

Estudios sobre la población X-frágil en Aragón

Studies about the X-fragile population in
Aragón

Trabajo de fin de grado Biotecnología

Autor
Adrián Millán Laleona



Directores:
Miguel Pocoví Mieras
José Ignacio González Hevia

Año 2016

Índice

Resumen.....	Pág. 1
Introducción.....	Pág. 2
1. Historia.....	Pág. 2-3
2. Gen <i>FMR1</i>	Pág. 3-5
3. Proteína FMRP.....	Pág. 5- 6
Diagnóstico del Síndrome X frágil.....	Pág. 7-9
Hipótesis.....	Pág. 10
Objetivos.....	Pág.10-11
Materiales y métodos.....	Pág.12-13
Resultados.....	Pág. 13-17
Discusión.....	Pág. 17-23
Conclusiones.....	Pág. 23-24
Bibliografía.....	Pág. 25-26

Resumen:

La enfermedad conocida como síndrome X frágil es una de las causas más habituales de discapacidad intelectual y autismo en las sociedades modernas. Este síndrome afecta a la regulación de la transcripción del mRNA de la proteína FMRP en las neuronas, un elemento fundamental en el control de la expresión de otros genes. Actualmente su origen se desconoce y no hay tratamiento, por lo que el diagnóstico temprano juega un papel crucial para mejor calidad de vida de los individuos afectos. En este estudio se han analizado los casos del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza con alteraciones genéticas relacionadas con dicho síndrome. Se ha llevado a cabo una comparativa de la metodología empleada para su diagnóstico entre los años 2011 y 2015, así como un estudio en profundidad de un caso particular en el que no hay una correlación entre el genotipo característico del síndrome de X frágil y el fenotipo que cabría esperar. Además se ha realizado una investigación para intentar demostrar la relación de esta alteración genética con el polimorfismo C667T de la metil tetrahidrofolato reductasa (MTHR) como apuntan algunos estudios recientes (Ahmad Aleyasin et al.¹) pero sin llegar a resultados concluyentes.

Abstract:

The disease known as X fragil syndrome is one of the most common causes of mental disability and autism in modern societies. This syndrome affects to the regulation of the mRNA transcription of the FMRP protein in neurons, a very important element for the control of the expression of other genes. Nowadays its origin is unknown and there is not treatment so a quick diagnostic is essential for the quality of life of sick people. In this study we analyzed patients of the Miguel Servet hospital in Zaragoza with genetic alterations related to this syndrome. We did a comparison between the methodology used for the diagnostic since 2011 to 2015, as well as a deep study about a particular case that there isn't a relationship between the normal genotype of the X fragil Syndrome and its habitual phenotype. Besides we did an investigation to try to demonstrate a link of this genetic alteration with the C667T polymorphism of the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) following some recent investigations (Ahmad Aleyasin et al.¹) but without conclusive results.

Introducción

El síndrome X frágil es una de las patologías de componente genético más comunes ligadas a deficiencia mental, solamente superada por el síndrome de Down. Tiene una prevalencia de entre 1:4000 y 1:6000 casos en varones siendo hasta la mitad en el caso de las mujeres. Aproximadamente la relación de afectos es de 3:1 de hombres con respecto a mujeres ya que se trata de una patología ligada al cromosoma X. Los pacientes además de sufrir retraso mental de magnitud variable presentan un fenotípico muy característico con frente amplia y cara alargada, mentón pronunciado, grandes orejas separadas, varones con testículos grandes en edad adulta y macrocefalia entre otros.^{2,3}



Es producida por una mutación en el extremo distal del brazo largo del cromosoma Xq27.3 que afecta al gen *FMR1* codificante para la proteína FMRP.⁴ El defecto molecular que genera es un aumento en las repeticiones CGG en una región no codificante del gen. Esta patología segregá en forma dominante ligada al cromosoma X con penetrancia reducida. Además de esta alteración en la región rica en CpG los individuos afectos tienen asociada otra alteración a dicho locus, una metilación anormal. Esto desemboca en la inhibición de la expresión de la proteína citoplasmática FMRP.^{2,6}

Imagen 1. Niño con fenotipo característico del síndrome X frágil.

Fuente: Síndrome X frágil: Libro de consulta para familias y profesionales.⁵

Esta proteína se expresa de forma ubicua la mayoría de tejidos gracias a procesos de *splicing* alternativo pero su presencia se acentúa, entre otros, en neuronas, linfocitos y testículos.⁷ Es en las neuronas donde desempeña un papel fundamental como regulador específico de la traducción de otras proteínas. Se une selectivamente al mRNA, con el que se asocia para formar un complejo ribonucleoproteico, interviniendo y regulando su transporte hasta los polirribosomas donde se da la traducción. Este proceso se produce en la sinapsis, por lo que alteraciones en el proceso generan alteraciones a nivel cognitivo, principalmente en el aprendizaje.^{7,8}

La especificidad frente a distintos tipos de mRNA es variada, involucrando proteínas propias del citoesqueleto o de trasducción de señal, además de su propio mRNA de manera muy específica. Actúa como un regulador negativo mediante silenciamiento génico mediado por *dicer* y RISC aunque no se conoce de forma concisa el papel de FMRP1 en este proceso.⁷

1. Historia

El síndrome se empieza a conocer de la mano de *Martin y Bell* en 1943 tras una publicación que manifestaba la presencia en una familia donde se presentaban 11

casos de retraso mental en varones. Además presentaban un fenotipo característico de forma generalizada, lo que hacía pensar en una patología de carácter hereditario.

Más adelante en 1969 fue publicado un artículo del *Dr. H. Lubs* que trataba anomalías cromosómicas en unos hermanos que padecían de retraso mental. Esta anomalía se identificó como un estrechamiento de la zona distal del cromosoma X denominada como sitio frágil, lo que posteriormente dio nombre a esta enfermedad.^{9, 10}

Atendiendo a estas dos publicaciones se llegó a la conclusión de que debido a las similitudes entre los pacientes de ambos casos se trataba del mismo síndrome. La dificultad estaba en probar el hecho dadas las carencias en diagnóstico genético de la época.^{2, 6}

Con el paso del tiempo las técnicas de análisis genético mejoraron y a finales de los 70s se identificó el fragmento frágil del cromosoma X. Esto permitió observar que el porcentaje de células afectadas variaba. Se realizó el estudio de muchos pacientes y se dedujo que en rara ocasión se superaba el 50% de cromosomas con el estrechamiento y que en las mujeres se presentaba un menor porcentaje que en los varones.² En los 80s tras el descubrimiento de que la zona afectada era Xq27.3 gracias al desarrollo de técnicas de marcaje, se descubrió que siempre que había una mutación completa en un paciente su madre era portadora de pre mutación. Finalmente se propuso que la enfermedad era debido a alteraciones del marcaje de la región del cromosoma X.^{2, 10}

Tras mejoras progresivas en el desarrollo de sondas se identificó en 1991 el gen responsable del fallo genético y la expansión del triplete CGG en 5', una zona no codificante que era la causa del síndrome, lo que abrió grandes posibilidades al estudio en profundidad de la patología.²

Por otro lado, en los últimos años se han descrito otros fenotipos ligados a la alteración en este gen que presentan otras patologías relacionadas con el síndrome X frágil. Uno de ellos es el FXPOI (Fallo ovárico prematuro asociado al X frágil) en el que las mujeres que lo padecen sufren de hipogonadismo hipergonadotrópico y un cese prematuro de la ovulación.⁹ Otro es el FXTAS (Síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil) que aparece en la edad adulta, generalmente pasados los 50 años en el que se sufre un aumento descontrolado de los niveles de mRNA de *FMR1* y que genera problemas por ganancia de función.¹⁰ Actualmente debido a la relevancia de estas enfermedades ligadas a mutaciones en el gen *FMR1* sus diagnósticos son unas de las pruebas genéticas más habituales en el ámbito clínico.

2. Gen *FMR1*

El gen *FMR1* se localiza en f Xq27.3, es de una longitud de 38kb y contiene 17 exones de los cuales el 12, 14, 15 y 17 se ven afectados por *splicing* (15 y 17 para la elección de sitios aceptores). Cabe destacar la ausencia de caja TATAA y la longitud inusual del

primero de sus intrones de 9.9kb lo que supone casi un tercio de su longitud. Este tamaño hace pensar en su posible importancia en la regulación transcripcional. Otras características anormales del gen son las diferencias de tamaño entre los intrones y exones posicionados en los extremos con respecto a los más internos.¹¹

La repetición del trinucleotido CCG situado en 5' UTR de forma habitual se da entre 6 y 50 veces, algo que varía en función de los polimorfismos genéticos. En caso de darse pre mutación (PM), se dan entre 50 y 200 repeticiones del trinucleotido lo que sugiere una inestabilidad genética. En caso de mutación completa (FP) se da con 200 o más repeticiones, a veces junto a mosaicismo extenso y alteraciones en el patrón de metilación de la región, lo que imposibilita la transcripción del DNA.^{11, 12}

Este triplete CGG es muy inestable, además tiende a expandirse con el paso de generaciones por lo que una PM puede llegar a desembocar en FP en la descendencia. En individuos sanos se dan una serie de repeticiones del triplete AGG que interrumpen la repetición de CGG. Esta otra repetición se asocia con la estabilización de la región y en pacientes afectos de mutación completa están ausentes. El número de AGG es variable aunque en el estudio se ha visto una prevalencia entre 1 a 3 veces en individuos no afectos.¹²

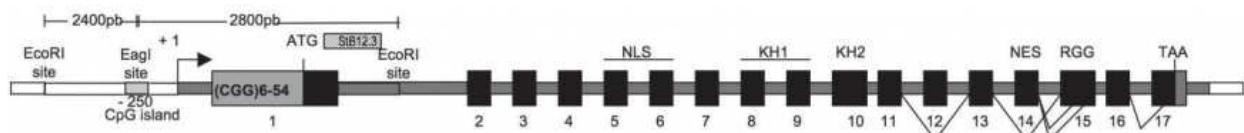


Fig1. Representación del gen FMR1 en estado normal, en gris oscuro se muestra la secuencia transcrita, la caja CpGn, el inicio de la transcripción, en color negro aparecen los 17 exones y los sitios de splicing alternativo. Fuente: Rousseau et al.¹³

Además de esta inestabilidad genética generada a pequeña escala se dan algunas posibles explicaciones al fenómeno de expansión de una generación a otra. Se cree que es debido a la formación de estructuras anómalas en horquilla en los fragmentos de Okazaki al replicar la zona rica en CGG. Otra hipótesis es la rotura de la doble hélice durante la replicación que produciría apareamientos erróneos generando la replicación incorrecta del triplete.⁴

El mRNA que codifica el gen actúa regulando su propia expresión hibridando con la región rica en CGG formando de esta forma un dúplex DNA/RNA por complementariedad, lo que inhibe la expresión del gen.¹¹ En el fenómeno dado en patología se produce la inhibición de su transcripción por la metilación anómala de dicha región (abarcando el promotor y parte del primer intrón), acompañada de hipacetilación asociada a histonas y condensación de la cromatina.¹⁴

La metilación del gen produce su silenciamiento, se impide la producción de la proteína FMRP y desemboca en el fenotipo de pacientes con X frágil. Se determinó su

estado de metilación de forma concisa empleando métodos de secuenciación en los que se analizaron todos los residuos de citosina de manera individual para demostrar que en pacientes afectos esta metilación se da en todos los CG del gen. Gracias a estudios de este tipo se cree que este proceso de inactivación es similar al ocurrido en las mujeres con uno de sus cromosomas X.¹⁵

Esta relación entre la expansión del triplete y la consecuente metilación no está del todo clara. Una posible explicación es debido a que la expansión impide la correcta transcripción del gen, se impide la formación del complejo necesario y el promotor del *FMR1* queda fuera siendo metilado. Otra hipótesis es la de que el incremento del triplete genera cambios a nivel de conformación de la cromatina que generaría esta metilación.¹⁵

3. Proteína: Función y estructura

La proteína citoplasmática FMRP codificada por el gen *FMR1* forma parte del complejo CYFIP1-EIF4E-FMR1 que se encarga de media el proceso de traducción por represión. Presenta gran similitud con otras proteínas relacionadas con el SXF como FXR2P, compartiendo entre sí los mismos dominios estructurales llegando tener una identidad en el 60% de sus aminoácidos. Estas otras proteínas no se expresan en cerebro y por tanto alteraciones en el *FMR1* en esta localización resultan en trastornos neurológicos propios del SXF.^{6, 7}

Dada su función de regulación de la traducción, contiene unas regiones de unión a RNA conocidas como dos dominios KH¹⁶ y un *cluster* de residuos de arginina y glicina conocido como caja RGG que le permiten unirse con hasta dos moléculas de este ácido nucleico. Además tiene otra región en el N-terminal también de unión a RNA pero no muy bien caracterizada.⁷

Esta caja RGG consiste en repeticiones Arg-Gly-Gly situada en el C-terminal. Está presente en otras proteínas relacionadas con el metabolismo del RNA además de en ciertas proteínas virales por su fuerte capacidad de unión. Por otro lado los motivos KH se encuentran muy conservados evolutivamente, teniendo como origen la secuencia VIGXXGXXI donde X es cualquier aminoácido con tendencia a los positivos.^{7, 16} Además de RNA en otras proteínas también pueden unir DNA. En cuanto a la región de unión de N-terminal no se conoce en detalle su funcionamiento pero se ha observado el reconocimiento de RNA de manera inespecífica e interacciones con otras proteínas.⁷

Tiene capacidad de unión a muchos mRNA de proteínas estimulada por el receptor metabotrópico de glutamato tipo I (mGluR), pero de forma muy concisa al suyo propio para auto regular su expresión. Los motivos de unión presentes hacen que sea una proteína de unión específica a ciertas regiones del mRNA, concretamente a horquillas con un cuarteto de guaninas que es habitual en el reconocimiento de otras proteínas

neuronales como la semaforina (proteína de membrana asociada al crecimiento de axones) o MAP1B (asociada a formación micro túbulos).

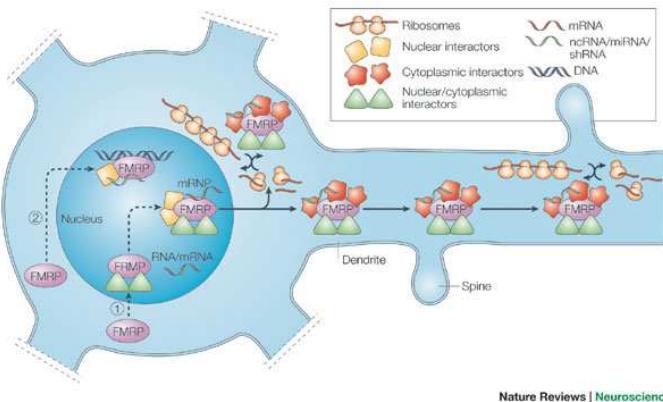


Fig2. Funcionamiento especulativo de FMRP en las dendritas. Fuente: Claudia Bagni et al.¹⁷

En el desarrollo fetal se encuentra asociada a tejido ectodérmico y gónadas, siendo mayoritaria en testículos y cerebro. En edad adulta aparece en grandes niveles en las neuronas y en menor medida en otras células del sistema nervioso como oligodendrocitos o células de la glía. Dada la ausencia de anomalías asociadas al SXF en el feto se considera que no es una de las proteínas fundamentales en el desarrollo embrionario del sistema nervioso.²

Mediante experimentación con ratones *KO FMR1* se cree que esta proteína inhibe mRNA relacionados con la internalización de los receptores transmembrana AMPA, los más abundantes en el sistema nervioso que median la transmisión sináptica rápida. Además se encontró en estos ratones la correlación entre el número de receptores AMPA y la presencia de protuberancias en ciertas partes del cerebro como las encontradas en algunos pacientes con SXF.⁴

El tipo de inhibición que se da es por interferencia, un mecanismo de gran antigüedad con la finalidad de eliminar RNA viral y regulación de expresión. Para ello se necesita la proteína *dicer* que elimina el RNA extraño de doble hebra y el complejo *RISC* que emplea secuencias obtenidas de la degradación producida por *dicer* para localizar de manera específica otras de estas moléculas extrañas y eliminarlas también. En este modelo se aplica al RNA de las proteínas que son reguladas por FMRP⁴

Diagnóstico genético del síndrome X frágil (SXF):

El estudio del gen *FMR1* se debe realizar en pacientes con sospecha clínica de padecer el síndrome de X Frágil (SXF) los cuales deben presentar una cierta deficiencia intelectual considerada cuando el CI (Coeficiente intelectual) está por debajo de 70 o la presencia de rasgos autistas, en ambos casos sin que tengan un origen determinado. Además de estos rasgos se deben realizar en caso de que presente problemas de aprendizaje o de habla, hiperactividad, déficit de atención y rasgos faciales característicos de pacientes con SXF.

El análisis genético está actualmente basado en pruebas de tipo reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un análisis en electroforesis capilar que ha sustituido al *Southern Blot* en los últimos años. En primer lugar se hace la extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico (DNA) de una muestra de sangre periférica mediante *EZ1 Advanced BioRobot*, un equipo automatizado. Se usa un kit comercial para la obtención de una concentración aproximada comprendida en el rango de 40-80 ng/ μ L de DNA para el posterior análisis mediante TP-PCR (Triple Repeat PCR).

Esta TP-PCR está basada en el uso de 3 *primers*, además del *forward* y *reverse* se emplea uno más específico a la región Citosina-Guanina-Guanina (CGGn). Es necesario para evitar la formación de *hairpins* de alta complejidad en la amplificación que dificultan la desnaturización posterior. Además de esta forma se puede saber el número de repeticiones del triplete estabilizante Adenina-Guanina-Guanina (AGG), muy importante para valorar el fenómeno de expansión en alelos con pre mutaciones.

Tras la reacción de PCR se debe preparar la muestra para la electroforesis capilar. Se lleva a cabo una desnaturización del producto de PCR obtenido y una vez desnaturizadas las muestras se hace el análisis de datos en el equipo *ABI 3130* y software *GeneMapper 4.0* para la obtención de los *Raw Data*.^{10, 18}

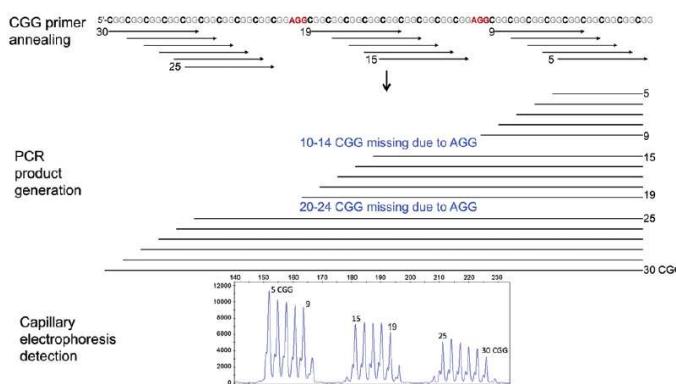


Fig3. Representación del proceso de PCR con uso de tres cebadores y el posterior análisis por electroforesis capilar. Fuente: Chen L. et al.¹⁹

Una vez hecha la primera discriminación en función del número de repeticiones y expansión del triplete CGG se continúa con el estudio del porcentaje de metilación del gen en casos de pre mutación, mutación completa o mosaicismo.

En primer lugar se hace un duplicado de la muestra. En uno de los *eppendorf* se lleva a cabo una reacción de digestión enzimática con uso de *HpaII* de corte C^ACGG²⁰ para obtener solamente los alelos metilados ya que el resto es degradado, mientras que el duplicado servirá de control sin adición de enzima de restricción.^{11, 21}

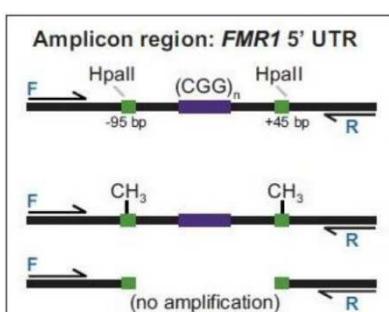


Fig4. Corte de la DNasa *HpaII* sensible a metilación. Fuente Grasso et al.2014.²²

A continuación se hace la reacción de PCR para la amplificación de la región del *FMR1* con uso de *dye primers*²³, usando *FAM primers* para la amplificación del control y *HEX primers* para la reacción de digestión.²⁴ Esta PCR está basada en dos coloraciones distintas (HEX y PAM) que permiten la detección de todas las repeticiones CGG en los alelos y su longitud. Para el análisis mediante electroforesis capilar será necesario un proceso de desnaturización de las muestras.^{24, 25} Tras su desnaturización y preparación se analizan en el equipo *ABI 3130xl* con el software *GeneMapper 4.0*.

En este caso se puede dar la saturación del polímero usado en la electroforesis capilar, superando así el umbral de análisis del equipo por lo que se da una migración independiente a la relación masa/carga del producto de PCR analizado. Esto hace que no se conozca el número de repeticiones exactas del triplete CGG expandido en los casos de mutación completa, *full mutation* (FM), siendo su resolución máxima en torno a 200 repeticiones.

Para el diagnóstico basado en *Southern- Blot* se parte de la misma muestra que para la anterior técnica, DNA de células sanguíneas extraído y purificado mediante el uso de *EZ1 Advanced BioRobot* con su correspondiente kit comercial. A partir de esta muestra se realizan los procesos de digestión enzimática oportunos, en este caso con el uso de *EcoRI* (G^AAATTG) además del enzima *EagI* (C^AGGCCG) sensible a la metilación de su secuencia de reconocimiento.²⁰

Se continúa con un proceso de electroforesis para una posterior desnaturización y transferencia a membrana de nitrocelulosa por capilaridad. A continuación se retira dicha membrana para ponerla en contacto con sondas específicas marcadas como *StB12.3* y *pfxa* para regiones de interés del gen *FMR1*. De esta manera se detectan fragmentos de distinto tamaño que determina si hay metilación de la expansión del triplete. En caso de no cortar *EagI* y proporcionará un fragmento de 5,2 kb pero si no hay metilación se obtiene un fragmento de 2,8 Kb.

Por lo tanto si no se dan dos cortes enzimáticos (*EagI* y *EcoRI*) se obtiene un fragmento de 5,2kb mientras que si cortan ambas aparecerá un fragmento de 2,8kb. De este modo, la presencia de bandas con tamaño superior a 5.2kb o 2.8kb indica la presencia de alelos pre-mutados o con mutación completa

En definitiva se obtienen datos de la presencia del gen homólogo a la sonda, en este caso el gen *FMR1*, el número de fragmentos con homología y su tamaño.

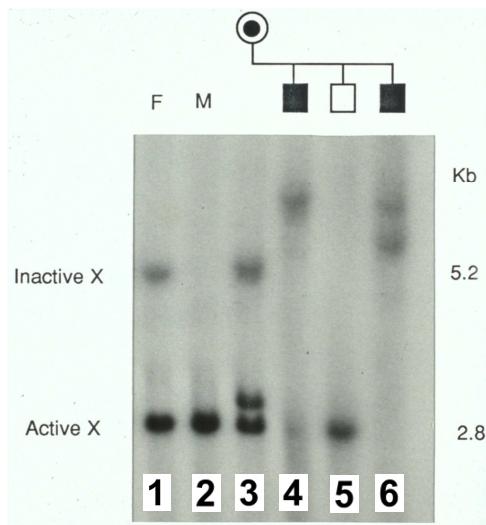


Fig5. Ejemplo de Southern-Blot de diferentes muestras. Los carriles 1,2 y 5 son muestras normales, 4 y 6 mutación completa y 3 pre mutación. Fuente: Elizabeth Berry-Kravis²⁶

Hipótesis:

Se aborda la identificación de pacientes con un fenotipo característico del SXF con discapacidad intelectual, comportamientos autistas y ciertos rasgos físicos como macrocefalia, orejas grandes y mentón pronunciado entre otros. Se identifican así los casos con alteraciones en el gen *FMR1* tanto a nivel estructural, con la expansión incontrolada del triplete CGG en su 5' UTR, como a nivel epigenético con la modificación de los patrones de metilación así como la presencia de regiones estabilizantes de tipo AGG. Con su análisis se hace un estudio demostrativo que establece una correlación directa entre estos rasgos genotípicos y fenotípicos.

Por otro lado se trata de dar una explicación específica a uno de los casos derivados del estudio de familiares de un paciente con una mutación completa (<200 CGG en el gen *FMR1*). No se da dicha correlación por lo que se ha centrado una investigación más específica para dar una explicación razonable a este caso tan particular.

Además se trata de establecer alguna relación entre el fenotipo de pacientes con el síndrome X frágil y el polimorfismo genético C667T en el gen de la metil tetrahidrofolato reductasa. Alteraciones en este enzima se creen significativas en patologías asociadas a trastornos neuronales tales como Alzheimer (Jorge I. Castillo-Quan et al. 2008²⁷) o Parkinson (Martínez Laura, et al; 2003²⁸) por lo que se ha intentado demostrar también la relación con el X frágil como algunos estudios apuntan (Ahmad Aleyasin et al.¹).

Objetivos:

- El principal propósito es el diagnóstico del SXF en muestras de pacientes atendidos en la Comunidad Autónoma Aragón con sospecha clínica de X frágil que presenten características tales como discapacidad intelectual con IC menor de 70, cuadros de autismo acompañados de rasgos físicos tales como orejas grandes y despegadas o cara alargada de frente amplia entre otros². El estudio genético para esta alteración está enfocado no solo a pacientes con sintomatología de SXF sino también a familiares de casos confirmados o pacientes que requieren de un asesoramiento genético con finalidad reproductiva.
- Establecer diferencias significativas en cuanto a la metodología empleada para el diagnóstico de estos casos entre el *Southern-Blot* y el basado en TP-PCR. Es por ello que esta parte del estudio se centra en la comparativa de ambas técnicas en base a los resultados diagnósticos del SXF estudiados.

- Profundiza en el análisis de este síndrome a nivel molecular y la relación entre sus alteraciones y el fenotipo presentado. Es en este punto donde realiza el estudio particular de un caso problema de gran interés científico, en el que la correlación entre el genotipo y fenotipo no sigue las pautas del resto de casos observados.
- El establecimiento de una relación entre la mutación del gen *FMR1* y el polimorfismo genético C667T de la metil tetrahidrofolato reductasa (MTHR) como apuntan algunos autores en estudios recientes (Ahmad Aleyasi et al. 2012¹). Se estudia la presencia de un patrón significativo entre los rasgos fenotípicos de casos confirmados con alteraciones del gen *FMR1* (Pre mutados, mutados completos y mosaicos) y dicho polimorfismo.

Materiales y métodos:

Se han empleado muestras de DNA de sangre periférica procedentes de pacientes con sospecha de padecer SXF, derivados de estudios familiares de individuos afectos y/o asesoramiento genético de carácter reproductivo.

La extracción de DNA se realiza mediante el uso del *EZ1 Advanced BioRobot*.

Proporciona muestras purificadas con uso de tecnología basada en el uso de partículas magnéticas en la que el DNA genómico se adhiere selectivamente a una serie de partículas cargadas. Para ello es necesario el kit comercial *EZ1 DNA Investigator* con el que se obtienen volúmenes de 100-200 µL de muestra con una concentración de 40-80 ng/µL.

La determinación del número de tripletes CGG del *FMR1* se realiza con el kit *Amplidex FMR1 PCR* de la casa comercial *Asuragen™*. Se realiza una TP-PCR con cebadores repetidos además de un tercero complementario a la región de repeticiones del triplete dicho gen (Mix en *Anexo I*).

Tras la reacción de PCR (Protocolo en *Anexo I*) se prepara la muestra para la electroforesis capilar. Se desnaturaliza el producto de PCR obtenido (Protocolo en *Anexo I*) y una vez desnaturalizadas las muestras se hace el análisis de datos en el equipo *ABI 3130xl* y software *GeneMapper 4.0*.²¹

En caso de alteración genética se emplea el Kit *AmplideX FMR1 mPCR de Asuragen™* para determinar el porcentaje de metilación de los alelos. Se basa en el uso del enzima de restricción *HpaII* de corte C⁺GG (Protocolo en *Anexo II*) sensible a metilación. Degrada todo el DNA no metilado para luego hacer una comparativa con respecto a una muestra control.

Tras la digestión se realiza la PCR para la amplificación de la región del *FMR1* con uso de dye primers⁹, usando FAM primers para el control y HEX primers para la muestra tratada con enzima de restricción (Protocolo en *Anexo II*).

Para el análisis mediante electroforesis capilar será necesario un proceso de preparación con uso de ROX 1000 (marcador de tamaño específico para el análisis de fragmentos) y desnaturización de las muestras (Ver protocolo en *Anexo I*) con formamida. Tras la desnaturización se analizan las muestras en *ABI 3130xl* y software *GeneMapper 4.0*.²⁴

Por otro lado, el análisis del polimorfismo C677T de la MTHR está basado en la técnica de PCR y análisis en electroforesis capilar. Se realiza con el kit *Elucigene TRP-F* con el uso del secuenciador *ABI 3130* y software *GeneMapper 4.0*.

Por otro lado, el análisis del polimorfismo C677T de la MTHR se realiza con el kit *Elucigene TRP-F* con el uso del secuenciador *ABI 3130xl* y software *GeneMapper 4.0*.

Este kit proporciona la mix ya preparada para la reacción de PCR a la que solamente habrá que añadir el DNA del paciente en estudio que permite la amplificación (Ver protocolo en Anexo II). Tras la reacción de PCR (Ver protocolo en Anexo II) se preparan las muestras para el análisis por electroforesis capilar para lo cual se procede a la desnaturización con el empleo de una mix de *GeneScan® 500 LIZ™ size standard* (marcador de tamaño específico) y *Hi-Di Formamida* (Protocolo en Anexo III). Finalmente se obtienen las muestras listas para el análisis mediante el equipo ABI 3130xl y software *GeneMapper 4.0*.

Resultados:

Mediante el análisis genético de pacientes con sospecha clínica de presentar una sintomatología semejante al síndrome X frágil, FXTAS o FXPOI se ha recopilado la siguiente tabla informativa de la situación aquellos casos en los que se ha obtenido un resultado de mutación completa (FM), pre-mutación (PM) o mosaicismo (PM/FM) entre los años 2011 y 2015.

Nº Paciente	Sexo	Edad al diagnóstico	Mutación <i>FMR1</i>	Repeticiones CGGs	Metilación (%)
1	M	33	PM/FM	94±3/322±10	0/100
2	F	57	PM	30±1/79±3	39/100
3	F	2	PM	59/29	No analizado
4	M	2	FM	>250	100
5	M	37	FM	>200	100
6	F	32	FM	27/>200	0/100
7	F	53	PM	30/94	0/34
8	F	78	PM	21/84	No analizado
9	F	18	PM/FM	30/126/>200	0/0/100
10	F	46	PM/FM	54/84/125/>200	No analizado
11	M	4	FM	>200	100
12	M	4	FM	>200	100
13	F	28	PM	29/86	No analizado
14	F	50	PM	33/87	No analizado
15	F	45	PM	32/85	No analizado
16	M	49	PM	107	No analizado
17	F	9	FM	30/>200	100
18	F	9	FM	20>200	100
19	F	13	FM	30/>200	100
20	M	6	FM	>250	100
21	M	9	PM/FM	101/200	No analizado
22	F	39	PM	30/89	No analizado
23	F	35	PM/FM	34/69/112/239	No analizado
24	F	4	PM	31±1/68±3/94±3	34/100/100
25	M	8	FM	322±10	100
26	F	26	PM	29±1/94±3	0/100
27	M	58	PM	78±3	No analizado
28	F	17	FM	29±1/325±10	51/86
29	F	51	PM	29±1/126±5/180±5	58/100/0

30	M	31	PM/FM	153/203/>200	100/0/0
31	M	10	FM	>200	100

Tabla1. Se representan los datos de los pacientes estudiados, su sexo, edad en la que se realizó el análisis del FMR1, tipo de mutación, nº de repeticiones del triplete CGG en los distintos alelos y el % de metilación.

No se ha podido obtener la misma información en todos los casos en cuanto al número de repeticiones del triplete AGG ni el Pm obtenido para los picos dados por la electroforesis capilar. Esto se debe a que no todos los análisis se han realizado mediante técnicas de TP-PCR, algunos de ellos se basan en *Southern-Blot* y además no se presenta la información de forma homogénea en los casos de mayor antigüedad. En concreto los casos diagnosticados por TP-PCR 1,2 y del 23 al 31, el resto mediante *Southern-Blot*.

A partir de la recuperación de las muestras de DNA (mantención y almacenamiento en cámara de frío a -20ºC) de la totalidad de pacientes presentados en la *Tabla1* (A excepción de los casos 10 ,30 y 31) se realizó el estudio del polimorfismo C677T del gen metil tetrahidrofolato reductasa (MTHFR):

Nº Paciente	Polimorfismo C667T	Nº Paciente	Polimorfismo C667T
1	Portador	17	Portador
2	Normal	18	Normal
3	Normal	19	Normal
4	Portador	20	Normal
5	Portador	21	Portador
6	Normal	22	Portador
7	Portador	23	Portador
8	Normal	24	Portador
9	Normal	25	Normal
10	No analizado	26	Portador
11	Portador	27	Portador
12	Normal	28	Normal
13	Normal	29	Normal
14	Normal	30	No analizado
15	Normal	31	No analizado
16	Normal		

Tabla2. Resumen del análisis por PCR del polimorfismo C667T del gen de la MTHR en los pacientes confirmados de padecer alteraciones en el gen FMR1

Con este análisis no se encontró ningún caso de homocigosis para el polimorfismo estudiado, solamente pacientes portadores. Cabe destacar la ausencia de resultado en los pacientes 10, 30 y 31 debido a la carencia de DNA en el momento del análisis.

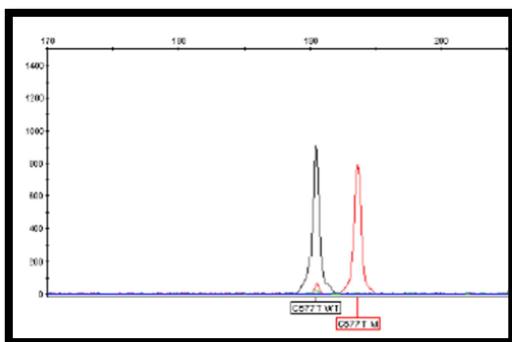


Fig6. Fragmentos de PCR como picos en el Raw Data del electroferograma. En rojo la mutación C677T y en negro el wildtype C677T. Este caso es un ejemplo de portador del polimorfismo.

*Los procedimientos llevados a cabo en este estudio han sido los de los casos 29, 28, 27 y 23 además de la totalidad de análisis del polimorfismo C667T. El resto de datos se han obtenido de los registros del equipo de electroforesis capilar ABI 3130, diagnósticos diferenciales y almacenes de datos propios a la patología X frágil del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

Estudio de un caso particular problemático:

Durante la realización del estudio del caso índice nº31 se detectaron varios casos de la patología en la familia, tanto de portadores de la pre-mutación como de afectos y transmisores con mutación completa. De esta manera se identificó, en los familiares bajo estudio, la presencia de pre mutación en la tía del caso índice (Paciente Nº7) a la

edad de 53 años con un alelo de 94 repeticiones y un 63% de metilación. Es en el análisis genético de uno de su hijo, el paciente Nº30, donde se dan unos resultados anómalos.

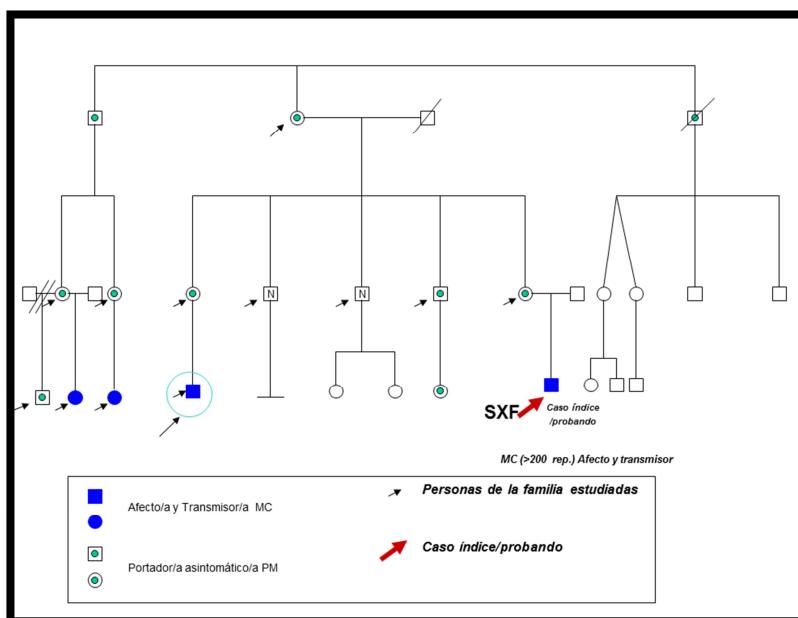


Fig7. Árbol genealógico del paciente nº31 índice en estudio

Se realizó el análisis genético en el paciente asintomático Nº 30 para el X frágil basada en PCR con análisis de electroforesis capilar con uso del software *GeneMapper 4.0* a la edad de 31 años. Se comprobó que el paciente presentaba un caso de mosaicismo con 3 alelos diferenciales de 153, 203 y >200 repeticiones CGG.

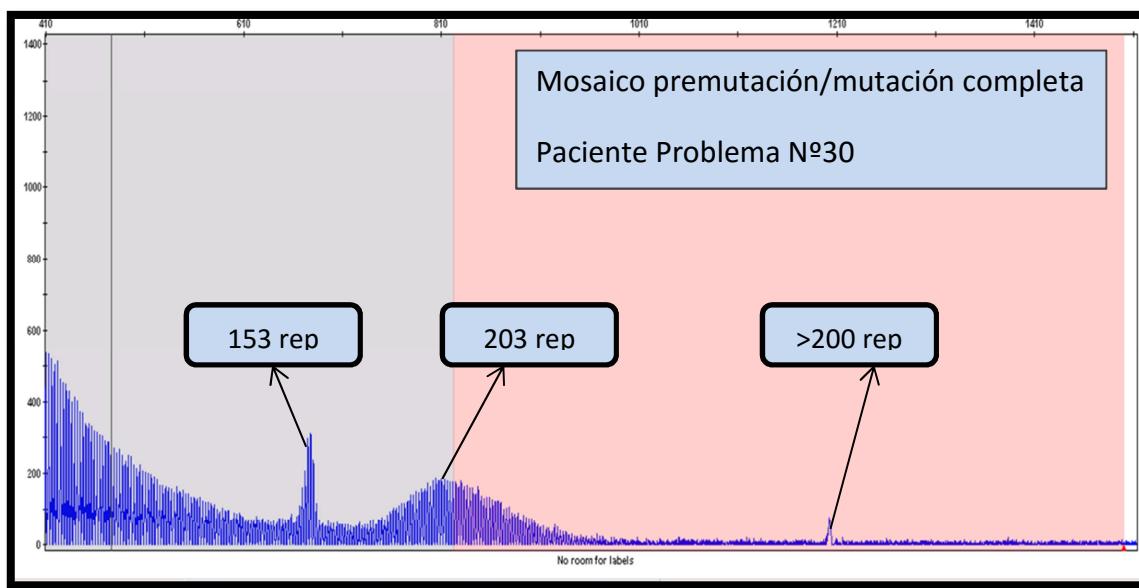


Fig8. Resultado de las repeticiones del triplete CGG por del kit Amplidex FMR1 PCR de las dadas en el paciente en estudio.

Al darse estos datos que confirmaban el mosaicismo, se continuó con el estudio del grado de metilación que presentaban estos alelos obteniéndose el siguiente resultado:

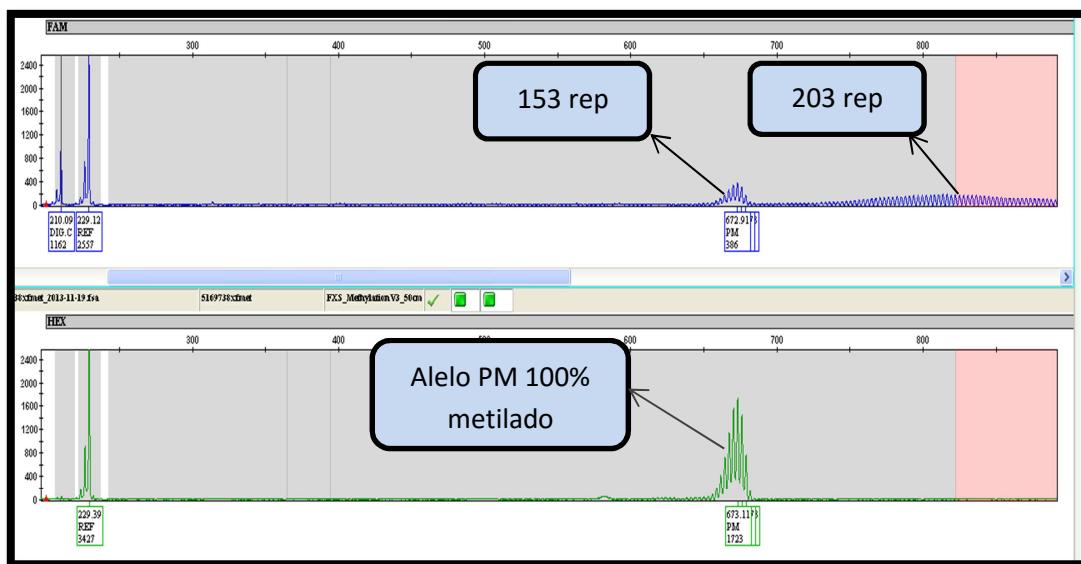


Fig9. Resultados obtenidos del análisis por el Kit AmplideX FMR1 mPCR.

Analizando estos datos en mayor profundidad se comprobó el grado de metilación del resto de alelos, obteniéndose unos resultados poco esperados:

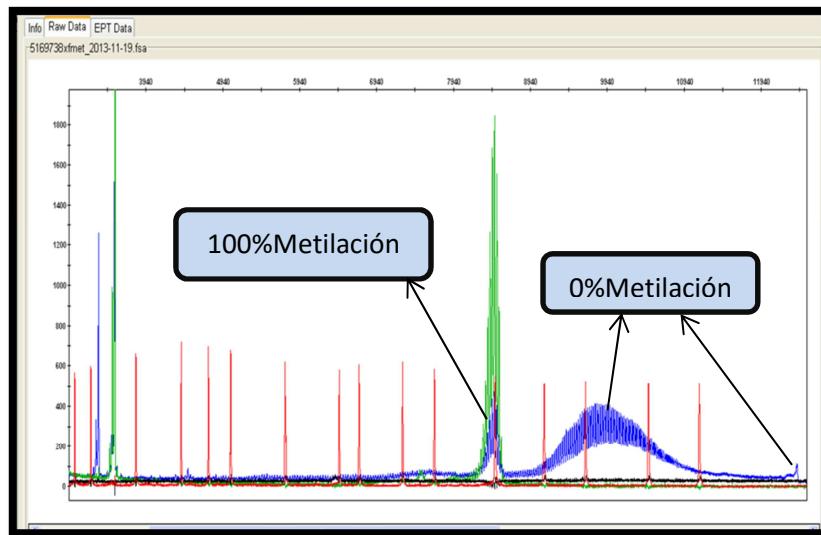


Fig10. Representación del % de metilación dado en el caso de 152, 203 y >200 repeticiones CGG en los alelos que presenta el paciente.

El porcentaje de metilación obtenido es del 100% en el alelo pre mutado de 152 repeticiones CGG, de 0% en el que se encuentra en la franja entre pre mutado y mutado completo de 203 repeticiones así como el mutado completo de >200 repeticiones.

Discusión:

El estudio del síndrome del X frágil en los laboratorios de diagnóstico genético ha evolucionado con la implementación de nuevas técnicas basadas en la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Ha permitido en los últimos años llegar a realizar un diagnóstico diferencial, preciso y con alta fiabilidad diagnóstica en muestras de DNA de sangre periférica en pacientes.

Además permite ampliar su uso a muestras de DNA de diferentes muestras primarias, como vellosidad corial, líquido amniótico, sangre impregnada en cartón-papel de filtro, etc., tras validación previa de la técnica. Actualmente el método basado en TP-PCR (Triplet Repeat Repeat-PCR) se puede emplear para el diagnóstico de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* en muestras de DNA extraído de sangre en papel de filtro, de gran utilidad en recién nacidos con sospecha clínica. También permite la determinación del número de repeticiones del triplete CGG del gen *FMR1* en biopsias de vellosidades coriales. En este último caso, no se puede realizar un análisis en cuanto al porcentaje de metilación ya que es un proceso no establecido en las fases tempranas de gestación. Si presenta expansión del triplete CGG, es decir mutado completo, sea varón o mujer se le ofrece a la gestante y a su pareja la interrupción voluntaria del embarazo (IVE) antes de la 14 semana de gestación. Pero si se confirma

mediante estudio en muestras de vellosidad corial no hay que hacer seguimiento y hacer amniocentesis.²⁹

También hay que tener en cuenta la rapidez de la técnica de PCR lo que permite dar un diagnóstico diferencial en tan solo 24-48 horas, algo fundamental en casos de individuos prenatales y recién nacidos. El análisis mediante *Southern-Blot* requiere de más tiempo por el uso de tiempos de restricción enzimáticos y necesidad de trasferencia de los ácidos nucleicos a filtros. Esto lo hace un proceso laborioso y por tanto es necesaria la presencia de personal más especializado para llevar a cabo la técnica. También hay que tener en cuenta la característica de poder automatizar el proceso gracias a la presencia de kits comerciales propios de la técnica basada en PCR.

Otro aspecto a destacar es la posibilidad de determinar el número de repeticiones del triplete Adenina-Guanina-Guanina (AGG), mediante TP-PCR, que no es viable con las otras técnicas anteriormente mencionadas como al PCR convencional y el *Southern-Blot*. Estas repeticiones del triplete AGG se encuentran de manera intercalada en las repeticiones del triplete del gen *FMR1* y proporciona estabilidad a la zona. Esto se traduce en la minimización de los característicos episodios de expansión del triplete, lo que permite dar cierta idea de la expansión del triplete en las siguientes generaciones. Es un aspecto fundamental en casos en los que se detecta concretamente un número de repeticiones del triplete CGG en el rango de la pre mutación (50-200 repeticiones CGG) ya que se debe hacer un seguimiento por la posibilidad de poder desarrollar tanto FXTAS (Síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil), en varones y mujeres,

como FXPOI (Fallo ovárico prematuro asociado al X frágil) en mujeres.

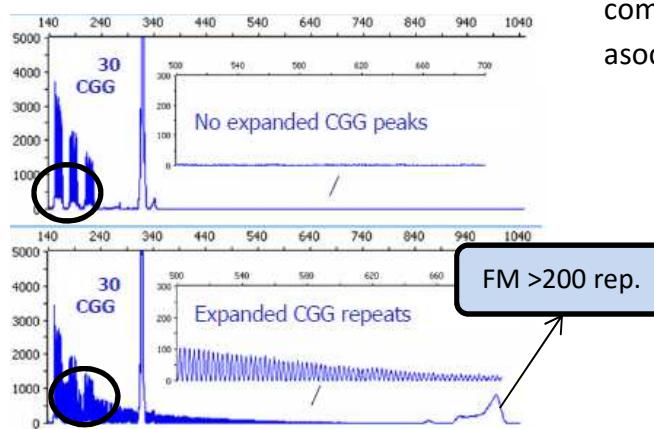


Fig11. Representación de los resultados obtenidos en casos de expansión del triplete CGG y no expansión con representación de AGG en forma de valles señalados y que en ambos casos se dan 2 repeticiones.
Imagen original modificada, fuente: Asuragen²⁶

Todas estas ventajas frente al método tradicional basado en *Southern-Blot* permiten un diagnóstico de mayor calidad tanto para el especialista que lleva a cabo la técnica como para el paciente. La rapidez en la obtención de los resultados es algo fundamental en el ámbito hospitalario por la importancia para la aplicación de medidas específicas o de un tratamiento temprano de forma individual.

Este tipo de análisis basado en TP-PCR y electroforesis capilar es el usado actualmente en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y es la base molecular para la confirmación de la sospecha clínica del Síndrome X frágil (SXf). Mediante el uso de esta

técnica se realizó la identificación de las alteraciones en el gen *FMR1* en el caso problema Nº30.

Este paciente presenta una de las anormalidades más extrañas en cuanto al SXF. Es un caso excepcional en el que un paciente con alteraciones genéticas confirmadas tanto en el número de repeticiones CGG del gen *FMR1* como en el porcentaje de metilación de sus alelos no se correlacionan con un fenotipo clásico de pacientes con un genotipo similar.

Su origen fue el estudio familiar del caso índice nº 31 en el que según los criterios de diagnóstico establecidos se deben tomar y analizar muestras de todos aquellos familiares cercanos con riesgo y/o sospecha de tener alguna alteración relacionada con el SXF.

En el estudio del árbol genealógico de esta familia (*Ver Fig7.*) se observa la "paradoja de Sherman". Es un fenómeno típico en esta patología por el tipo de herencia ligada al cromosoma X y la inestabilidad generada con el aumento de repeticiones en el 5' UTR del gen *FMR1*. Su manifestación es debida a la presencia de un patrón de herencia dominante con penetrancia reducida en mujeres, riesgo de transmisión de la enfermedad que aumenta en las sucesivas generaciones y en el caso de los varones pre-mutados transmiten la alteración a todas sus hijas.³⁰

Se han encontrado 12 familiares adicionales al caso índice con alteraciones ligadas a la expansión del triplete CGG, ya sea en forma de pre-mutaciones como mutaciones completas en el gen *FMR1*. En primer lugar se ve como a partir de pacientes con la pre mutación se deriva tras dos generaciones a casos con la presencia de alelos del *FMR1* con mutaciones completas, concretamente 4 de sus nietos. En segunda lugar, el único varón testado con descendencia cumple el hecho de transmisión de la pre-mutación a su hija. Por último se aprecia una mayoría en los casos de pre mutación en mujeres (todas las mujeres son portadoras de alteraciones) pero tan solo dos de ellas presentan la mutación completa. Además, si se hace la comparativa con respecto a los varones con alguna alteración asociada al SXF se aprecia que la mitad de ellos portan la mutación completa.

Para el caso problema Nº30 se determina por tanto que el origen de sus alteraciones genéticas reside su madre. Esta paciente presenta un alelo del gen *FMR1* de 94 repeticiones CGG y 63% metilado aunque se trata de una portadora asintomática. A pesar de que de forma habitual hubiera existido una probabilidad del 50% de heredar el alelo del *FMR1* con la alteración de la madre, en este caso el patrón se ha dado un fenómeno de mosaicismo con tres alelos posibles y con distintos porcentajes de metilación. Esto es un indicio más de la expansión generacional de la enfermedad en las familias afectadas.

El mosaicismo desvela la presencia de tres alelos de 152, 203 y >250 repeticiones CGG en la región 5'UTR del gen *FMR1*. El principal rasgo destacable son los porcentajes de metilación ya que de manera habitual se suelen obtener grandes valores en los alelos con mutación completa mientras que en este caso este fenómeno se manifiesta en el alelo pre mutado de unas 152 repeticiones con un 100% de metilación y 0% en el resto de los alelos.

La falta de información en cuanto a una mayor o menor prevalencia de estos alelos impide establecer una hipótesis sólida sobre la presencia mayoritaria de uno de ellos. Si se atiende a la ausencia de fenotipo patológico se puede suponer que la proteína FMRP tiene un correcto funcionamiento y por lo tanto su expresión debe presentarse a niveles aceptables. Es por ello que el alelo pre mutado no puede ser mayoritario. Esto se debe a que a pesar de no darse un número excesivamente alto de repeticiones, al estar totalmente metilado la expresión del mRNA está inhibida y por tanto no codificaría para la proteína FMRP. De ser el mayoritario manifestaría los rasgos habituales de un paciente con SXF.

Por otro lado, el alelo con la mutación completa como mayoritario podría ser una opción factible. Al no estar metilado podría expresar un mRNA funcional y por tanto llegar a dar FMRP activa lo que explicaría la ausencia de sintomatología. A pesar de ello, si se atiende a la gráfica de la *Fig8* se puede observar su pico del *Raw Data* en el análisis por electroforesis capilar es bastante bajo con respecto a los otros dos presentes. Por ello se podría llegar a descartar como el presentado de manera mayoritaria aunque podría ser una opción factible.

La hipótesis de mayor probabilidad es la presencia mayoritaria del alelo encontrado entre la franja de pre-mutación y mutación completa que, a pesar de contar con 203 repeticiones del triplete CGG, se da un porcentaje de metilación nulo. Esto permite la expresión de la proteína sin verse alterada la regulación de su gen a nivel epigenético. También cabe destacar el pico mayoritario de este alelo durante el análisis por lo que en principio se consideraría como el de mayor prevalencia.

Otra posible explicación sería la alteración del *splicing* alternativo en el tejido cerebral. La presencia de otras proteínas con alto grado de similitud estructural a FMRP como FXR2P con funciones similares en otros tejidos puede explicar que, a pesar de no expresarse en cerebro, la alteración en este paciente podría conllevar a unos niveles de expresión que enmiednan la ausencia de FMRP. Dada la negativa del paciente Nº30 a la continuación del estudio de su caso, no se han podido llevar a cabo análisis a nivel de transcriptoma ni proteoma que clarifiquen hipótesis relacionadas con la alteración directamente relacionada con la expresión proteica. Estos estudios se podrían realizar con muestras de sangre periférica y en este caso se tendría en cuenta el DNA de células sanguíneas, en las que la expresión de esta proteína difiere con respecto a la del tejido cerebral por fenómenos de *splicing* alternativo.

Si se atiende a la propia naturaleza del fenómeno de mosaicismo, su determinación mediante el uso de este tipo de células es indicativo pero no representativo de la situación real dada en otros grupos celulares como las neuronas. Por este mismo motivo también se desconoce si se ha dado el fenómeno de “mosaico de metilación”, un fenómeno poco habitual en el que el porcentaje de metilación de la expansión varía entre células⁹. Esta situación se da con mayor frecuencia en alelos portadores de una mutación completa pero con un número de repeticiones CGG próximo al de la situación de pre mutación, como es el caso del alelo con 203 repeticiones del caso problema.

A pesar de todo ello, este tipo de análisis proporcionaría información de importancia en cuanto a la expresión anómala de FMRP o de proteínas análogas así como a la correcta regulación epigenética e incluso alteraciones en *splicing*. Para el estudio de los niveles y estructura de FMRP en el tejido cerebral, donde se origina el problema del X frágil, se deberían realizar análisis inmunohistoquímicos. En concreto se necesitaría una muestra procedente de un biopsia *post mortem* del cerebelo del paciente, lo que impide un análisis a corto plazo.

En cuanto al seguimiento del caso desde un punto de vista clínico también es difícil evaluar su situación. Dado el mosaicismo de 3 posibles alelos con distintas características, el desconocimiento del que se presenta de forma mayoritaria y la ausencia de sintomatología no se puede conocer con exactitud si llegará a desarrollarse el síndrome de ataxia/temblor asociado a X frágil (FXTAS). El patrón de expansión es el propio de una mutación completa como se observa en la *Fig8* aunque la hipótesis de mayor probabilidad apoya a una presencia mayoritaria del alelo en la franja entre mutado completo y pre mutado de unas 203 repeticiones.

El FXTAS está causado por una expansión del triplete CGGn en los casos de pre mutación en el gen *FMR1*. La gravedad de su clínica tiene correlación directa con la extensión de la expansión CGG y se caracteriza por parkinsonismo leve y manifestaciones psiquiátricas tales como depresión, ansiedad o agitación³¹ los cuales no se han identificado en la actualidad en el caso Nº30. Dado que aparece en edad adulta en pacientes en torno a los 45 o 50 años no se puede hacer un asesoramiento oportuno de forma inmediata.

Tampoco hay información suficiente para la determinación del patrón de transmisión de estos alelos a su descendencia. Una vez más la falta de información en cuanto a la prevalencia de un alelo mayoritario impide predecir de forma exacta la forma de herencia del gen, si bien siempre sus hijos varones serán sanos y las hijas podrían presentar clínica o no.

Por otro lado, en el estudio de la relación entre el polimorfismo C667T de la metilen tetrahidrofolato reductada (MTHFR) se han encontrado, *a priori*, resultados de interés.

Se puede observar como hay una correlación entre todos los casos de mosaicismo para el SXF analizados y el hecho de ser portadores del polimorfismo. Teniendo en cuenta todos los pacientes con alteraciones en el gen *FMR1* analizados, el 43% de ellos han resultado ser heterocigotos para el C677T aunque en ningún caso se ha dado homocigosis.

El ácido fólico es muy importante en el correcto desarrollo del sistema nervioso central ya que muchos de sus derivados presentan funciones como en la síntesis de neurotransmisores o mediando procesos de metilación. La alteración en el enzima MTHR afecta directamente a su actividad, reduciéndose en presencia de homocigosis un 50% y en heterocigosis hasta un 30% la capacidad de donar grupos metilo a la enzima metionina sintetasa. Este efecto se manifiesta con la disminución de la velocidad de conversión de homocisteína hacia metionina, generando así su aumento. Además esta sustitución de citosina por timina en la posición 667 hace que varíe la traducción del aminoácido alanina a valina, produciéndose, desde un punto de vista estructural, una variante del enzima termolábil.³²

Si se tienen en cuenta algunas de las funciones de la MTHR se puede deducir que habrá un impacto directo sobre la síntesis de purinas y pirimidinas, en el metabolismo de la metionina, serina, glicina e histidina y para la formación de agentes de metilación necesarios para la regulación génica y del metabolismo en general. La MTHR actúa de forma directa en la conversión del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato que a su vez, actúa de cosustrato para la remetilación de la homocisteína a metionina. Además las alteraciones en la funcionalidad de este enzima se consideran como factor de riesgo para otras enfermedades neurológicas tales como el Alzheimer (Jorge I. Castillo-Quan et al. 2008³⁰), el Parkinson (Martínez Laura et al. 2003²⁹) y cuadros autistas. Si se atiende a la alteración epigenética que padecen los pacientes de X frágil en el gen *FMR1*, la relación con otras enfermedades neurológicas y los resultados obtenidos en este estudio para casos de mosaicismo, cabe sospechar una posible correlación.

En los casos de mosaicismo en los pacientes 1, 11, 21 y 23 en los que se da el polimorfismo no se han encontrado grandes rasgos distintivos comunes que justifiquen la alteración de sus fenotipos característicos de X frágil, por lo que no se ha podido demostrar esta supuesta relación. No hay correlación en cuanto al número de alelos posibles, las repeticiones AGG en este caso no son del todo representativas ya que al darse alelos con la mutación completa es habitual su ausencia. En estos casos se carece de dicho triplete a excepción del caso 23 en el que se presenta solamente una repetición.

Hay que tener en cuenta el desconocimiento de la prevalencia del alelo en cada caso con la mutación completa o la pre-mutación en cuanto al gen *FMR1* lo que añade cierta dificultad a la búsqueda de un fenotipo común inesperado.

No se han podido analizar los niveles del enzima MTHR por lo que tampoco se sabe con total exactitud la afección del polimorfismo con la correcta actividad enzimática en estos casos puntuales. Se debe tener en cuenta que no se da homocigosis en ninguno de los análisis por lo que la posibilidad de darse la variante enzimática alterada que difiera en un grado significativo en su función es relativamente baja. Esta mutación puntual por sí sola es relativamente común en la población mediterránea y no se considera patológica por sí sola. Son necesarias alteraciones puntuales adicionales en el enzima para asociarse a otras enfermedades como la hiperhomocisteinemia o trombofilia.

Además desde un punto de vista estadístico no se pueden llegar a tener en cuenta estos datos por tener una N=4 dentro de un análisis de tan solo 28 muestras, un valor demasiado pequeño. Para estudiar esta situación tan concreta haría falta un mayor volumen de datos con los cuales establecer un análisis sin tanto sesgo. El problema en este punto es que los casos de X frágil cursados con mosaicismo son relativamente escasos y por tanto su recopilación es fundamental para estudios de este tipo.

Conclusiones:

Tras la valoración de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La mejora significativa del diagnóstico del SXF con el uso de TP-PCR frente a la técnica *Southern-Blot*. Este avance se da a nivel resolutivo y de precisión además de la reducción de coste del análisis, personal requerido y a nivel de tiempo invertido en la técnica. Es fundamental destacar también la fiabilidad del análisis en cuanto al porcentaje de metilación de los alelos estudiados debido al impacto directo que tiene sobre la regulación de la expresión de la proteína FMRP.
- En el caso problema Nº30 estudiado no hay una correspondencia entre fenotipo y genotipo como indican que las repeticiones CGG situadas en el gen FMR1 pueden ser responsables en parte de esta anormalidad.
- El porcentaje de metilación de sus alelos, el número de repeticiones del triplete CGG en el gen FMR1 y la ausencia de fenotipo asociado al SXF determina que el alelo mayoritario presente es el que presenta >250 repeticiones.
- Al haber mosaicismo nos ha sido imposible determinar con precisión dicha presencia mayoritaria en el tejido cerebral, ya que el análisis genético se ha llevado a cabo en DNA de muestras sanguíneas. Para poder confirmar nuestros resultados con total seguridad se requeriría de una biopsia post mortem del cerebelo para poder realizar estudios inmunohistoquímicos.



- No se ha podido establecer una relación inequívoca entre el SXF y la presencia del polimorfismo C667T del enzima MTHFR en los casos bajo estudio. No se ha encontrado rasgos fenotípicos comunes ni tampoco correlación genotípica asociada al gen *FMR1*. Para poder establecer una relación causal se requeriría un mayor número de casos dada la poca frecuencia del fenómeno de mosaicismo en pacientes de SXF.

Bibliografía:

1. Ahmad Aleyasin, Mojgan Mirakhori "Association of the MTHFR C677T polymorphism and fragile X syndrome in an Iranian population" *Neuro. Asia.* 2012; 17(4): 347–352
2. Omim.org #300624 X Fragil (Fecha de consulta 10-04-2016)
3. Ribate Molina MP, Pié Juste J, Ramos Fuentes FJ, "Síndrome de X Frágil. *Protoc. Diag. Pediatr.* 2010; 1:85-90.
4. P.Chiurazzi, G. Neri. "Experimental therapy: reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X síndrome" *Rev Neurol.* 2001; 33: 62-S 65
5. www.cedd.net Centro Español de Documentación sobre Discapacidad, del Real Patronato sobre Discapacidad "SÍNDROME X FRÁGIL: Libro de consulta para familias y profesionales." (Fecha de consulta 13-04-2016)
6. Uniprot.org Q06787 FMR1_HUMAN (Fecha de consulta 23-02-2016)
7. Zalfa, Francesca, and Claudia Bagni. "Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the fragile X mental retardation protein?" *Curr. Issues Mol. Biol.* 2004; 6: 73-88
8. Proteinatlas.org (Fecha de consulta 12-03-2016)
9. Sherman, Stephanie L., et al. "Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI)." *J. Neurodevelop. Disord.* 2014; 6(1): 26.
10. Sellier, Chantal, et al. "The multiple molecular facets of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome." *J Neurodev Disord.* 2014; 6(1): 23.
11. Eichler, Evan E., et al. "Fine structure of the human FMR1 gene." *Human molec. Genet.* 1993; 2.8: 1147-1153.
12. Latham, Gary J. et al. "The Role of AGG Interruptions in Fragile X Repeat Expansions: A Twenty-Year Perspective." *Frontiers in Genet.* (2014); 5: 244.
13. Rousseau et al. "The fragile x mental retardation syndrome 20 years after the FMR1 gene discovery: an expanding universe of knowledge." *Clin Biochem Rev.* 2011; 32(3): 135–162.
14. Brasa, Sarah, et al. "Reciprocal changes in DNA methylation and hydroxymethylation and a broad repressive epigenetic switch characterize FMR1 transcriptional silencing in fragile X syndrome." *Clin Epigenetics.* 2016; 8: 15.
15. Virginia G. Bañares "Últimos avances en el síndrome de fragilidad del cromosoma X" *Rev. Med.* 1995; 55: 457-466
16. Valverde Roberto et al. "Structure and function of KH domains." *FEBS journal.* 2008: 2712-2726.
17. Claudia Bagni & William T. Greenough "From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X síndrome" *Nature Reviews.* 2005; 6: 376-387.

18. Diana Carolina Gutierrez Grosso. "Relación entre la expresión citogenética del sitio fraxa (xq 27.3) con la expresión clínica, y el número de repeticiones CGG del gen fmr1 por dos técnicas moleculares, en familias colombianas con miembros afectados con el síndrome del x frágil" Tesis/trabajos de grado 2014. Univ. Nacional De Colombia.
19. Chen L. et al. "An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis." *J Mol Diagn.* 2010; 12(5):589-600.
20. rebase.neb.com (Fecha de consulta 3-06-2016)
21. Asuragen.com (Fecha de consulta 20-05-2016) Instrucciones de uso Kit AmplideXTM FMR1 PCR.
22. Grasso M et al. "A Novel Methylation PCR that Offers Standardized Determination of FMR1 Methylation and CGG Repeat Length without Southern Blot Analysis." *J Mol Diagn.* 2014; 16(1): 23-31.
23. Trower, M K et al. "Fluorescent Dye-Primer Cycle Sequencing Using Unpurified PCR Products as Templates; Development of a Protocol Amenable to High-Throughput DNA Sequencing." *Nucleic Acids Res.* 1995 Jun 25; 23(12): 2348-2349.
24. Asuragen.com (Fecha de consulta 20-05-2016) Instrucciones de uso Kit AmplideXTM FMR1 mPCR-CE
25. Chen, Liangjing, et al. "High-resolution methylation polymerase chain reaction for fragile X analysis: evidence for novel FMR1 methylation patterns undetected in Southern blot analyses." *Genet. in Medicine.* 2011; 13: 528-538.
26. www.nsgc.org Elizabeth Berry-Kravis MD, PhD "Breakthrough Research in Fragile X Carrier Testing: AGG Interruptions and Modification of Expansion Risk" (Fecha de consulta 2-06-2016)
27. Jorge I. Castillo-Quan et al. "La enfermedad de Alzheimer y los polimorfismos del gen metilenotetrahidrofolato reductasa: una potencial aproximación nutrigenómica en México." *Gac Méd Méx.* 2009; 2: 146-150.
28. Martínez Laura E. et al. "Niveles séricos de homocisteina en enfermedad de Parkinson" *Rev Mex Neuroci.* 2003; 4(6): 413-418.
29. Monaghan KG1, Lyon E, Spector EB. "ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics" 2013 Jul; 15(7): 575-86
30. R. Palencia, J. J. Tellería "Síndrome del cromosoma X frágil. Revisión del problema" *Bol. Pediatr.* 1997; 37: 3-8.
31. www.orpha.net (Fecha de consulta: 10-06-2016)
32. B Sánchez-Marín et al. "Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation among patients with acute ischemic cerebrovascular disease in Aragón" *An Med Interna.* 2006 Apr; 23(4): 153-5