de tripletes CGG se encuentra en el rango de mutación completa, el gen *FMR1* sufre un silenciamiento transcripcional por la hipermetilación en citosinas desde la región flanqueante en 5' de la UTR5' hasta el primer intrón y la metilación de la histona H3 en las lisinas K9 y K27. Este patrón epigenético aparece en el primer trimestre del embarazo: hay una primera metilación durante la implantación del embrión que se realiza de forma estocástica (por lo que no todas las células la sufren) y una segunda metilación tras la diferenciación celular. El resultado es la pérdida completa de la función proteica. Los tejidos extraembrionarios (como las vellosidades coriónicas) pueden no tener el mismo patrón de metilación que el resto del embrión al haberse separado de este y se ha observado cierto grado de mosaicismo debido a la proliferación clonal, por lo que para confirmar el grado de metilación fetal es necesario realizar una amniocentesis (8).

A nivel transcriptómico, se ha observado que los niveles del mRNA aumentan en los alelos gris y premutado, sobretodo en el caso de estos últimos. Esto podría indicar que el elemento CGG es un activador transcripcional en cis y parte del fenotipo patológico en ambos casos se podría asociar a una ganancia de función de estos mRNA. Se ha hipotetizado que podrían secuestrar proteínas de unión a RNA importantes para la función neuronal y por lo tanto alterar todos los procesos de expresión y regulación génica (9).

Estos mRNA con una región CGG expandida pueden ser traducidos sin necesidad del codón iniciador AUG (mecanismo RAN, Repeat AUG Non-associated) y dar lugar a proteínas con el extremo N terminal rico en residuos de glicina. Estas proteínas mutadas son responsables de la formación de inclusiones proteicas intranucleares y de la deformación de la membrana nuclear, ya que dificultan la interacción de la proteína LAP2 $\beta$  de la membrana nuclear interna con la laminina B1 al secuestrar esta última en las inclusiones (10).

## 1. 2. Fenotipos patológicos asociados al *FMR1*

La longitud de la expansión de la CGG está asociada con tres fenotipos patológicos: síndrome de X frágil (FXS), insuficiencia ovárica primaria asociada a X frágil (XPOI) y temblores y ataxia asociados a X frágil (FXTAS). Los dos últimos suelen ser de aparición tardía. La gravedad del fenotipo depende de la cantidad de FMRP que se produzca, por lo que la clínica es muy heterogénea. Se suelen observar siempre en varios miembros de una familia debido a su heredabilidad (1).

El FXS (OMIM #300624) se da en casos de mutación completa y se caracteriza por una cara alargada con frente amplia y mentón prominente, orejas grandes y despegadas, hiperlaxitud articular con movilidad aumentada (aunque va disminuyendo con la edad), testículos grandes tras la pubertad,

macrocefalia y pies planos. Se puede también presentar sobrepeso u obesidad (fenotipo Prader Willi). Es común también la discapacidad intelectual y se considera la causa más frecuente de retraso mental hereditario. Las manifestaciones clínicas pueden variar según la edad del paciente y suelen ser menos severas en mujeres por el fenómeno de lyonización.

Los FXTAS (OMIM #300623) afecta a algunos varones portadores de la premutación y rara vez a las mujeres (ya que al menos la mitad de su sistema nervioso expresará el cromosoma X normal), por encima de los 50 años. Está caracterizado por temblores de acción, ataxia y problemas de equilibrio y memoria. También son comunes signos de parkinsonismo (temblor de reposo o brakikinesia). La causa principal de estos signos clínicos es la lesión en la sustancia blanca del pedúnculo cerebeloso medio (visible por RMN). Se han reportado casos de individuos portadores del alelo gris y que mostraban también signos de FXTAS, probablemente debido a que los cambios moleculares observados en ambos alelos son similares (11).

La FXPOI (OMIM #311360) afecta al 20% de las mujeres portadoras del alelo premutado y supone la pérdida de la menstruación (amenorrea) antes de los 40 años debida a un deterioro ovárico. La diferencia entre FXPOI y la menopausia precoz es que en el primero de los casos no hay un cese total de la menstruación, por lo que las mujeres se siguen pudiendo quedar embarazadas. Se han observado en mujeres portadoras de la premutación niveles elevados de la hormona estimuladora de los folículos (FSH) y bajos de la hormona anti-mülleriana (AMH) que en mujeres sanas, los cuales podrían ser indicadores de este deterioro ovárico. No hay una relación lineal entre el tamaño del alelo premutado y la edad a la que se pierde totalmente la menstruación (12).

Por último, todos los problemas psiquiátricos asociados a los alelos gris y premutados se han recogido bajo el grupo de trastornos neuropsiquiátricos asociados al X frágil (FXAND). Entre las causas moleculares se han encontrado una desregulación del calcio por sobreactivación del sistema glutamatérgico, una disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y la formación de inclusiones dentro de las neuronas y los astrocitos (13).

Además de la expansión del triplete CGG, se han encontrado nueve variantes intragénicas del gen *FMR1* que se han clasificado como patogénicas o probablemente patogénicas. El fenotipo que se ha observado en los individuos portadores es muy diverso, pudiendo mostrar rasgos físicos y no del neurodesarrollo o viceversa o incluso ambos (14). Por último, un 2% de los casos de pérdida de función no se deben a expansiones de este triplete, sino a mutaciones por cambio de base o deleciones (1). Por tanto, ante un fenotipo patológico y ausencia de expansión del triplete es necesario realizar un estudio genético más completo del gen para confirmar la causa. Esto demuestra la complejidad de la proteína FMRP.

### 1. 3. Proteína FMRP

La FMRP es una proteína de unión a RNA que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos de mamíferos, aunque es especialmente abundante en el tejido nervioso y testículos. A nivel neuronal, se expresa por todo el citoplasma, tanto en el soma como en las dendritas y en el axón. Tiene varias isoformas, que varían un poco en cuanto a expresión y función (15).

Tiene varios dominios funcionales. En primer lugar, tres dominios de unión a RNA: una caja arginina-glicina-glicina (RGG) y dos dominios de homología a K (KH1 y KH2). El nivel de metilación de la arginina



de la caja RGG regula en parte la afinidad por su diana. En segundo lugar, tiene secuencias de exportación e importación nucleares. Por último, tiene dos dominios Agenet en su extremo N-terminal, que interaccionan con residuos trimetilados de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9) y con otras proteínas. Por tanto, la FMRP puede regular la acción proteica tanto a nivel de su expresión como de su actividad (15,16).

Mediante estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se ha identificado una preferencia de la proteína por RNA largos con regiones ricas en G, y en concreto por los tetranucleótidos WGGA y UGGA (siendo W una A o una T). Estos se suelen encontrar en las regiones codificantes del mRNA (16).

Esta proteína está implicada en varios aspectos del metabolismo de los RNA (Figura 2). En primer lugar, se trata de un represor traduccional que actúa por bloqueo de la translocación del ribosoma a lo largo del mRNA o por competición con el aminoacil-tRNA para entrar en el ribosoma y permitir la elongación de un nuevo polipéptido. Un nuevo modelo propone que la FMRP regula la degradación del RNA por unión a los codones óptimos de la célula y protección del mRNA frente a una nucleasa hipotética (16). Además, también participa en el secuestro del factor de iniciación de la traducción eIF4e gracias a la proteína de interacción con *FMR1* (CYFIP1), cuya función se ve inhibida por fosforilación durante la transducción de señales de mGluR (se pasa de una conformación globular que permite el secuestro del factor de iniciación a una conformación plana que no es capaz de unirse a este) (17).

En segundo lugar, la FMRP también estimula la modificación covalente del RNA por la adenosina deaminasa (ADAR), enzima que transforma la adenosina en inosina, una base nitrogenada que la célula reconoce como guanina y que por lo tanto puede inducir sustituciones en la estructura primaria de la proteína codificada por el mRNA y aumentar la variabilidad de esta. En individuos con síndrome de X frágil, la ausencia de FMRP se traduce en un RNA hipoeditado (16).

Por último, FMRP inhibe el "Nonsense-mediated mRNA Decay" (NMD), un mecanismo celular que impide la traducción de un mRNA con codones prematuros para evitar la síntesis de proteínas con nuevas funciones deletéreas o con una actividad negativa dominante. Esto lo hace por la interacción con la helicasa UPF-1. Mediante inmunoprecipitación, se han identificado varias proteínas requeridas para el crecimiento axonal y la transducción de señales sinápticas y que están reguladas por NMD. Las mutaciones de dos de ellas (lo cual tiene el mismo efecto que la pérdida de función de la FMRP), la *HERC2* y la *SRRM4/nRS100*, están implicadas en el autismo (18).

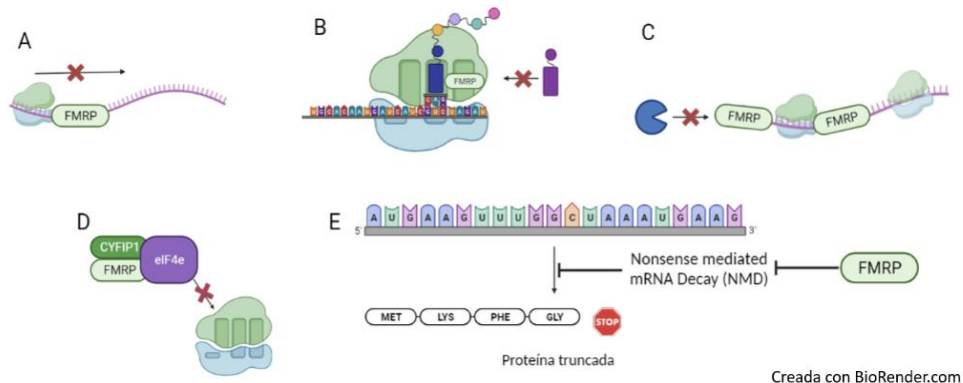


Figura 1: Aspectos del metabolismo del RNA regulados por la FMRP. A: Translocación del ribosoma por el mRNA. B: Entrada de un nuevo aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma. C: Degradación del mRNA por una nucleasa. D: Secuestro del factor de elongación eIF4e. E: Nonsense-mediated mRNA Decay. Creada con BioRender.com.

Una alteración en la función de FMRP da lugar a un cambio en los niveles normales de mRNA de la célula. Esto se debe a que hay una hiperactividad de las proteínas efectoras de la NMD, tanto por una fosforilación múltiple como por un fenómeno de “buffering up” (la degradación de sus mRNA por el propio NMD está compensada a nivel funcional por la falta de inhibición de su traducción por FMRP). En cultivos de células pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos de individuos con síndrome de X frágil, se consiguió revertir el fenotipo patológico por inhibición del NMD (18).

La FMRP realiza su función en gránulos ribonucleoproteicos que regulan la localización y el momento de la traducción. Estos gránulos se llaman gránulos X Frágil (Fragile X Granules, FXG) y contienen principalmente mRNA, ribosomas y proteínas de la familia FX. Se encuentran distribuidos a lo largo de todo el axón maduro gracias a su asociación con el citoesqueleto (3). El transporte de un mRNA hasta un gránulo parece ser independiente este (19).

Existen cuatro clases de FXG según qué tipo de proteínas FX contienen y su localización predominante en el tejido nervioso: clase I, del prosencéfalo y con las tres proteínas FX; clase II, del tejido nervioso del sistema olfatorio y con FMRP y FXR2P; clase III, de la formación reticular y con ambas proteínas FXRP; clase IV, del cerebelo y con solo FXR2P. En estos gránulos, FMRP y FXR1P actúan como represores traduccionales, mientras que FXR2P actúa como activador de la traducción. El hecho de que FXR2P se encuentre en los cuatro tipos de FXG se debe a su estructura: tiene un dominio N-miristoilado que permite su interacción con los lípidos de la membrana y con proteínas con bolsillos hidrófobos y un dominio de baja complejidad que permite su interacción con el RNA y más proteínas (19).

La actividad excretora de las neuronas presinápticas está regulada por los gránulos porque estos controlan la traducción de las proteínas  $\beta$ -catenina (que mantiene las vesículas con los neurotransmisores dentro de la célula y cerca de la membrana) y APC (que inhibe la función de la  $\beta$ -catenina por la señalización Wnt). Por tanto, los FXG podrían reforzar la sinapsis en algunas zonas del cerebro e inhibirla en otras mediante la regulación de la traducción de la  $\beta$ -catenina y/o APC (19).

Para garantizar su actividad, FMRP es inmediatamente fosforilada tras su síntesis por la caseína quinasa II (CK2) en el residuo de serina 499. Esta modificación induce un cambio conformacional que la oculta de la acción de fosfatasa. Además, parece favorecer otras fosforilaciones sobre residuos de serina o treonina en las regiones contiguas en respuesta a la estimulación de mGluR, aunque las quinasas responsables son desconocidas. Se ha visto que las mutaciones de FMRP que mantienen un aminoácido fosforilable en la posición 499 parecen ser neutras (20).

La degradación de esta proteína se realiza por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), que depende de su desfosforilación previa por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). La represión traduccional por el complejo RISC mediada por FMRP ya es inhibida gracias a la acción de PP2A. Sin embargo, el bloqueo de la translocación de ribosomas a lo largo del mRNA solo se elimina tras la degradación de FMRP (21).

La función de mGluR como regulador de la función de FMRP es un poco contradictoria: por una parte, induce su fosforilación por estas quinasas desconocidas, pero por otra parte induce la activación de la PP2A. El balance entre un estado u otro de la proteína depende principalmente del tiempo que se tarda en activar cada vía y de la duración de esta activación (15).

Otra modificación postraduccional que afecta a la función de la FMRP es la sumoilación, que consiste en la adición de la proteína SUMO sobre un residuo de lisina que se encuentre en la secuencia consenso aminoácido ramificado – lisina – aminoácido cualquiera – glutamato de una región desordenada o de

un loop de la proteína. Al estar cargada, SUMO influye sobre todo en las interacciones proteína-proteína. Hay dos enzimas implicadas en la sumoilación:

- Proteasas específicas de SUMO (familia de genes SENP): tienen una actividad cisteín proteasa que activa la proteína SUMO antes de que esta se añada sobre la proteína y una actividad isopeptidasa que separa ambos.
- Ligasa UBC9: cataliza la transferencia de la SUMO activada sobre el sustrato.

La FMRP tiene tres residuos de lisina susceptibles de ser modificados. Esto induce su disociación de los FXG y por tanto elimina su represión traduccional. El estado sumoilado de la proteína está regulado por el mGluR, encontrándose alrededor del 4% de toda la FMRP de la neurona en forma sumoilada (22).

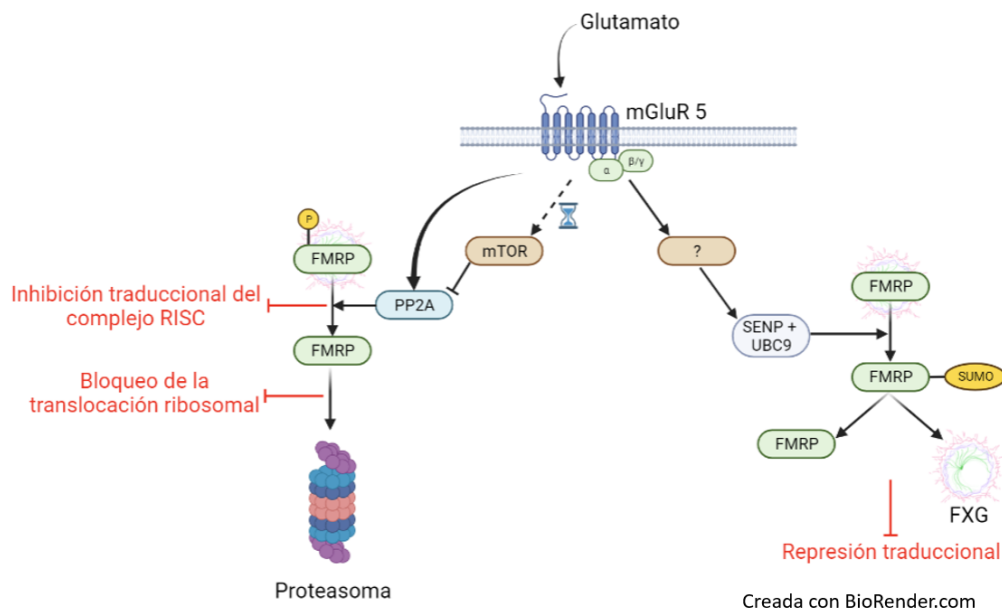


Figura 2: Regulación del efecto de la FMRP sobre la traducción por la señalización de mGluR5 y modificaciones postraduccionales. Creada con BioRender.com

#### 1. 4. FMRP y plasticidad neuronal

La plasticidad neuronal se define como la capacidad de la neurona para modular las propiedades excitables de la membrana plasmática y su actividad de transmisión del impulso nervioso. Por tanto, lo que se modula es la excitabilidad de una célula, que depende de la composición proteica local y la concentración iónica a ambos lados de la membrana plasmática (23). Dos procesos importantes de plasticidad neuronal son la potenciación y la depresión sinápticas a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente), que tienen lugar en las dendritas postsinápticas (24).

Se ha propuesto que la plasticidad neuronal está regulada en parte por la acción conjunta de FMRP y los receptores de glutamato metabotrópicos de tipo 1 (mGluR), que regulan la expresión génica de proteínas implicadas en la sinapsis. La primera es un represor traduccional, mientras que los segundos son activadores transcripcionales. Por tanto, la pérdida de FMRP supone una transcripción y traducción proteica descontroladas y la pérdida de la función neuronal (24).

Los mGluR son receptores acoplados a proteínas G que se encuentran en forma dimérica en la membrana y cuya unión con al menos un glutamato media la activación de un gran número de efectores intracelulares, entre los cuales se encuentran (15):

- La vía ERK (Extracellular signal-Related Kinase): lleva a la activación de eIF4e y por tanto a la síntesis proteica (15).
- La vía mTOR (Mammalian Target of Rapamycin): inhibe la PP2A y lleva a la activación de la FMRP. Necesita más tiempo para activarse al completo. Esta vía está regulada negativamente por la propia FMRP (15).

La activación de mGluR lleva a la LTD gracias a la internalización de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo AMPAR (15). Estos canales de potasio y sodio son en parte responsables de la transmisión de la señal excitadora (23). Como mGluR y FMRP son antagonistas, la pérdida parcial o total de FMRP supondría una disminución de la cantidad de AMPAR en membrana y una menor excitabilidad (25).

Sin embargo, se ha observado que los individuos con FXS muestran una hiperexcitabilidad del sistema nervioso. Esto se podría deber a defectos en los sistemas de canales iónicos de la membrana plasmática (canalopatías). Estos pueden afectar a la iniciación y mantenimiento del potencial de acción, la exocitosis de las vesículas de neurotransmisores y la función dendrítica. En primer lugar, un aumento de la expresión de los canales de potasio rectificadores Kv3.1 produce una mayor velocidad de repolarización y mayor tasa de despolarización. En segundo lugar, hay un aumento de la corriente iniciadora de potencial de acción mediadas por sodio. En tercer lugar, aumenta la expresión de los canales de calcio de tipo N y P/Q y por tanto la exocitosis de neurotransmisores. Por último, en la dendrita postsináptica aumenta la sensibilidad de la membrana al glutamato por disminución del canal de calcio de tipo L Cav3.1 (25).

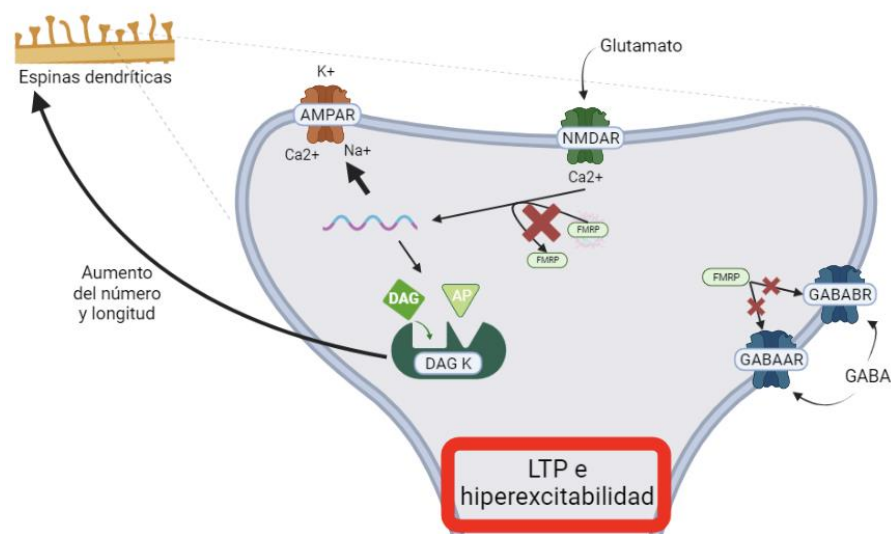


Figura 3: Implicación de la proteína FMRP en la plasticidad neuronal postsináptica y efecto de su ausencia. Creada con BioRender.com

### 1. 5. FMRP y disfunción neuronal presináptica

FMRP regula dos componentes muy importantes en neuronas presinápticas: el sistema endocannabinoide y los canales de potasio sensibles al calcio y al voltaje (BKCa). Estas proteínas participan en la liberación de los neurotransmisores desde la neurona presináptica a la matriz extracelular (26).

El sistema cannabinoide está compuesto por dos receptores, CB1 y CB2, cuyos ligandos son el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y la N-araquidoniletanolamina (AEA), respectivamente. En el caso del sistema nervioso, el más predominante es CB1. A diferencia del resto de neurotransmisores, 2-AG se sintetiza según demanda a partir de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato gracias a las enzimas fosfolipasa C $\beta$  y diacilglicerol lipasa  $\alpha$ . Esto ocurre en la neurona postsináptica tras la despolarización de la membrana. En la neurona presináptica, 2-AG se une a su receptor y bloquea la excreción de neurotransmisores. Por tanto, la neurotransmisión química tiene un sistema de retroalimentación mediada por el sistema cannabinoide (26).

Este sistema está muy poco desarrollado en individuos con TEA y se ha visto que en muchos casos hay unos niveles de endocannabinoides muy bajos y variantes de los genes que codifican para el receptor CB1 y la diacilglicerol lipasa  $\alpha$  (26).

Los BKCa expresan de forma ubicua por todo el cuerpo, aunque muestran especificidad de tejido en la subunidad reguladora. Su apertura se debe a la despolarización de la membrana plasmática y al aumento del calcio iónico citoplasmático, que producen un eflujo de iones potasio al medio extracelular y la consecuente hiperpolarización. Además, también interacciona con canales de calcio tipo P/Q y N y estimula su cierre para que los niveles de este ion no aumenten todavía más (26).

FMRP interacciona con todas las subunidades de este canal y regula su sensibilidad al calcio, reduciendo la duración del potencial de acción y la excreción de neurotransmisores. Su pérdida lleva a una represión transcripcional de BKCa y a un aumento de la excreción de neurotransmisores. Por otra parte, ya se han asociado varios trastornos del desarrollo con variantes del gen de BKCa (26).

### 1. 6. FMRP y disfunción neuronal postsináptica

Las espinas dendríticas son protrusiones de la membrana postsináptica que establecen conexiones directas con el axón de la neurona presináptica. Están compuestos por una base estructural de filamentos de actina F que regulan su morfología y sobre la que se apoyan moléculas de miosina II y GTPasas de la familia Rho que participan en su maduración y actividad. Tienen una región rica en los receptores de glutamato NMDA cuya señalización regula la plasticidad de las espinas, y por tanto la neuronal (27).

La activación de los NMDA induce un aumento del número de espinas en las dendritas y del tamaño de su cabeza, con un mayor número de receptores de glutamato AMPAR insertados en la membrana. Esto conduce a la LTP. Sin embargo, cuando no hay activación de los NMDA, el tamaño de las espinas disminuye y los receptores AMPA son internalizados. Esto conduce a la LTD (27).

La pérdida de la FMRP induce una sobreactivación de las GTPasas Rho porque interaccionan con CYFIP1 al estar esta libre. Esto lleva a la polimerización de la actina y a una inhibición de la proteína despolimerizante cofilina. En consecuencia, las neuronas acaban presentando un aumento del número y longitud de las espinas dendríticas, y por tanto una mayor densidad de receptores AMPA en la membrana. Esto podría explicar la hiperexcitabilidad de los individuos afectados por el DXS o la FXTAS. (28)

El tamaño y densidad de las espinas dendríticas también está regulada por la concentración de dos mensajeros lipídicos, el diacilglicerol y el ácido fosfatídico. El primero se transforma en el segundo por

la acción de la diacilglicerol quinasa  $\kappa$  (DGK  $\kappa$ ), cuyo mRNA está regulado por FMRP. La falta de esta provoca una disminución de la DGK  $\kappa$  y un desequilibrio en la concentración de ambos mensajeros (29), lo que lleva a la pérdida de la plasticidad neuronal y a un fenotipo parecido al FXS.

### 1. 7. Regulación del sistema GABAérgico por la FMRP

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro y aproximadamente un 20% de las neuronas del sistema nervioso central son GABAérgicas. La hiperpolarización de la membrana neuronal, y por tanto su incapacidad para transmitir información en el cerebro mediante potenciales de acción, está provocada por los dos componentes de este sistema en la neurona postsináptica (30):

- Receptor GABA (A): es un canal iónico activado por ligando que aumenta la permeabilidad de la membrana por los iones cloruro y bicarbonato, que crean una corriente entrante en la neurona y la hiperpolarización de su membrana por aumento de la cantidad de aniones intracelulares (30).
- Receptor GABA (B): es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína G que aumenta la permeabilidad de la membrana por los iones de potasio y la disminuye por los iones de calcio, lo que lleva a una hiperpolarización de la membrana postsináptica (31). Su acción inhibitoria es más lenta que la del receptor GABA (A) (32).

FMRP regula la traducción de ambos tipos de receptores y otras enzimas implicadas en el metabolismo del GABA, como la glutamato descarboxilasa (enzima limitante en la biosíntesis del neurotransmisor) o la succinato semialdehído (enzima del catabolismo del neurotransmisor) (30). Además, también es capaz de regular la actividad de los receptores mediante interacciones proteína-proteína. En concreto, controla la apertura espontánea del receptor GABA (A), manteniendo así el potencial de membrana y la excitabilidad neuronal a unos niveles adecuados para una buena integración de la información (33).

El fallo de la FMRP podría provocar una mala regulación de todo el sistema GABAérgico (aunque esto no está relacionado con ninguna de las alteraciones anatómicas observadas). Una alteración de este sistema está asociada con episodios de ansiedad, epilepsia y dificultad de aprendizaje. Todos estos rasgos son comunes a individuos afectados del FXS y de TEA (30,31) (Figura 3).

### 1. 8. Alteraciones metabólicas en premutados

La pérdida parcial de FMRP en individuos portadores del alelo premutado provoca también una alteración del metabolismo de las células, lo que podría explicar también parte de efectos a nivel neuronal puesto que estos tejidos son especialmente sensibles al desequilibrio energético. El estudio solo se ha hecho en individuos afectados de FXTAS (34).

En cuanto al metabolismo de los glúcidos, se ha detectado una disminución de la cantidad de piruvato que entra en el ciclo de Krebs y un aumento de la cantidad de lactato en plasma. Esto se debe a que una elevada relación NADH/NAD inhibe la piruvato deshidrogenasa, enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato y que por lo tanto regula el catabolismo aerobio de este. También se ha detectado un descenso en la actividad OXPHOS mitocondrial. El conjunto de estas alteraciones se conoce como efecto Warburg (34).

La fracción lipídica es mayor en las neuronas que en muchos otros tipos celulares (principalmente por su alto contenido en esfingomielina), por lo que una alteración de su metabolismo podría dificultar la función sináptica. En primer lugar, se han detectado bajos niveles de la enzima esteroil-coA desaturasa 1, que regula la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados y que es esencial para la axonogénesis y la diferenciación neuronal. En segundo lugar, los niveles de la serie n-3 de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) están por encima de los niveles normales, lo cual se ha relacionado con problemas de memoria y del neurodesarrollo. Por último, se ha detectado un aumento de esfingosina, esfingosina-1-fosfato y esfingomielina. Esto se debe a un aumento de expresión de las enzimas ceramida sintasa y ceramida quinasa. Ambas enzimas también interactúan con la repetición CGG, lo cual promueve la degeneración celular (34).

En cuanto al metabolismo de compuestos nitrogenados, la alteración más importante es un aumento de la síntesis de glutamato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico debido a un aumento de la actividad aminotransferasa en las células. También se han detectado fallos en la síntesis de purinas, lo que acaba conduciendo a fallos en la replicación y transcripción del DNA (34).

### 1. 9. Trastorno del Espectro Autista

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) constituye un grupo de trastornos del neurodesarrollo caracterizados por un déficit cualitativo de interacción social, problemas de comunicación y patrones de comportamiento repetitivos. Estas características suelen variar entre cada individuo, habiendo un mayor o menor grado de funcionalidad (35). Afecta a 1 de cada 160 jóvenes y es hasta cuatro veces más predominante en hombres que en mujeres (36). A nivel anatómico-histológico, se observa una alteración en la estructura y organización del cerebro, con una macrocefalia de las regiones involucradas en el desarrollo social (que aparece en el primer año de vida) y una conectividad intercelular reducida (37).

Uno de los rasgos clínicos más comunes y que hacen sospechar de TEA en jóvenes es cierto grado de disfunción motriz. Se han observado una hipotonía muscular, un equilibrio estático y dinámico rebajados de más del 50%, una peor imitación de gestos y una falta de coordinación general en personas con TEA. El número de rasgos afectados es mayor si además el joven tiene una discapacidad intelectual. Estos defectos se han asociado a posibles anomalías del tracto corticoespinal ventral, una inmadurez del cerebelo y los ganglios basales y una desregulación de la propiocepción (38).

La etiología del TEA es muy variada, aunque se sabe que existe un fuerte componente genético debido a su heredabilidad. Mutaciones con pérdida de función que afecten a las proteínas involucradas en la sinaptogénesis (neuroxinas, neuroliginas, proteínas Shank, proteínas de la vía de señalización Wnt) o en el proceso de sinapsis (canales iónicos de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje, receptores de neurotransmisores) suelen aparecer en muchos casos de TEA. Además de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), se han detectado una mayor cantidad de variantes de número de copia (CNV) en genes asociados con la susceptibilidad al TEA y que suelen aparecer de novo en individuos afectados (36).

En general, se considera el TEA como un trastorno poligénico. Sin embargo, es el gen *FMR1* el más asociado al TEA, siendo la causa monogénica de aproximadamente el 3% de los casos (26). Además de por la expansión del triplete CGG de este, se han detectado ocho SNP en la familia extendida de genes

FX (que incluye la familia FX canónica y el FMR2) que parecen ser responsables de un fenotipo TEA. Gran parte de estos polimorfismos parecen afectar a la regulación de la expresión génica por el miRNA miR-181, que ya se ha asociado con el desarrollo neuronal y la neuroinflamación (39).

También existe un componente epigenético. Las principales diferencias que se han observado con respecto a individuos sanos en este aspecto son un aumento en la metilación de genes implicados en el desarrollo neuronal y una regulación por disminución de varios microRNA (el más estudiado es miR-6126, cuyas dianas están implicadas en las vías sináptica y de la oxitocina), y por tanto en una menor transcripción (36).

Como ya se ha explicado, la hipermetilación del gen *FMR1* lleva a su silenciamiento y la pérdida de la FMRP es lo que acaba provocando la disfunción neuronal que podría originar el autismo. El cromosoma X es una de las regiones del genoma con mayor tasa de metilación en mujeres debido a un mecanismo fisiológico de compensación génica llamado inactivación del cromosoma X (XIC). Este depende de dos RNA no codificantes: XIST para mediar el reclutamiento de complejos represores de la cromatina y JPX para activar la transcripción de XIST (y posiblemente de otros genes autosómicos relacionados con el desarrollo) por desplazamiento del factor cromatínico CTCF. En ratones se ha descrito también un tercer RNA no codificante llamado Tsix (antisentido del XIST) que determina el alelo sobre el que tiene lugar el XIC, aunque todavía no está claro si en humanos este transcrito también forma parte del mecanismo. Por último, un cuarto RNA específico de primates llamado XACT se expresa a partir del cromosoma X activo y se mantiene cerca de este generando como una nube a su alrededor. Estos marcadores epigenéticos se van implantando en el DNA durante el desarrollo embrionario (40).

Gracias a la secuenciación al bisulfito, se ha determinado que las regiones hipermetiladas de individuos con TEA se concentran en el cromosoma X y en regiones del genoma que codifican para proteínas implicadas en el desarrollo embrionario. Aunque aún esté por confirmar, esto parece favorecer la implicación de los genes codificados por el cromosoma X en esta patología (40).

También son importantes los factores ambientales. La exposición fetal a esteroides sexuales se ha asociado con el TEA, habiéndose observado un aumento en los niveles de testosterona en el líquido amniótico de mujeres afectadas (mientras que en los hombres se mantienen normales) y de cortisol en hombres afectados. Esto no parece concordar con la diferencia de prevalencia que existe según el sexo, por lo que son necesarios más estudios para confirmar esta relación (36). La edad parental también podría estar implicada puesto que se ha demostrado que muchos cambios genéticos y epigenéticos desarrollados durante la edad adulta son heredables (36).

Por último, una disbiosis también podría provocar un estrés sobre las neuronas debido a la estrecha conexión que existe entre el sistema nervioso y el gastrointestinal (eje microbiota-intestino-cerebro). Por ejemplo, una microbiota rica en el género *Clostridium* podría liberar muchos metabolitos proinflamatorios y neurotóxicos que podrían explicar parte del comportamiento repetitivo y los síntomas gastrointestinales de los individuos con TEA. Por tanto, se ha hipotetizado que un tratamiento con probióticos podría ayudar a mejorar estos rasgos (41).



## 2. HIPÓTESIS

La presencia de repeticiones del triplete CGG en alelo gris y en el rango de premutación del gen *FMR1* podría APOYAR la causalidad del TEA y trastornos de conducta en algunos pacientes sin etiología filiada.

## 3. OBJETIVOS

- Ver la frecuencia de casos con TEA y TEA a los que se les ha realizado el estudio genético en la Sección de genética del HUMS en el periodo de 2014 a 2022 para descartar el Sd. de X Frágil y/o premutación del gen *FMR1* que presentan un alelo en el rango gris (45-54 CGGs) y/o alelo en rango premutación (55-200 CGGs). Diferenciar por edad, sexo y clínica.
- Evaluar la posible implicación de la presencia de alelos en el rango gris y en el rango de premutación del gen *FMR1* en el contexto clínico de TEA/autismo en pacientes tanto en edad pediátrica como adultos que han sido estudiados mediante TP-PCR en la Sección de genética del HUMS en el periodo de 2014 a 2022 (9 años), unos 2300 pacientes (población de Aragón del Sector I y II, Alcañiz, Teruel, Huesca y Barbastro).

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

- Diseño: Estudio descriptivo retrospectivo
- Participantes: Pacientes a los que se había realizado el estudio genético de X frágil y/o premutación en el gen *FMR1* en la Sección genética del HUMS en el periodo de 2014 a 2022 (9 años) mediante TP-PCR, llevada a cabo con el Kit AmpliDeX<sup>®</sup> PCR/CE *FMR1*, junto con una electroforesis capilar del producto de la amplificación. El procedimiento completo de extracción y análisis del DNA está recogido en el PTA 06\_Z2(E)M\_L-GE (Procedimiento para el estudio genético Síndrome X-Frágil/FXPO/FXTAS), implantado en el Servicio Aragonés de Salud y que sigue la norma UNE-EN-ISO 15189.
- Fuentes de información: Se realizó una revisión bibliográfica de las publicaciones existentes en la literatura sobre la prevalencia de la premutación y los alelos grises del gen *FMR1* en el autismo, así como el mecanismo por el que estos polimorfismos podrían estar implicados en la disfunción neuronal que lleva a los TND. También se incluyó la revisión de artículos que abordan la biología del *FMR1* y la FMRP.
- Procedimiento: Se trabajó en una base de datos pseudoanonimizada con el resultado de la TP-PCR y el contexto clínico y/motivo de solicitud del estudio genético del Sd. X Frágil o premutación en el gen *FMR1* y se estudió la correlación del genotipo con el cuadro clínico, analizando caso por caso de forma particular con datos pseudoanonimizados y aplicando los test estadísticos apropiados. Se estableció el porcentaje de casos que presentaban alelo/premutado en edad pediátrica, su contexto clínico en referencia a todos los estudios genéticos realizados y se evaluó los datos obtenidos con lo ya publicado previamente en la literatura. Se evaluará también la frecuencia del alelo gris y premutado en adultos, a pesar de que no existe mucho contexto clínico de evaluación neuropsicológica.

- Análisis estadístico: Se analizaron los resultados del número exacto de repeticiones del triplete CGG y las variables edad, sexo, clínica (Rasgos TEA, disfunción del lenguaje, retraso psicomotor sobretodo). Se trabajarán los datos en un archivo Excel y con el software de estadística Jamovi (v.2.3.21), aplicando los test estadísticos apropiados para analizar las diferencias en las frecuencias de las variables en cada uno de los alelos (tes de contraste de hipótesis, comparación de proporciones y medias).

- Ética: El presente trabajo contó con el dictamen favorable del CEICA el 8 de febrero de 2023 con C.I. PI23/008 (Anexo 1).

Se explica a continuación el fundamento de la metodología empleada para la realización del estudio del tamaño de las repeticiones del triplete CGG.

#### 4. 1. Fundamento de la TP-PCR

La TP-PCR (Triplet Primed repeat Polymerase Chain Reaction) se utiliza para realizar estudios de regiones repetidas, por lo que permite determinar el número de repeticiones de nucleótidos (en general tri-, tetra o hexanucleótidos) y la presencia o ausencia de expansiones de alelos.

Se trata de una PCR multiplex que utiliza tres cebadores o primers: uno directo que es específico de la región flanqueante (y variable) del extremo 5' de la expansión y que está marcado con fluorescencia en su extremo 5' (P1), uno reverso específico de la repetición de interés que puede hibridar con cualquier zona de esta (P2) y por último uno reverso que es complementario al extremo 3' de la expansión y que puede solaparse con parte de esta (P3).

Los volúmenes de reactivos en la preparación de la TP-PCR y el programa del termociclador utilizado se recogen en los Anexos 3 y 4, respectivamente.

Esta técnica es rápida (en menos de 24 horas se tienen los resultados) y tiene una fiabilidad del 99%. No necesita un gran volumen de muestra (a partir de 2 µL) ni una concentración especialmente alta de ADN (2-5 ng/µL). Además, permite diferenciar mujeres heterocigotas de homocigotas. Todo esto hace que presente ciertas ventajas frente a la PCR convencional o el Southern blot.

La limitación que presenta es que no permite cuantificar la longitud de la expansión si esta es muy grande, por lo que para confirmar algunos resultados es necesario realizar un Southern blot. En el caso del *FMR1*, se pueden determinar con exactitud expansiones de hasta 200 CGG, aunque la amplificación está optimizada para alelos con más de 1000 CGG.

#### 4. 2. Electroforesis capilar con POP-7

La electroforesis capilar es una técnica analítica de separación que combina el detector de alta sensibilidad de la HPLC con el uso de capilares de sílice fundida de la cromatografía de gases. La separación de los analitos de la muestra se debe a la diferencia en la velocidad de migración según su relación masa/carga.

La pared del capilar está cargada a pH>3 porque se desprotonan los grupo silanol, de forma que se establece un flujo electroosmótico de protones que complementa el campo eléctrico a la hora de

separar los analitos. Los tiempos de análisis de esta técnica son muy cortos y no se necesita mucha muestra. Los capilares contienen el polímero POP-7 en su interior para controlar este flujo electroosmótico y este se acondiciona con una solución amortiguadora de separación.

Antes de introducir la muestra en el analizador, es necesario desnaturalizar el producto de amplificación de la TP-PCR. Para ello se prepara una solución con 11 µL de formamida Hi-DI, 2 µL del marcador de peso molecular ROX1000 y 2 µL del producto de la PCR. Esta solución se desnaturaliza en un termociclador durante 2 minutos a 95°C y se inserta en el instrumento de electroforesis capilar.

#### 4.3. Análisis de los electroferogramas

Cada uno de los picos del electroferograma está separado por tres pares de bases, por lo que el número de repeticiones CGG corresponde con el número de picos. Sin embargo, el cálculo para cada uno de los alelos de las muestras analizadas se realiza de forma automatizada a partir del tamaño del alelo en pares de bases y una recta de calibración (realizada cada 6 meses con estándares proporcionados por Asuragen).

El número de interrupciones AGG se puede calcular de forma manual a partir del electroferograma, pues se observa un espacio más grande de lo normal entre dos picos, que corresponde con las tres pares de bases del AGG y las tres del CGG. A continuación, se presentan diferentes ejemplos de electroferogramas y su interpretación:

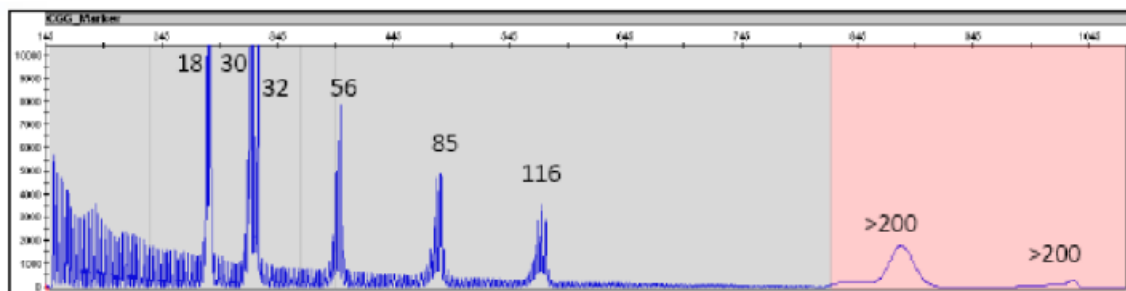


Figura 4: Electroferograma que se visualiza con el reactivo AmpliDeX<sup>®</sup> FMR1 Controls cuando se analiza con el AmpliDeX<sup>®</sup> PCR/CE FMR1 Kit y con el que se realiza la curva de calibración.



Figura 5: Electroferograma de un varón normal con un alelo de 27±1 repeticiones CGG y 2 interrupciones AGG.

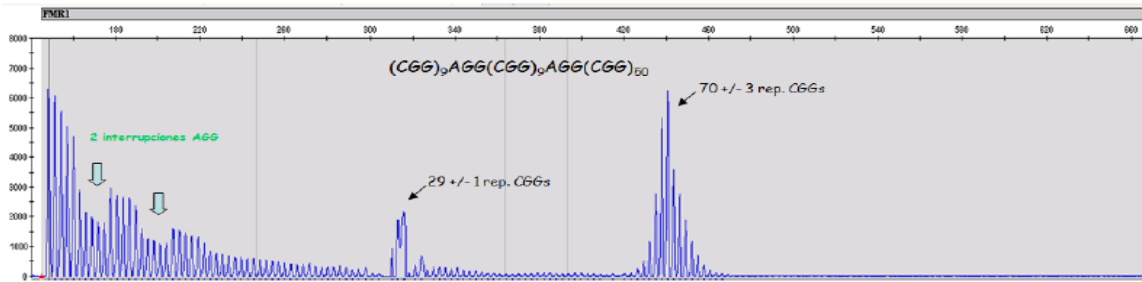


Figura 6: Electroferograma de una mujer premutada, con dos alelos de  $29 \pm 1$  y  $70 \pm 3$  repeticiones CGG y 2 interrupciones AGG.

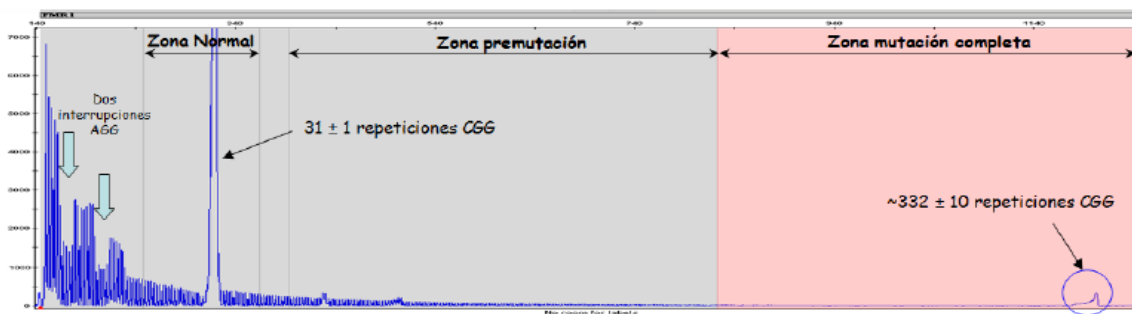


Figura 7: Electroferograma de una mujer con la mutación completa del gen *FMR1*, con un alelo sano de  $31 \pm 1$  CGGs y el expandido de  $322 \pm 10$ , y 2 interrupciones AGG.

## 5. RESULTADOS

Desde que se comenzó la base de datos de análisis del gen *FMR1* por TP-PCR, se han analizado las muestras de 2303 pacientes de la población aragonesa. De entre ellos, 63 son portadores del alelo gris y 71 son portadores del premutado, lo que supone unas frecuencias en la población analizada de 2,7% y 3,1%, respectivamente. Es interesante remarcar que de estos 2303, al 77,7% se les pedía el análisis por mostrar algún tipo de fenotipo neurológico. La gran mayoría son derivados desde las consultas de neuropediatría, lo que demuestra la frecuencia con la que se sospecha una anomalía genética del *FMR1* en edades tempranas (el resto sobre todo son casos de amenorrea, insuficiencia primaria ovárica o diferentes tipos de ataxia). Este porcentaje puede ser no ser del todo exacto debido a la falta de especificaciones por parte del clínico que lo pide.

Para el alelo gris, el 50,7% de los pacientes muestran alguno de los signos de TEA y la longitud de la expansión de estos es de  $49 \pm 3$  trinucleótidos CGG. En cambio, para el alelo premutado, solo el 8.5% de los pacientes muestran los signos de TEA y la longitud de la expansión es de  $56 \pm 1$  trinucleótidos CGG. En ambos casos, el sexo de los pacientes se distribuye igualmente entre hombre y mujeres. Como ya se ha mencionado, la mayoría de los análisis se piden desde la consulta de neuropediatría: la edad media para los pacientes portadores del alelo gris es de 6 años y para el alelo premutado de 4 años.

Además de por TP-PCR, otros estudios genéticos fueron realizados en los individuos portadores del alelo patológico del *FMR1*. Entre ellos destacaron los arrays de hibridación comparativa (aCGH), la secuenciación de nueva generación (NGS) (exomas dirigidos y tríos) y el cariotipo. El objetivo de estas pruebas complementarias era descartar otras variantes o mutaciones génicas que pudieran apoyar el contexto clínico. Entre los pacientes de alelo gris, 5 de los 34 mostraban un resultado anormal de

alguna de estas pruebas y estas alteraciones parecen apoyar el contexto clínico, por lo que el alelo patológico del gen *FMR1* dejaría de ser responsable. Estos resultados, así como los rasgos de las enfermedades relacionadas con las otras variantes encontradas, se han recogido en la Tabla 1.

Longitud del CGG	Contexto clínico	Prueba anormal	Variantes génicas encontradas	Síndromes clínicos asociados	OMIM
48	RP, hipertelorismo, hipotonía axial	Exoma	Mutación de cambio de sentido en el gen <i>BCL11B</i>	TND con retraso del lenguaje, dismorfias faciales y anomalías en las células T	618092
46	RP	Cariotipo y aCGH	Delección terminal de 13.7Mb en el brazo corto del cromosoma 9	Hipertelorismo, RP y retraso del lenguaje	158170
47	RP, DI	aCGH	Microdelección proximal en la banda cromosómica 15q11.2	RP y DI	615656
53	TND con afectación del lenguaje, interacción social y desarrollo motor. Macrocefalia. Episodios de desconexión	aCGH	Duplicación patogénica del locus 7q11.23 (región de Williams-Beuren), duplicación de significado incierto del locus 7q21.11	Macrocefalia, DI y retraso del lenguaje severo expresivo	609757
46	Clínica TEA	aCGH	Delección probablemente patogénica de los loci 10q11 y 22q11.23	Retraso del desarrollo y del lenguaje, dificultades de aprendizaje, TEA	

Tabla 1: Resultados de los estudios genéticos completos de los cinco pacientes con el alelo gris a los que se les ha encontrado otra mutación o variante. NA: no analizado. RP: Retraso psicomotor. DI: discapacidad intelectual. TND: Trastorno del Neurodesarrollo

Como ya se ha descrito, el TEA es una entidad muy diversa y el fenotipo cognitivo suele ser el más representativo. De los 29 pacientes restantes portadores del alelo gris y que mostraban algún signo del TEA, el 72,4% de estos presentaba algún rasgo de trastorno del neurodesarrollo (TEA, TDAH, discapacidad intelectual, retraso del lenguaje). En el caso de los 6 pacientes portadores del alelo premutado, este valor es del 50%.

Otro de los rasgos más comunes observados en los pacientes de ambos tipos de alelos, y por el cual el análisis genético era directamente recomendado en jóvenes, es el retraso psicomotor. En concreto, se detecta en el 41,4% de los pacientes con el alelo gris y con algún signo del TEA y en el 50% de los pacientes con el alelo premutado.

Por último, una dificultad a la hora de empezar a hablar en los niños pequeños también se considera un rasgo que podría tener una causa genética y en concreto el *FMR1*. En este caso, el 17,2% de los pacientes con el alelo gris muestran esta afección y siempre en conjunto con algún otro rasgo de trastorno del neurodesarrollo. Ninguno de los portadores del alelo premutado lo mostraban.

		Alelo gris	Alelo premutado
<b>Longitud del alelo (CGGs)</b>		48,9 ± 3,10	56 ± 1,26
<b>% de cada fenotipo relacionado con el TEA</b>	<b>Trastorno del neurodesarrollo</b>	72,4	50
	<b>Disfunción motriz</b>	41,4	50
	<b>Dificultad de lenguaje</b>	17,2	0

Tabla 2: Frecuencias obtenidas para cada uno de los rasgos del TEA en los alelos analizados

Hay que tener en cuenta que los portadores del alelo premutado y que muestran signos de trastornos del neurodesarrollo tienen una longitud de la expansión del triplete CGG que se acerca mucho al umbral entre los alelos premutado y gris. Debido a la heterogeneidad de la clínica que muestran los pacientes con una mutación del gen *FMR1*, se podría considerar el umbral entre ambos tipos de alelos un poco difuso y dependiendo del individuo una longitud característica del alelo premutado se podría comportar como uno gris, y viceversa. En general, el alelo gris se define como una longitud de 45-54 triplete CGG, pero en algunos casos se habla de 41-60 triplete (42). Por tanto, a la hora de estudiar las frecuencias, se podría tener en cuenta una población de alelos grises de  $n = 82$  y la frecuencia de pacientes que muestran alguno de los signos de TEA se quedaría en 48,7%.

## 6. DISCUSIÓN

Este análisis de frecuencias de un fenotipo relacionado con el TEA permite ver que existe una relación entre este y el alelo gris del gen *FMR1*. El mecanismo fisiopatológico de esta todavía no está del todo claro, aunque probablemente sea por un defecto de varios sistemas de la biología neuronal debido a la importancia de la FMRP.

Ya se ha determinado en varios estudios que la proteína FMRP tiene unos niveles muy bajos en el cerebro de muchos pacientes psiquiátricos, incluyendo el autismo. Además, la tasa de fosforilación de la proteína parece estar disminuida en estos pacientes, lo que aumenta su degradación. Parece ser que también las alteraciones funcionales de la FMRP se deben en muchos casos a mecanismos postranscripcionales, puesto que en muchos casos los niveles del mRNA son normales (32).

Sin embargo, la relación entre el alelo gris y un fenotipo cognitivo es controversial. Loesch et al. pudieron asociar este genotipo con un mayor riesgo de TEA en jóvenes chicos, aunque su estudio se realizó con una muestra pequeña ( $n=42$ ) y se acabó atribuyendo el fenotipo a mecanismos epigenéticos. Sin embargo, Madrigal et al. realizaron un estudio con una población mayor ( $n=300$ ) y solo encontraron que un 1,3% de esta mostraba un fenotipo autista. Además, también vieron una ausencia de relación entre este alelo y otros fenotipos cognitivos, en concreto el trastorno de déficit de la atención e hiperactividad y la discapacidad intelectual (6).

En otro estudio realizado en Estados Unidos sobre la capacidad de memorización y las habilidades en aritmética de niños entre 6 y 14 años, se encontraron a una niña y un niño de 57 y 46 repeticiones CGG, respectivamente, que presentaban problemas a la hora de realizar cálculos matemáticos simples. En ambos casos también se observaba una disminución de su memoria operativa (fonológica y de espacial). Teniendo en cuenta el tamaño de la muestra ( $n=121$ ), en este caso se obtiene que 1 de cada 60 niños con discalculia también presentaban un alelo anormal de *FMR1* (43).

La disfunción del lenguaje es una de las manifestaciones del autismo, por lo que el *FMR1* podría estar implicado. Se ha identificado una relación curvilínea entre el grado de esta disfunción y el número de CGG cuando este se encontraba en el rango normal y por debajo de 130. La mayor disminución en la fluidez ocurre en alelos premutados de longitud media (entre 90 y 110 CGG) o alelos muy pequeños, lo que podría indicar que un *FMR1* con una región 5'UTR muy corta podría ser también patológica. Sin embargo, el número de muestras del alelo gris que ellos consideran es muy baja (solo una), por lo que la relación entre este rasgo y el alelo gris no se puede establecer de forma estadísticamente correcta (44). En nuestro estudio, se observó una mayor frecuencia (17,6%), por lo que probablemente la forma de la curva cambiaría y se vería un mayor grado de disfunción, lo cual corresponde con los resultados obtenidos.

Otro rasgo común en patologías relacionadas con el *FMR1* y el autismo son dificultades a la hora de procesar la información externa debido a una mayor sensibilidad ante estímulos sonoros u olfatorios, sobretodo. Esto comienza a edades muy tempranas en ambas patologías y podría deberse a características fisiopatológicas y anatómicas parecidas. A partir de estudios basados en las escalas sensoriales, se vio que los portadores del alelo premutado mostraban una selectividad mayor a la hora de elegir la comida y una hipersensibilidad táctil más marcadas que en el caso de los afectados del FXS. En cuanto a diferentes de género, los chicos parecían mostrar más hipersensibilidad y las chicas más problemas de alimentación y digestivos (45).

## 7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Para poder realizar análisis de regresión entre estos parámetros habría sido necesario tener un valor numérico del grado de afección de los pacientes para cada uno de los rasgos estudiados, puesto que en este análisis solo la edad y la longitud del alelo CGG son variantes cuantitativas, el resto son cualitativas. Por tanto, el estudio está en gran parte limitado por la falta de estos valores.

Además, puede haber pacientes que residan en la comunidad autónoma de Aragón, con TEA/ TND que no hayan sido estudiados genéticamente en la Sección de Genética del HUMS, sino en centros privados por lo que puede haber sesgo en el tamaño muestral, así como el porcentaje de frecuencias de los alelos gris y premutados.

## 8. CONCLUSIÓN

- Este estudio permite confirmar la asociación que se ha hecho entre el TEA y los FXAND (y sobre todo los asociados al alelo gris), aunque todavía no este claro el mecanismo fisiopatológico.

- Una posible continuación de este estudio podría ser, a partir de muestras biológicas de estos pacientes, medir los niveles del mRNA y de la proteína FMRP para poder confirmar la relación entre estos y la longitud de la expansión, descrita en (Loesch et al. 2007). La dificultad para la obtención de muestras humanas de tejido nervioso limitaría este estudio, ya que se tiene que esperar hasta la muerte de los pacientes para obtener biopsias de distintas partes del cerebro, aunque es corriente utilizar modelos murinos para realizar estudios de este tipo. Además, se podrían realizar análisis por métodos ómicos para poder ver cuales de los sistemas neuronales ya descritos se ven afectados en

pacientes portadores de los alelos gris y premutado y con TEA. Estos incluirían sobretodo análisis proteómicos y metabolómicos.

- El presente estudio sugiere que sería posible durante el estudio clínico del paciente neurodivergente sospechar de una posible alteración del gen *FMR1* cuando se muestran rasgos de TEA o de trastornos del neurodesarrollo. Esto luego podría influir si los pacientes quieren tener descendencia, ya que gracias a las técnicas de reproducción in vitro se podría evitar la transmisión del alelo patológico y por tanto reducir el riesgo de la expansión al alelo mutado completamente. El FXS se mantiene a día de hoy como una patología sin cura, por lo que es necesario limitar los riesgos de transmisión para mantener o incluso mejorar al máximo las condiciones de vida de la población.

- This study confirms the association between the ASD and the FXAND (specially with the grey allele), although the pathophysiological mechanism is still unknown.

- One possible continuation of this study could be analysing the mRNA and FMRP levels from samples issued from this patients to confirm the relation between these and the length of the expansion (described in, (Loesch et al. 2007)). The main obstacle in this would be the securing of human nervous tissue samples because it is necessary to wait until the death of the patient, although the use of murine models has already been described. Also, other omics studies could be performed to see which neuronal systems are really affected in patients with ASD and carriers of the alleles of the study. This would include specially proteomics and metabolomics analysis.

- The present study suggests that it would be possible to directly suspect and alteration of the *FMR1* gene during the clinical study of a neurodivergent patient with ASD characteristics. This would be important if the patient wanted to have kids because the transmission or the expansion of pathological alleles can be avoided thanks to assisted reproduction technologies. The FXS syndrome still remains an incurable disease, so it is important to limit its transmission to maintain or even improve the living conditions of the people.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saldarriaga W, Carrera G, Tassone F, Yuriko González-Teshima L, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, et al. Fragile X Syndrome Síndrome de X Frágil. Vol. 45, Colombia Médica. 2014.
2. Tassone F, Long KP, Tong TH, Lo J, Gane LW, Berry-Kravis E, et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States [Internet]. 2012. Available from: <http://genomemedicine.com/content/4/12/100>
3. Lai A, Valdez-Sinon AN, Bassell GJ. Regulation of RNA granules by FMRP and implications for neurological diseases. Vol. 21, Traffic. Blackwell Munksgaard; 2020. p. 454–62.
4. Tabolacci E, Nobile V, Pucci C, Chiurazzi P. Mechanisms of the FMR1 Repeat Instability: How Does the CGG Sequence Expand? Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
5. Latham GJ, Coppinger J, Hadd AG, Nolin SL. The role of AGG interruptions in fragile X repeat expansions: A twenty-year perspective. Vol. 5, Frontiers in Genetics. Frontiers Research Foundation; 2014.



6. Madrigal I, Xunclà M, Tejada MI, Martínez F, Fernández-Carvajal I, Pérez-Jurado LA, et al. Intermediate FMR1 alleles and cognitive and/or behavioural phenotypes. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19(8):921–3.
7. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE, Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the Fragile X CGG Repeat in Females with Premutation or Intermediate Alleles. Vol. 72, *Am. J. Hum. Genet*. 2003.
8. Mor-Shaked H, Eiges R. Reevaluation of FMR1 hypermethylation timing in fragile X syndrome. Vol. 11, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2018.
9. Loesch DZ, Bui QM, Huggins RM, Mitchell RJ, Hagerman RJ, Tassone F. Transcript levels of the intermediate size or grey zone fragile X mental retardation 1 alleles are raised, and correlate with the number of CGG repeats. *J Med Genet*. 2007;44(3):200–4.
10. Sellier C, Buijsen RAM, He F, Natla S, Jung L, Tropel P, et al. Translation of Expanded CGG Repeats into FMRpolyG Is Pathogenic and May Contribute to Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron*. 2017;93(2):331–47.
11. Hall D, Tassone F, Klepitskaya O, Leehey M. Fragile X Associated Tremor ataxia syndrome in FMR1 gray zone allele carriers. Vol. 27, *Movement Disorders*. 2012. p. 297–301.
12. Oostra BA, Willemsen R. FMR1: A gene with three faces. Vol. 1790, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2009. p. 467–77.
13. Hagerman RJ, Protic D, Rajaratnam A, Salcedo-Arellano MJ, Aydin EY, Schneider A. Fragile X-Associated Neuropsychiatric Disorders (FXAND). Vol. 9, *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers Media S.A.; 2018.
14. Quartier A, Poquet H, Gilbert-Dussardier B, Rossi M, Casteleyn AS, Portes V Des, et al. Intragenic FMR1 disease-causing variants: A significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(4):423–31.
15. Santoro MR, Bray SM, Warren ST. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: A twenty-year perspective. Vol. 7, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2012. p. 219–45.
16. Richter JD, Zhao X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. Vol. 22, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Research; 2021. p. 209–22.
17. Bagni C, Zukin RS. A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. Vol. 101, *Neuron*. Cell Press; 2019. p. 1070–88.
18. Kurosaki T, Imamachi N, Pröschel C, Mitsutomi S, Nagao R, Akimitsu N, et al. Loss of the fragile X syndrome protein FMRP results in misregulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Cell Biol*. 2021;23(1):40–8.
19. Chyung E, LeBlanc HF, Fallon JR, Akins MR. Fragile X granules are a family of axonal ribonucleoprotein particles with circuit-dependent protein composition and mRNA cargos. *Journal of Comparative Neurology*. 2018;526(1):96–108.
20. Bartley CM, O’Keefe RA, Blice-Baum A, Mihailescu MR, Gong X, Miyares L, et al. Mammalian FMRP S499 is phosphorylated by CK2 and promotes secondary phosphorylation of FMRP. *eNeuro*. 2016;3(6).
21. Nalavadi VC, Muddashetty RS, Gross C, Bassell GJ. Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: A role in immediate early mGluR-stimulated translation. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(8):2582–7.

22. Khayachi A, Gwizdek C, Poupon G, Alcor D, Chafai M, Cassé F, et al. Sumoylation regulates FMRP-mediated dendritic spine elimination and maturation. *Nat Commun.* 2018;9(1).
23. Booker SA, Kind PC. Mechanisms regulating input-output function and plasticity of neurons in the absence of FMRP. Vol. 175, *Brain Research Bulletin.* Elsevier Inc.; 2021. p. 69–80.
24. Joo Y, Benavides DR. Local protein translation and rna processing of synaptic proteins in autism spectrum disorder. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2021. p. 1–14.
25. Deng PY, Klyachko VA. Channelopathies in fragile X syndrome. Vol. 22, *Nature Reviews Neuroscience.* Nature Research; 2021. p. 275–89.
26. Fyke W, Velinov M. Fmr1 and autism, an intriguing connection revisited. Vol. 12, *Genes.* MDPI; 2021.
27. Chidambaram SB, Rathipriya AG, Bolla SR, Bhat A, Ray B, Mahalakshmi AM, et al. Dendritic spines: Revisiting the physiological role. Vol. 92, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* Elsevier Inc.; 2019. p. 161–93.
28. Bagni C, Zukin RS. A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. Vol. 101, *Neuron.* Cell Press; 2019. p. 1070–88.
29. Tabet R, Moutin E, Becker JAJ, Heintz D, Fouillen L, Flatter E, et al. Fragile X mental retardation protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(26):E3619–28.
30. Lozano R, Hare EB, Hagerman RJ. Modulation of the GABAergic pathway for the treatment of fragile X syndrome. Vol. 10, *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* Dove Medical Press Ltd; 2014. p. 1769–79.
31. Van der Aa N, Kooy RF. GABAergic abnormalities in the fragile X syndrome. Vol. 24, *European Journal of Paediatric Neurology.* W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 100–4.
32. Fatemi SH, Folsom TD. GABA receptor subunit distribution and FMRP-mGluR5 signaling abnormalities in the cerebellum of subjects with schizophrenia, mood disorders, and autism. Vol. 167, *Schizophrenia Research.* Elsevier B.V.; 2015. p. 42–56.
33. Deng PY, Kumar A, Cavalli V, Klyachko VA. FMRP regulates GABAA receptor channel activity to control signal integration in hippocampal granule cells. *Cell Rep.* 2022;39(7).
34. Cao Y, Peng Y, Kong HE, Allen EG, Jin P. Metabolic Alterations in FMR1 Premutation Carriers. Vol. 7, *Frontiers in Molecular Biosciences.* Frontiers Media S.A.; 2020.
35. Wöhr M, Scattoni ML. Neurobiology of autism. Vol. 251, *Behavioural Brain Research.* 2013. p. 1–4.
36. Masini E, Loi E, Vega-Benedetti AF, Carta M, Doneddu G, Fadda R, et al. An overview of the main genetic, epigenetic and environmental factors involved in autism spectrum disorder focusing on synaptic activity. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2020. p. 1–22.
37. Zatkova M, Bakos J, Hodosy J, Ostatnikova D. Synapse alterations in autism: Review of animal model findings. Vol. 160, *Biomedical Papers.* PALACKY UNIV; 2016. p. 201–10.
38. Paquet A, Olliac B, Bouvard MP, Golse B, Vaivre-Douret L. The semiology of motor disorders in autism spectrum disorders as highlighted from a standardized neuro-psychomotor assessment. *Front Psychol.* 2016;7(SEP).

39. Stepniak B, Kästner A, Poggi G, Mitjans M, Begemann M, Hartmann A, et al. Accumulated common variants in the broader fragile X gene family modulate autistic phenotypes. *EMBO Mol Med.* 2015;7(12):1565–79.
40. LaSalle JM. X Chromosome Inactivation Timing is Not eXACT: Implications for Autism Spectrum Disorders. *Front Genet.* 2022;13.
41. Srikantha P, Hasan Mohajeri M. The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. *Int J Mol Sci.* 2019 May 1;20(9).
42. Hall DA. In the Gray Zone in the Fragile X Gene: What are the Key Unanswered Clinical and Biological Questions? 2014; Available from: <http://www.tremorjournal.org>
43. Martins AAS, Paiva GM, Matosinho CGR, Coser EM, Fonseca PA de S, Haase VG, et al. Working memory and arithmetic impairments in children with FMR1 premutation and gray zone alleles. *Dementia e Neuropsychologia.* 2022 Jan 1;16(1):105–14.
44. Klusek J, Porter A, Abbeduto L, Adayev T, Tassone F, Mailick MR, et al. Curvilinear association between language disfluency and FMR1 CGG repeat size across the normal, intermediate, and premutation range. *Front Genet.* 2018 Aug 24;9(AUG).
45. Raspa M, Wylie A, Wheeler AC, Kolacz J, Edwards A, Heilman K, et al. Sensory difficulties in children with an FMR1 premutation. *Front Genet.* 2018 Aug 28;9(AUG).

## 10. ANEXOS

Anexo 1 Dictamen favorable del CEICA (C.I PI23/008)



**Informe Dictamen Favorable  
Trabajos académicos**

C.I. PI23/008

8 de febrero de 2023

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 08/02/2023, Acta Nº 03/2023 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

**Título: Evaluación de la implicación de los alelos premutado (55-200 CGGs) y gris (45-54 CGGs) del gen FMR1 en el autismo.**

**Alumno: Juan Lerma Irureta**

**Tutora: Silvia Izquierdo Álvarez**

**Versión protocolo: Versión 2 01/02/2023**

**Se acepta la cesión de datos seudonimizados al alumno**

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la obtención de los permisos oportunos y el adecuado tratamiento de los datos, en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del proyecto.

Lo que firmo en Zaragoza

María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

### Anexo 2 Volúmenes necesarios de cada reactivo para la TP-PCR

PCR con cebadores repetidos (RP) CGG	
Componente	Volumen (µL)
Tampón de amplificación	11,5
Cebadores P1 y P3 del FMR1	0,50
Cebador P2 del FMR1	0,50
Diluyente	0,50
Mezcla de polimerasa	0,05
Muestra de ADN	2
Volumen total de la reacción	15,05

### Anexo 3 Programa del termociclador para llevar a cabo la PCR

PCR con cebadores repetidos (RP) CGG	
Descripción	Duración
Desnaturalización	95°C durante 5 minutos
10 ciclos	97°C durante 35 segundos
	62°C durante 35 segundos
	68°C durante 4 minutos
20 ciclos	97°C durante 35 segundos
	62°C durante 35 segundos
	68°C durante 4 minutos + 20 segundos/ciclo
Extensión	72°C durante 10 minutos
Pausa	4°C ∞