

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA – FACULTAD DE MEDICINA UDELAR

# Fenotipos de trastornos asociados a premutaciones del gen FMR1

---

Tesis de Maestría - Pedeciba Biología  
Subárea: Genética

Lic. Natalia Pi Denis

Orientadora: Dra. Leda Roche



# **AGRADECIMIENTOS**

***En primer lugar quiero agradecer a mi familia.***

*Por el apoyo incondicional y por enseñarme a dar lo mejor de mí siempre.*

***A mi orientadora Leda Roche.***

*Porque me abrió las puertas de su laboratorio, me transmitió sus enseñanzas en el presente trabajo.*

***Al tribunal.***

*Por el tiempo dedicado en la corrección y evaluación del presente trabajo.*

***A Lucía Pastro por comenzar este trabajo conmigo, por sus consejos y enseñanzas en todo este camino realizado. Por su amistad.***

***A todos mis compañeros del Departamento de Genética.***

*Especialmente a Carlos Pintos por su ayuda con los informes de los pacientes y por su amistad. Y a los compañeros de Citogenética y en especial a Jorge, Gaby, Seba y Vanina por su ayuda incondicional cada vez que los necesite.*

***A las “Chicas” de la Unidad Académica de la Licenciatura en Biología Humana.***

*Por hacerme el aguante y apoyarme*

***A los Dres Maria Boidi, Alejandra Tapié y Víctor Raggio de la Policlínica de Genética del CHPR y los Dres Ignacio Amorin, Andrés Lescano y Ricardo Buzó del Instituto de Neurología del Hospital de Clínicas por el trabajo en equipo.***

***A el Laboratorio de Inmunogenética e Histocompatibilidad del Instituto Nacional de Donación y Trasplante del Hospital de Clínicas especialmente a Prof. Dra. Milka Bengochea y a Doris por abrirnos las puertas de su laboratorio y la disponibilidad para usar sus equipos.***

***A todos los compañeros del LOBBM.***

*Por el trabajo de laboratorio compartido*

***A PeDeCiBa, CSIC y Roemmers.***

*Por las financiación recibida para desarrollar el presente trabajo.*

***A la Asociación de Familiares con Síndrome X Frágil del Uruguay y en particular a su presidenta Daniela Sniadower***

***A todas las Familias y pacientes que participaron de este trabajo.***

***A mis tres amores Pedro, Sofía y Florencia.***

## ***ABREVIATURAS***

CI	Coeficiente Intelectual
DI	Discapacidad Intelectual
EC	Electroforesis Capilar
FE	Funcionamiento ejecutivo
FXTAS	Síndrome de temblor y ataxia asociado al X frágil
FOP	Falla ovárica Precoz
FMR1	Gen del Síndrome de X frágil ( <b>F</b> ragile X <b>M</b> ental <b>R</b> etardation gene <b>1</b> )
FMRP	Proteína del Síndrome de X-frágil ( <b>F</b> ragile X <b>M</b> ental <b>R</b> etardation Protein)
MC	Mutación completa
NL	Normal (alelos normales)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Premutación
SXF	Síndrome de X Frágil
SB	Southern Blot
TEA	Trastornos del espectro autista
TDAH	Trastorno de déficit atencional e hiperactividad
TP-PCR	Triplet-primed PCR

## *Tabla de contenido*

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>Síndrome de X Frágil</b>	<b>7</b>
Antecedentes	7
<b>Tipo de herencia que presenta el SXF y los fenotipos de premutados.</b>	<b>8</b>
<b>Antecedentes del grupo de Trabajo</b>	<b>9</b>
<b>Gen FMR1</b>	<b>10</b>
<b>Alelos del gen FMR1</b>	<b>11</b>
Alelo normal	11
Alelos intermedios	12
Alelos premutados	12
Alelos con Mutación Completa	13
Estabilidad alélica de los repetidos CGG.	13
<b>Proteína FMRP</b>	<b>16</b>
Localización, estructura y expresión	16
<b>Trastornos asociados a los alelos premutados.</b>	<b>17</b>
Síndrome de temblor / ataxia asociado al X-frágil. (FXTAS)	19
Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad. (TDAH)	20
Trastornos del Espectro Autista (TEA)	21
Falla Ovárica Precoz (FOP)	22
<b>Diagnóstico Molecular</b>	<b>22</b>
Recomendación para los test de diagnósticos de FMR1	22
Herramientas diagnosticas para determinar el número de repetidos CGG	23
Determinación del número de repeticiones mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)	24
Triplet Repeat Primed PCR (TP-PCR)	26

Estado de Metilación _____	28
<b>OBJETIVO GENERAL _____</b>	<b>30</b>
Objetivos específicos: _____	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS _____</b>	<b>31</b>
Diseño Metodológico para determinar el número de repetidos CCG en varones. _	31
Diseño Metodológico para determinar el número de repetidos CCG en mujeres. _	32
<b>Pacientes estudiados: _____</b>	<b>33</b>
Población 1: Niños con DI, malformaciones y /o dismorfias con alteraciones conductuales. _____	33
Población 2: Pacientes mujeres y varones mayores de 50 años con temblor y ataxias. ____	34
Población 3:a) Familias de pacientes con resultado molecular positivo para la mutación y/o premutación del FMR1. b) Pacientes con sospecha Clínica SXF y trastornos neuroconductuales que se asocian a la premutación tales como TEA, TDAH. _____	34
<b>Extracción de ADN _____</b>	<b>35</b>
<b>Determinación del número de repetidos CGG en el gen FMR1. _____</b>	<b>35</b>
PCR con taq polimerasa platinum (invitrogen) que determina el rango de 5 a 70 repetidos CGG _____	35
PCR realizado con el kit Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics) que determina el rango de 5 a 100 repetidos CGG _____	37
PCR con tres 3 primers (C/F/CGG) que amplifica en el rango 5 a 200 repetidos CGG con el kit Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics) _____	38
<b>Secuenciación _____</b>	<b>40</b>
<b>RESULTADOS _____</b>	<b>42</b>
<b>Población 1: Niños con DI, malformaciones y /o dismorfias con alteraciones conductuales. _____</b>	<b>42</b>
<b>Población 2: Pacientes mujeres y varones mayores de 50 años con temblor y ataxias. _____</b>	<b>47</b>

Población 3 a) Familias de pacientes con resultado molecular positivo para la mutación y/o premutación del FMR1.	51
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>64</b>
Optimización de métodos para la determinación del número de repetidos en la región 5' del gen FMR1	64
Correlación genotipo-fenotipo en las poblaciones estudiadas	67
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
Conclusión General	74
Conclusiones específicas.	74
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO</b>	<b>82</b>

## RESUMEN

Se estima que entre 1-3% de la población mundial presenta discapacidad intelectual, siendo el síndrome de X frágil, la causa más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria en varones y la principal enfermedad monogénica asociada al autismo. Este síndrome tiene una incidencia de 1 en 4000 varones y 1 en 6000 mujeres y es causado por la expansión de una secuencia repetida CGG en la región 5'UTR del exón1 del gen FMR1, localizado en el cromosoma X. El número de repetidos CGG es altamente polimórfico en la población y se clasifican en diferentes variantes alélicas: i) Alelos normales entre 6 y 44 repetidos; ii) Alelos intermedios entre 45 y 54 repetidos iii) Alelos premutados entre 55 y 200 repetidos y iv) Alelos con mutación completa, más de 200 repetidos. En el presente trabajo analizamos tres poblaciones con características fenotípicas asociadas a la premutación y/o mutación completa del gen FMR1: a) Pacientes con temblor y ataxia; b) Pacientes con discapacidad intelectual y dismorfias; c) Pacientes con trastornos de aprendizaje, y neuroconductuales y d) Familiares de pacientes con síndrome de X frágil. El número de repetidos CGG se determinó mediante un primer PCR de *screening*, que permite discriminar a los varones normales y mujeres heterocigotas normales y premutadas de bajo rango de repetidos. Para determinar expansiones mayores se realizó el Triplet-primed PCR y electroforesis capilar. En el 95% de los pacientes, se logró determinar el número de repetidos CGG utilizando este método rápido, reproducible y sencillo. Además, en las familias estudiadas, se pudo determinar la estabilidad de los alelos CGG a través de la descendencia. Finalmente, se realizó el diagnóstico y el asesoramiento genético en los pacientes estudiados.

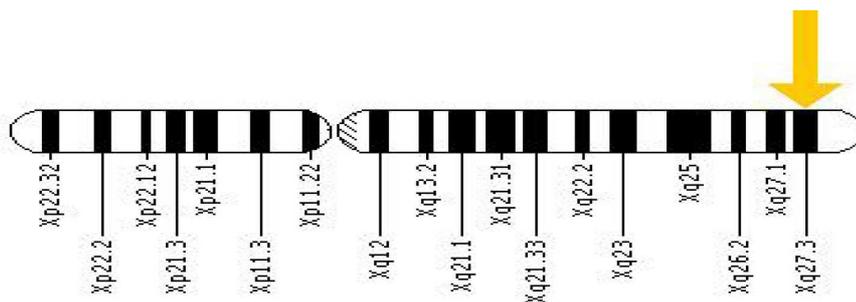
# INTRODUCCIÓN

## Síndrome de X Frágil

### *Antecedentes*

Se estima que entre 1-3% de la población mundial presenta discapacidad intelectual (DI)<sup>1</sup>, siendo el síndrome de X frágil (SXF) la causa más frecuente de DI hereditaria en varones y la principal enfermedad monogénica asociada a autismo<sup>2</sup>. Tiene una incidencia de 1 en 4000 varones y 1 en 6000 mujeres<sup>3</sup>. Los pacientes afectados tienen DI moderada a severa, alteraciones morfológicas características tales como cara alargada, pabellones auriculares grandes, macroorquidismo pospuberal y alteraciones conductuales como déficit atencional, hiperactividad, impulsividad y rasgos autistas<sup>4</sup>. Sin embargo, un 30% de los casos no presentan los rasgos fenotípicos clásicos ni historia familiar de DI, manifestándose como retraso del lenguaje o Trastorno de déficit atencional con hiperactividad (TDAH) y sin hiperactividad, lo que dificulta y retrasa el diagnóstico<sup>5</sup>.

En 1991 se identificó el gen involucrado en el SXF, FMR1 (Fragile X Mental Retardation gene 1), localizado en el cromosoma X en la región Xq27.3 (**figura 1**) la mutación es consecuencia de la expansión de una secuencia repetida CGG en la región no traducida 5'UTR<sup>6</sup>.



**Figura 1:** Idiograma del cromosoma X indicando el lugar físico donde se ubica el gen FMR1 Xq27.3.

El número de repetidos es altamente polimórfico en la población y sus variantes se pueden clasificar en: i) Alelos normales, el número de repetidos CGG varía entre 6 y 44; ii) Alelos premutados, el número de repetidos varía entre 55 y 200, iii) Alelos con mutación completa, tienen más de 200 repeticiones, este alto número de repetidos se asocia con la metilación de la isla CpG ubicada en la región 5' del gen *FMR1* lo que reprime su transcripción y resulta en la ausencia de la proteína codificada por FMR1 (FMRP)<sup>7</sup> Y por último, los alelos intermedios o en la “zona gris” entre 45-54 repeticiones, se propone que son los precursores de los alelos premutados, y generarían los alelos inestables en la descendencia durante la meiosis<sup>8</sup>.

En el año 2001 Hagermann, P *et al*<sup>8</sup> observaron que las expansiones entre 55 y 200 repetidos CGG del gen FMR1 o premutaciones, (que se consideraban asintomáticas), producen otros trastornos que se producen por mecanismos diferentes a la patología molecular del SXF<sup>8</sup>. Estos trastornos y su mecanismo molecular se describirán en profundidad más adelante en este trabajo.

### **Tipo de herencia que presenta el SXF.**

Este síndrome presenta una herencia ligada al cromosoma X dominante con penetrancia incompleta en las mujeres. Cuando el padre es el portador de una mutación completa o premutación, la totalidad de sus hijas serán portadoras, y sus hijos varones sanos. En cambio si una mujer es portadora de una mutación completa o premutación, el 50% de sus hijos varones heredarán el cromosoma X mutado y pueden desarrollar DI, o si heredan el alelo premutado pueden desarrollar FXTAS o TDAH. El otro 50% heredará el alelo sano. Respecto a las hijas, el 50% serán portadoras de una mutación completa o premutación y pueden desarrollar los fenotipos descritos para los varones y también Falla Ovárica Precoz (FOP) y el otro 50% de las hijas serán sanas no portadoras<sup>9</sup>.

## Antecedentes del grupo de Trabajo

En el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR se inició la implementación de un laboratorio de diagnóstico molecular en el año 1994, orientado a patologías neuropsiquiátricas causadas por expansión de tripletas. La primera patología abordada fue el SXF, desarrollándose en primera instancia el diagnóstico por Southern Blot y posteriormente por PCR. Un tiempo después se implementó el diagnóstico para Distrofia miotónica (DM) o enfermedad de Steinert y de la Distrofia óculofaríngea (DOF), en colaboración con el grupo de afecciones neuromusculares del instituto de Neurología, se realizaron estudios de correlación clínico-molecular para ambas afecciones y se determinó un efecto fundador en la DOF<sup>10</sup>. De esta manera se constituyó el grupo de estudio de enfermedades por repetición de tripletas (EXT). En 1996 se llevó a cabo el primer programa de tamiz selectivo del SXF en una población de pacientes con DI de escuelas especiales. Se inició con la evaluación clínica de los pacientes y la aplicación del protocolo desarrollado por Giangreco *et al*<sup>11</sup>. Luego se desarrolló un estudio de tamiz “screening” al resto de sus familiares y asesoramiento genético. Algunos resultados de este trabajo fueron la determinación de los porcentajes de pacientes con mutación completa de 6,5% (8/123) en los varones y de 4,1% (2/49) en las niñas. (Datos no publicados de María Mirta Rodríguez y Dolores García-Arocena). Se realizó el asesoramiento genético a los familiares de los pacientes diagnosticados (8 con mutación completa y 6 portadores de una premutación). Se usó la técnica de Southern blot con la sonda StB 12.3 después de una doble digestión con *EcoRI* y *EagI* para identificar portadores de premutación o de mutación completa<sup>71</sup>.

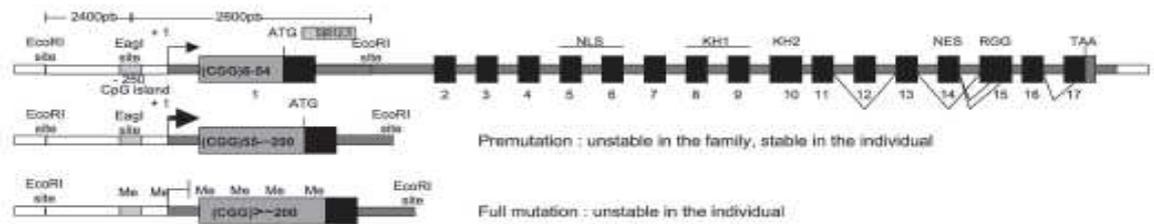
En el año 2000 se implementó el diagnóstico inmunohistoquímico para la proteína FRMP en bulbos pilosos que permite determinar la proteína codificada por FMR1. Este método no invasivo y económico se realizó en aquellos pacientes cuyo puntaje en el protocolo de Giangreco fue superior o igual a 5. En el año 2011 se implementó la puesta a punto de la técnica de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) para la determinar el número de repetidos CGG en el gen FMR1, y se dejó la técnica inmunohistoquímica. Utilizando esta técnica permitió eliminar subjetividad, y ofrecer

un diagnóstico certero del grado de patogenicidad de la enfermedad, ya que puede discriminarse los individuos normales, con premutación o dentro de la zona gris.

En la actualidad son pocos los centros de referencia a nivel regional que diagnostican SXF por esta técnica ya que este tipo de PCR larga es muy compleja de realizar. Esta tesis se enmarca dentro del desarrollo biotecnológico que se está llevando a cabo actualmente en el departamento de Genética.

## Gen FMR1

El gen FMR1 es altamente conservado y está localizado en el cromosoma X (Xq 27.3). Mide 38 kb y tiene 17 exones que codifican para la proteína FMRP como se muestra en la **figura 2**.

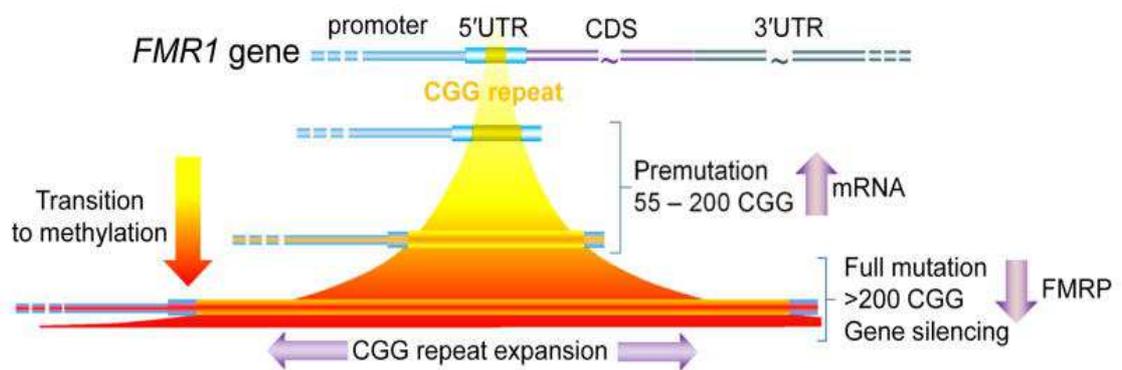


**Figura 2: Estructura del gen FMR1 con sus tres tipos de alelos.** La figura representa el alelo normal del gen FMR1, el alelo premutado y con la mutación completa respectivamente. La línea gris oscuro muestra la secuencia transcrita, las cajas negras son los exones, y la caja de color gris claro es la isla CpG. Se observan los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *EagI* el +1 y el ATG y los 17 exones y uniones de splicing alternativo. (Adaptado de Rousseau 2011).

Una variedad de transcritos surgen de la combinación de tres mecanismos: splicing alternativo, selección diferencial de sitios de inicio, selección diferencial de sitios de poliadenilación. De hecho estos eventos generan una gran diversidad de la expresión del gen con más de 10.000 transcritos<sup>12</sup>. También se ha demostrado que hay algunas variantes que cambian durante la diferenciación neuronal tanto en el hombre como en el ratón<sup>13</sup>. Estos ARNs producto del splicing alternativo producen diferentes isoformas de la proteína (diversidad proteica) que se expresa en diferentes tejidos.

## Alelos del gen FMR1

El número de repetidos CGG que encontramos en el gen FMR1 es altamente polimórfico en la población. Encontramos alelos diferentes como se describen en la figura 3:



**Figura 3: Diagrama del número de repetidos CGG en la región 5' no traducida del gen FMR1.** El número normal de repetidos CGG en la población general es de 5 a 44 CGG; Los alelos con 45-54 CGG se denominan “zona gris”. Los alelos en el rango de premutación de 55 a 200 CGG no presentan el promotor de gen FMR1 metilado (amarillo). Sin embargo en estos casos aumenta la tasa de transcripción del gen, produciendo un aumento del ARNm. Cuando el número de repetidos CGG es > 200 se produce la metilación completa del promotor (indicado por el sombreado rojo), produciendo el silenciamiento de gen por la metilación de una isla CpG en el promotor (adaptado de Hagermann, Paul 2013).

### *Alelo normal*

El alelo normal tiene entre 6 a 44 repetidos CGG, con un promedio de 29 repeticiones en la población en general<sup>14</sup>, los alelos en este rango de repeticiones se transmiten de forma estable a las siguientes generaciones.

### *Alelos intermedios*

Los alelos intermedios tienen entre 45-54 repeticiones CGG, la prevalencia de estos alelos fue determinada en varios estudios y varía entre 1:22-66 en las mujeres y 1:42-112 en los varones. Esta prevalencia depende del rango tomado para estos alelos y características de la población como la etnia<sup>15</sup>. Hasta hace poco no se estudiaba esta clase de alelos porque se creía que eran estables en función de la probabilidad de expansión en generaciones posteriores. El avance en el diagnóstico molecular y la realización de PCR para determinar el número de repeticiones CGG promovió a la investigación, especialmente en lo que respecta a la probabilidad de determinar pequeñas expansiones. Se ha determinado que el riesgo de expansiones de este tipo de alelos en la transmisión de madre a hijo sobre una generación es de 2 -4 %, con la posibilidad de expansión a MC en dos generaciones. El alelo más pequeño donde se ha reportado este fenómeno fue de 56 repeticiones CGG<sup>16</sup>. Se ha especulado sobre la existencia de una posible asociación entre los alelos intermedios y determinados fenotipos cognitivos y conductuales entre otros.<sup>17</sup>

### *Alelos premutados*

Los alelos premutados tienen entre 55 a 200 repeticiones CGG. Este rango de expansiones llamadas premutaciones tiene una frecuencia de 1 en 130-250 mujeres y 1 en 250-810 varones<sup>18</sup> y se asocia a inestabilidad replicativa especialmente durante la meiosis femenina. Las expansiones de más de 100 CGG en la mujer frecuentemente llevan a SXF en sus hijos varones<sup>19</sup>.

### ***Alelos con Mutación Completa***

Los alelos con la mutación completa tienen más de 200 repetidos CGG y se sabe que se produce un silenciamiento transcripcional por la metilación en el ADN de la isla CpG presente en el promotor del gen, acompañada por la hipacetilación de histonas asociadas y la adquisición de modificaciones postraduccionales como la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me) y la condensación de la cromatina. Este hecho inhibe la unión de los factores de transcripción basales y específicos produciendo el silenciamiento génico<sup>20</sup>. El estado de metilación de FMR1 en pacientes portadores de la mutación completa puede variar entre los diferentes tipos celulares y se asocia significativamente con los diferentes fenotipos de pacientes con SXF que se observan en la clínica<sup>21</sup>.

### ***Estabilidad alélica de los repetidos CGG.***

La expansión de tripletas CGG es una “mutación dinámica”, que se caracteriza por la variación en el número de repetidos a través de las generaciones debido a la inestabilidad meiótica del alelo expandido. En las enfermedades por tripletas en general, el aumento de tamaño de la región de repetidos genera el fenómeno de anticipación en el fenotipo, consiste en que la edad de comienzo de los síntomas es más precoz y el trastorno es más grave en las sucesivas generaciones. En la meiosis masculina el alelo tiende a transmitirse sin expansiones, también se han descrito contracciones<sup>22</sup>.

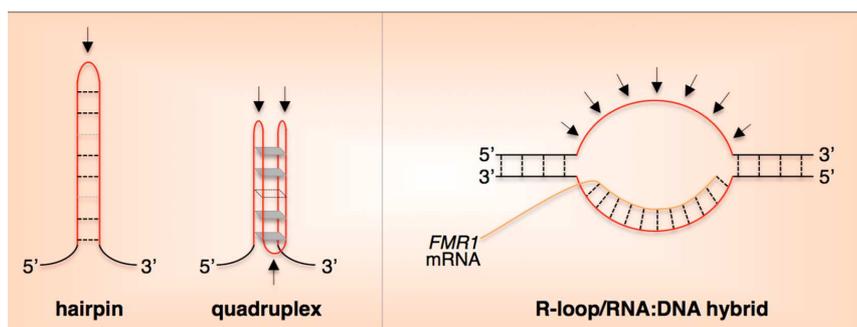
Otra característica es la inestabilidad mitótica, el tamaño del alelo varía en los distintos tejidos de un individuo afectado, generando un mosaicismo somático. Las distintas células de un solo individuo afectado presentan un rango variable de número de repetidos CGG en el que una fracción de células de un portador de mutación completa presenta alelos premutados (lo que ocurre en al menos el 15% de los varones y un 6% de las mujeres con SXF) o incluso alelos en el rango normal (presentes en aproximadamente el 1% de los varones con SXF).<sup>23</sup>

En las mujeres se agrega el mosaismo somático producido por la inactivación al azar del cromosoma X, generando una población de células que porta la mutación completa y por lo tanto no tienen la proteína FMRP y la presencia de otra población de células que con la proteína FMRP. Por este motivo el fenotipo en las mujeres en general es parcial, y la DI es leve o moderada<sup>24</sup>.

Una gran mayoría de las veces el alelo se expande en la meiosis femenina, cuando la madre es la portadora de la premutación o la mutación completa, por lo cual el tamaño va aumentando de generación en generación. Es interesante mencionar que varones afectados pueden producir gametos premutados o normales, revirtiendo la mutación<sup>4</sup>.

### Mecanismo de expansión

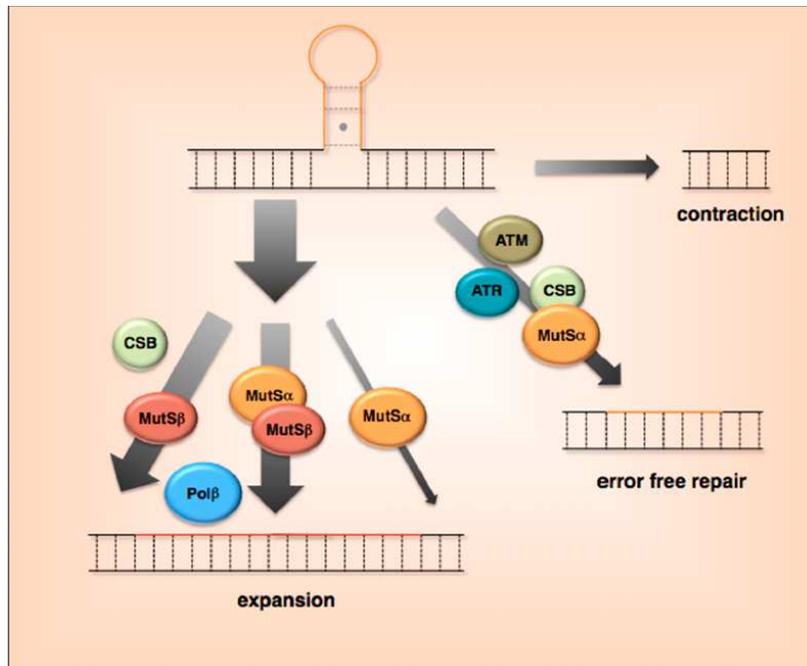
Los repetidos forman estructuras de ADN inusuales como horquillas, cuádruplex, Z-DNA y R-loops como se ilustra en la **Figura 4**. Dichas estructuras “intrastrand” podrían formarse en cualquier momento en que las dos cadenas con los repetidos estuvieran desemparejadas ya sea durante la replicación o reparación. La resolución del híbrido de ARN: ADN en el bucle R podría permitir que la hebra de molde formara también estructuras secundarias.



**Figura 4: Representación de estructuras que se forman producto de los repetidos CGG en el gen FMRI.** Las flechas indican regiones de una sola hebra, ambas cadenas de ADN forman hairpins que son una mezcla de bases GC (punteado negro). Se marcan con punteado gris las uniones G.G o C.C incorrectas para el caso de las hebras con repetidos CGG y CCG. Los Cuádruplex involucran G4 y tétradas CGCG (paralelogramos Grises). (Tomado de Xiao-Nan Zhao y Karen Usdin 2016)

Se ha demostrado que las proteínas que participan en diversas vías de reparación del ADN promueven la expansión de los repetidos (**Figura 5**). Estas proteínas están típicamente asociadas con la reparación de “mismatch repair” (MMR) y la reparación de pequeñas inserciones/deleciones (INDEL) de una sola base o hebra.

Las proteínas MSH2 y MSH3 y el heterodimero MutS reconoce los INDELS pequeños<sup>25</sup> y se unen a las estructuras secundarias que forman los repetidos alterando los sitios de reconocimiento para la reparación MMR<sup>26,25</sup>. Estas proteínas también han sido implicadas en modelos de ratón para la expansión de los repetidos CTG / CAG en las enfermedades Distrofia Miotónica 1 y enfermedad de Huntington<sup>27</sup>.



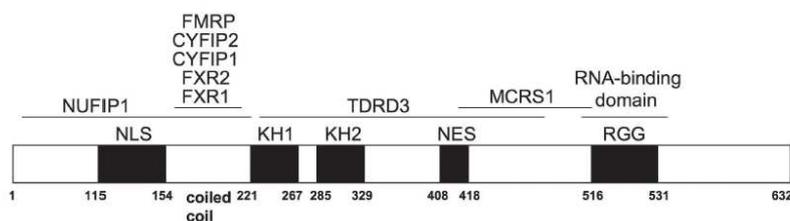
**Figura 5. Mecanismos por el que se puede expandir y /o contraer el repetido CGG en el locus FMR1.** Se muestran las proteínas principales que intervienen en estos mecanismos. Estudios realizados en ratón muestra el procesamiento de los repetidos CGG en el gen FMR1 durante la replicación y reparación que puede conducir a la expansión, contracción o reparación sin errores. La expansión por lejos es el mecanismo dominante más del 80% de los alelos muestran expansiones en ratones machos a los 6 meses de edad<sup>25</sup>. El 2 % de las expansiones involucran a la proteína de reparación MutSα. (Tomado de Xiao-Nan Zhao and Karen Usdin 2016)

La presencia de tripletes AGG que generalmente se presentan como interrupciones de cada 9-10 repetidos CGG, es muy estudiada, siendo su cantidad y posición importantes en la estabilidad replicativa y por ende, en la posibilidad de expansión en la siguiente generación. La pérdida de uno o varios tripletes AGG incrementan el riesgo de inestabilidad de los tripletes CGG en la siguiente generación. De hecho, se ha establecido que el riesgo de expansión a MC en hijos de madres portadoras de una PM disminuye en un 60% si la madre presenta 2 interrupciones AGG dentro de una repetición total de entre 70-80 tripletes CGG, en comparación con aquellas madres que no tienen ninguna interrupción dentro del mismo rango<sup>28</sup>.

## Proteína FMRP

### *Localización, estructura y expresión*

El gen FMR1 codifica la proteína de unión al ARN<sup>29</sup> denominada *Fragile X Mental Retardation Protein*. (FMRP), cuyo tamaño es de 631 KDa (**Figura 6**). Esta proteína está extensamente expresada en la etapa embrionaria y en la etapa postnatal se expresa en los testículos, útero y cerebro<sup>30</sup>. En las neuronas, se localiza con mayor frecuencia en el citoplasma celular y su función es esencial para el sistema nervioso central (SNC)<sup>31</sup>.



**Figura 6: Estructura de la proteína FMRP:** se muestran la secuencia de localización nuclear (NLS), los dominios (KH1 y 2), la señal de exportación nuclear (NES) y el dominio Arg-Gly-Gly (RGG). Los números indican los aminoácidos. (Adaptado de Rousseau 2011)

La proteína FMRP tiene dos dominios funcionales que son sitios de unión al ARN: KH2 y RGG. Se ha determinado que se une a micro-ARNs o ARNm formando un complejo ribonucleoproteico (RNP)<sup>32</sup>. En algunos trabajos se ha establecido la asociación de la proteína FMRP con diferentes micro-ARNs, particularmente miR-125b y miR-132 afectando la morfología de la espina dendrítica, siendo los mecanismos moleculares implicados en tal asociación desconocidos<sup>33</sup>.

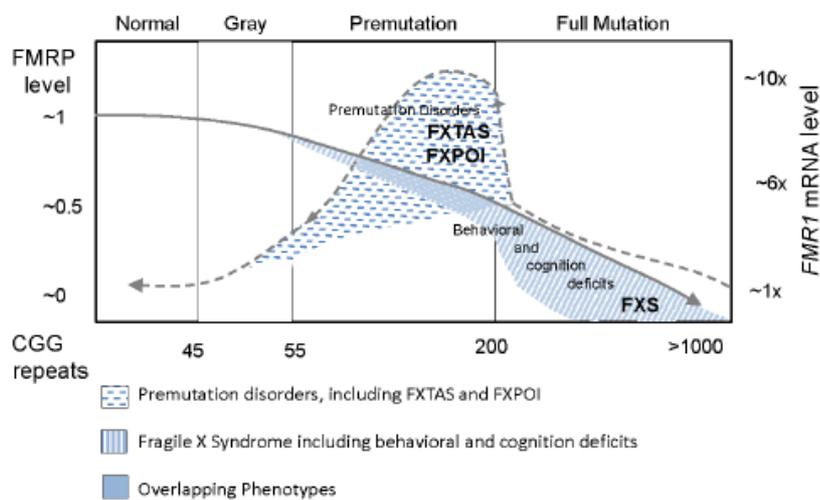
Otra función descrita es el transporte del ARNm y de algunas proteínas que participan en la regulación génica desde el citoplasma hasta el núcleo. En el trabajo de Greenough *et al* 2004<sup>34</sup> con modelos murinos se demostró que la proteína es un regulador negativo de la síntesis de otras proteínas que son estimuladas por el receptor metabotrópico de glutamato tipo I (mGluR). Estos estudios con ratones *fmr1-KO* indican que la FMRP es esencial para la iniciación rápida de la sinapsis que conduce a síntesis de proteínas. Además se demostró por microscopía electrónica evidencia de una baja proporción de FMRP asociada a espinas dendríticas en ratones KO<sup>34</sup>.

### **Trastornos asociados a los alelos premutados.**

Actualmente se estudian intensamente los fenotipos patológicos en los portadores de la premutación. Se ha reportado que algunos individuos varones premutados presentan trastornos de la socialización, timidez, agresividad, alcoholismo, y en algunas mujeres también se encontraron trastornos de la socialización y pánico social<sup>35</sup>. Las diferencias fenotípicas observadas entre mujeres con MC y entre varones y mujeres con MC, se explican por los distintos niveles de expresión de FMRP y por una inactivación sesgada del cromosoma X. Las mujeres con inactivación preferencial del cromosoma X normal presentan mayor DI y niveles bajos de FMRP, expresando un fenotipo físico y neuropsiquiátrico similar al observado en varones, pero más leve<sup>36</sup>.

Con los avances de la optimización de los métodos diagnósticos, estudiamos una población que podría portar alelos con expansiones del repetido CGG en el gen FMR1 y más acotado en el rango de la premutación (50-200 repetidos). Si bien hasta hace pocos años se creía que los portadores de la premutación no transmitían la inestabilidad

hereditaria del gen FMR1, y eran asintomáticos, ahora sabemos que pueden presentar otras afecciones tales como temblor y ataxias, TDAH y FOP (**figura 7**). Estos trastornos se solapan entre sí en las poblaciones humanas. Y su estudio clínico y molecular es de gran interés tanto para aportar a la comprensión de los mecanismos moleculares que los causan, así como a su detección precoz y desarrollo de medidas de protección y planificación de programas de educación y estimulación de los niños afectados. A su vez, estos trastornos multifactoriales deben ser estudiados en cada población con su perfil genético, demográfico y cultural particular.



**Figura 7: Solapamiento de Fenotipos entre SXF y trastornos generados por premutaciones en el gen FMR1.** La línea punteada indica los niveles de ARNm de FMR1 y la línea continua indica los niveles de expresión de FMRP. (Adaptado de Lozano R et al., 2014)<sup>37</sup>.

En el año 2001 Paul Hagermann *et al*<sup>8</sup> describe el primer fenotipo asociado a la premutación en abuelos de los niños con SXF, se denominó Síndrome de Temblor / Ataxia asociado a X Frágil (FXTAS). Ocurre en el 30% de los varones premutados y también se observa en mujeres en una frecuencia menor. La Falla Ovárica Precoz ocurre en el 16 a 20% de las mujeres portadoras de la premutación<sup>38</sup>. Además se ha observado en portadores de la premutación trastornos neuroconductuales como déficit de atención e hiperactividad (TDAH), ansiedad y déficit de función ejecutiva<sup>39</sup>. Como se observa en la figura 6 estos fenotipos se solapan entre sí.

### ***Síndrome de temblor / ataxia asociado al X-frágil. (FXTAS)***

El FXTAS se presenta en aproximadamente el 30% de los varones mayores de 50 años y portadores de la premutación<sup>40</sup>, donde se han encontrado diferentes síntomas dentro de la esfera neurológica<sup>41</sup> como temblor de intención<sup>42</sup>, ataxia cerebelosa<sup>43</sup>, parkinsonismo, temblor esencial, neuropatía y miopatía, así como a alteraciones cognitivas y/o conductuales progresivas<sup>42</sup>. El FXTAS puede ser una de las causas más comunes de temblor y/o ataxia en adultos mayores<sup>44</sup>. La edad de aparición de los primeros síntomas de FXTAS está determinado por el largo de repetidos CGG<sup>45</sup>.

La imagenología contribuye a la caracterización del síndrome; en la tomografía cerebral (TAC) se observa atrofia de cerebro, tronco encefálico y cerebelo en aproximadamente el 80% de los pacientes. La resonancia magnética nuclear (RMN) cerebral muestra regiones simétricas con señal aumentada en intensidad en T2 -y señal disminuida en T1- en los pedúnculos cerebelosos medios y la sustancia blanca profunda cerebelosa adyacente, lo que se considera un hallazgo altamente sensible para este síndrome neurológico<sup>42</sup>. La penetrancia de esta patología tanto en varones como en mujeres premutados es dependiente de la edad; estudios con controles de la misma edad en los grupos etarios de 50-59, 60-69, 70-79 o más de 80, muestran diferencias significativas para la marcha atáxica y temblor de intención entre varones portadores y los controles (no portadores)<sup>46</sup>. Al menos un tercio de los varones portadores de la PM mayores de 50 años tienen una combinación de temblor de intención y ataxia<sup>47</sup>. Aproximadamente 1 en 3.000 varones de la población general están en riesgo de manifestar FXTAS.

#### **Mecanismo Molecular**

Se ha puesto en evidencia el aumento de los niveles celulares del ARNm del gen FMR1, como consecuencia de un aumento en tasa de transcripción<sup>48</sup> con niveles levemente disminuidos de la proteína FMRP<sup>49</sup>, por lo que se ha sugerido un mecanismo

tóxico de ganancia de función, el aumento de los niveles del mensajero interferiría con funciones nucleares de las neuronas llevando a la neurodegeneración<sup>50</sup> y acúmulos proteicos intracerebrales de proteínas del citoesqueleto, chaperonas, del proteasoma y de la maquinaria de corte y empalme. Éste y otros mecanismos patogénicos similares se han planteado para otras enfermedades neurodegenerativas por repetición de tripletas<sup>51</sup>. La evidencia parece apoyar la idea de la aparición temprana de un trastorno del funcionamiento ejecutivo (EF)<sup>52</sup>. Las funciones ejecutivas representan un subconjunto importante de habilidades cognitivas. En esencia, es la capacidad para la regulación autónoma del propio comportamiento y atención<sup>53</sup>. No se puede identificar el EF en una región específica del cerebro, sí se sabe que el córtex prefrontal está fuertemente asociado, el fenotipo observado en etapas más tardías de la enfermedad es similar a la demencia<sup>54</sup>

### Tratamiento

Las perspectivas de tratamiento son otro tema relevante luego del diagnóstico ya que se ha demostrado que si bien ninguna terapéutica es uniformemente efectiva, los pacientes se benefician de los tratamientos habitualmente usados para el control de los movimientos anormales<sup>55</sup>.

Dado que un 2-4% de los hombres con ataxia cerebelar de inicio temprano podrían ser portadores de una PM, se recomienda estudiar el número de repeticiones CGG en *FMRI* en todas las personas mayores de 50 años con este tipo de sintomatología<sup>56</sup>.

### ***Trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad. (TDAH)***

La proteína FMRP es importante para el desarrollo y la maduración de las espinas dendríticas de las neuronas y conexiones sinápticas, la pérdida de FMRP produce alteraciones del comportamiento que son características del SXF tales como déficit

atencional, hiperactividad, impulsividad y rasgos autistas. El TDAH es un trastorno neuroconductual que se caracteriza por una inquietud excesiva, falta de atención, distracción e impulsividad. Por lo general, se detecta cuando los niños están en edad escolar, aunque también puede diagnosticarse en todas las edades, siendo el trastorno psiquiátrico más frecuente en la infancia, y se estima que el 5.3% de los niños lo padecen<sup>57</sup>. Este trastorno es un proceso crónico con una alta comorbilidad que influye en el funcionamiento del individuo en la edad adulta. Tiene un gran impacto en la sociedad en términos de coste económico, estrés familiar, problemas académicos y vocacionales así como una importante disminución de la autoestima del sujeto afectado, siendo un importante problema de salud pública debido al inicio en etapas precoces de la infancia, ser un proceso incapacitante y crónico con la afectación de diferentes esferas comportamentales (familiar, escolar y social).

Varios estudios muestran que el TDAH está asociado a un fuerte componente genético, y se ha propuesto una herencia compleja y poligénica. Entre los múltiples factores genéticos y ambientales, se encontró una asociación con la premutación del gen FMR1. En un trabajo de Bailey *et al* (2008) se observó que en niños mayores de 6 años premutados había tasas más elevadas de déficit de atención, ansiedad y agresión en comparación a sus hermanos no portadores<sup>58</sup>.

Recientemente se ha evaluado la gravedad de los síntomas asociados al TDAH en mujeres entre 18 y 50 años con una historia familiar de síndrome de X-Frágil, los resultados de este estudio indicaron que en el grupo de portadoras de la premutación tuvieron un score significativamente elevado para tres síntomas relacionados de TDAH: atención, memoria e inestabilidad emocional en comparación con los controles<sup>59</sup>.

### ***Trastornos del Espectro Autista (TEA)***

Los Trastornos del Espectro Autista (TEA) son un grupo heterogéneo de trastornos del desarrollo de inicio en la infancia temprana. Se caracterizan por desvíos y retrasos en el desarrollo de la comunicación social, asociados a un patrón de

comportamientos e intereses restringidos y estereotipados. El autismo es un trastorno complejo del neurodesarrollo que afecta a la coordinación, sincronización e integración entre las diferentes áreas cerebrales. La contribución genética en la etiología de los TEA es muy relevante y se considera que el autismo es un trastorno poligénico determinado por las interacciones entre muchos genes y factores ambientales. Entre los genes que producen susceptibilidad al TEA está el síndrome de X-frágil (SXF), más del 30% de los niños afectados cumplen los criterios diagnósticos de TEA y las premutaciones del gen FMR1, aumentan la susceptibilidad a los TEA.<sup>60</sup>

### ***Falla Ovárica Precoz (FOP)***

La FOP se define como la aparición de amenorrea que se presenta por más de 4 meses consecutivos y niveles hormonales en el rango de la menopausia antes de los 40 años<sup>61</sup>. Esta resulta de una disminución de los folículos ováricos, daño folicular acelerado y se asocia con infertilidad. Del 5 -10% de las mujeres diagnosticadas con FOP puede concebir un embarazo. El 16 a 20% de las mujeres con la premutación de FMR1 presentan FOP<sup>38</sup>. No se observa una relación lineal entre tamaño del número de repetidos CGG y la FOP, el riesgo de padecer FOP aumenta en mujeres portadoras de alelos con 80-100 repetidos CGG y disminuye en mujeres portadoras de alelos que tiene más de 100 repetidos CGG.<sup>62</sup> También se ha relacionado con los alelos intermedios del gen FMR1. Bretherick *et al*, encontraron que el 14,2% de los alelos entre las mujeres con FOP tenían entre 35 y 54 repeticiones CGG. Esta relación puede depender del patrón de intersección de los repetidos AGG en los repetidos CGG<sup>63</sup>.

### **Diagnóstico Molecular**

#### ***Recomendación para los test de diagnósticos de FMR1***

La American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recomienda realizar los test para determinar el número de repetidos del gen FMR1 en:

- Individuos con DI, autismo o retraso del desarrollo, particularmente aquellos con características físicas o conductuales sugestivas de SXF, una historia familiar de SXF, o parientes con DI no diagnosticada.
- Fetos de mujeres con diagnóstico de portadoras de PM y MC.
- Individuos con historia familiar de SXF o DI sin diagnosticar que buscan asesoramiento genético (reproductivo)<sup>64</sup>.
- hombres y mujeres con temblor de intención de inicio tardío y ataxia de marcha, especialmente si tienen una historia familiar de SXF<sup>64</sup>.

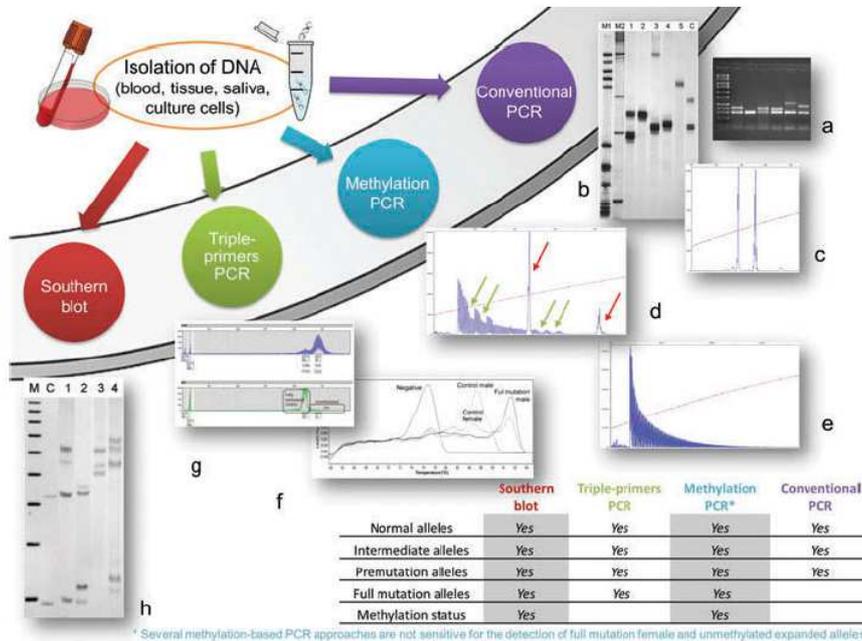
El ACMG también respalda los test para determinar el estatus de portador en mujeres que experimentan falla ovárica antes de los 40 años de edad

#### *Herramientas diagnosticas para determinar el número de repetidos CGG*

La caracterización molecular completa de los alelos del gen FMR1 requiere información sobre: el tamaño de los repetidos CGG; la longitud de los repetidos CGG ininterrumpidos y número de interrupciones AGG en los extremos 3' y 5' de la región y el estado de metilación del promotor. Generalmente puede ser necesaria una combinación de métodos para caracterizar estas diferentes facetas de la MC y PM del gen FMR1<sup>22</sup>.

Desde el descubrimiento del gen en el año 1991 el diagnóstico molecular ha tenido grandes avances. En un principio se diagnosticaba buscando los sitios frágiles en el cromosoma X mediante citogenética y luego por Southern Blot<sup>71</sup>, que sigue siendo la técnica de referencia o estándar de oro. Actualmente la determinación de los repetidos se ha centrado en la adquisición de técnicas más sensibles, sobre todo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de varios enfoques moleculares que se han desarrollado (**Figura 8**), aunque con diferentes limitaciones debido principalmente a la dificultad para amplificar por PCR la región de repetidos CGG expandida. La región de los repetidos CGG es difícil de amplificar debido a que tienden a formar estructuras secundarias que dificultan la procesividad de las polimerasas. Por eso en varios trabajos

donde se busca resolver este problema promueven la combinación de polimerasas y co-solventes como el DMSO y Betaína para lograr amplificar alelos normales y algunos alelos premutados de bajo rango<sup>65, 66</sup>.

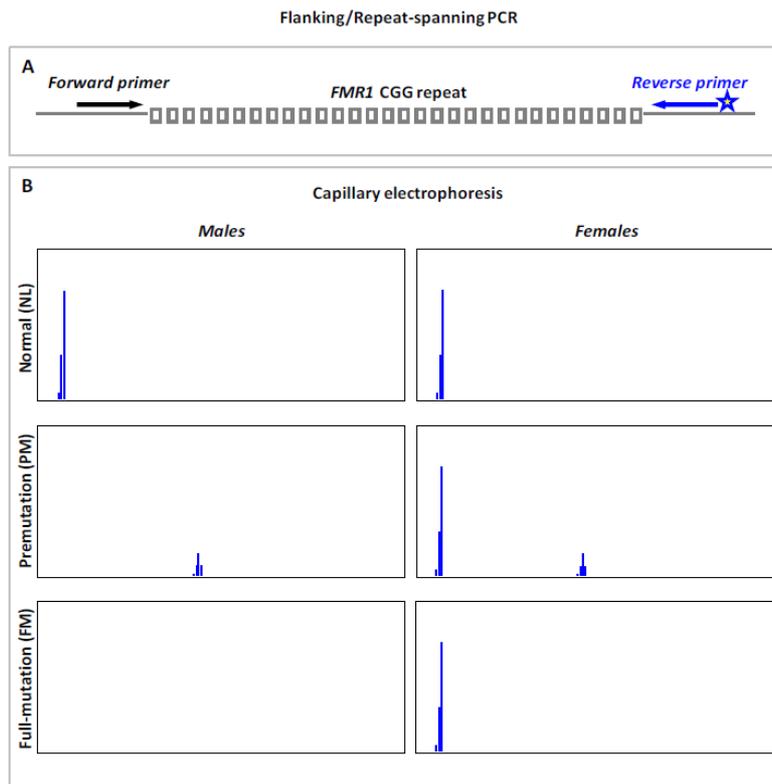


**Figura 8: Diagrama de las distintas metodologías utilizadas para el diagnóstico de SXF.** El ADN genómico (ADNg) puede ser aislado de sangre entera, tejido, saliva y cultivo celular, es aislado y amplificado mediante PCR o digerido con enzimas de restricción sensibles a la metilación para el análisis de transferencia de Southern. Los alelos se pueden visualizar en un gel de agarosa (a), en un gel de acrilamida (b) o mediante electroforesis capilar (EC). La tabla en el ángulo inferior derecho muestra la información que puede obtenerse mediante las diversas metodologías de diagnóstico. Específicamente, la detección de alelos normales, intermedios, de premutación y de mutación completa puede obtenerse usando cualquiera de los métodos. Excepto que los alelos con la mutación completa no son amplificables mediante PCR convencional. El análisis de transferencia de Southern puede detectar alelos contenidos en todos los rangos (normal, premutados y mutación completa); Sin embargo, el tamaño se obtiene sólo para los alelos de mutación completa. (Adaptado de Tassone 2015).

### ***Determinación del número de repeticiones mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR)***

Mediante la técnica de PCR se logra amplificar los alelos normales y premutados, y se pueden visualizar de dos maneras: electroforesis en geles de agarosa o electroforesis capilar. En el diagrama en la **Figura 9** se observan los cebadores directo y

reverso (marcado con FAM) flanqueando a la región de repetidos CGG, y los perfiles de EC de los varones y mujeres: NL, PM y MC. Los varones con un alelo NL o PM darán un pico producto de la amplificación de un alelo (solo portan un cromosoma X). No obstante, en los varones con una MC grande, los cebadores no pueden amplificar a través de la hiperexpansión de repetidos CGG y resulta en amplificación nula. Las mujeres NL homocigotas producirán un único pico de amplificación, mientras que las mujeres portadoras de una PM pequeña mostrarán un pico de amplificación NL y PM. En general, se sabe que el desempeño de las PCR es menos eficiente en las mujeres con PM grandes (>100 CGG) y MC debido a la amplificación preferencial del alelo NL por lo tanto la detección de un único pico en las mujeres crea ambigüedad en cuanto a si son NL homocigóticas (con dos alelos de tamaño de repetición CGG idéntico) o heterocigotos con un alelo NL y otro alelo PM / MC no amplificables. En consecuencia, todas las mujeres NL homocigotos requieren pruebas adicionales basadas en PCR modificados o análisis SB para resolver la cigosidad y excluir la presencia de un alelo expandido. Además se ha informado la detección preferencial de los alelos más pequeños en un mosaico individual<sup>67</sup>, y tal amplificación sesgada pueden resultar en genotipificación incorrecta y alteración de la evaluación de riesgo SXF, FXTAS y FOP<sup>68</sup>.

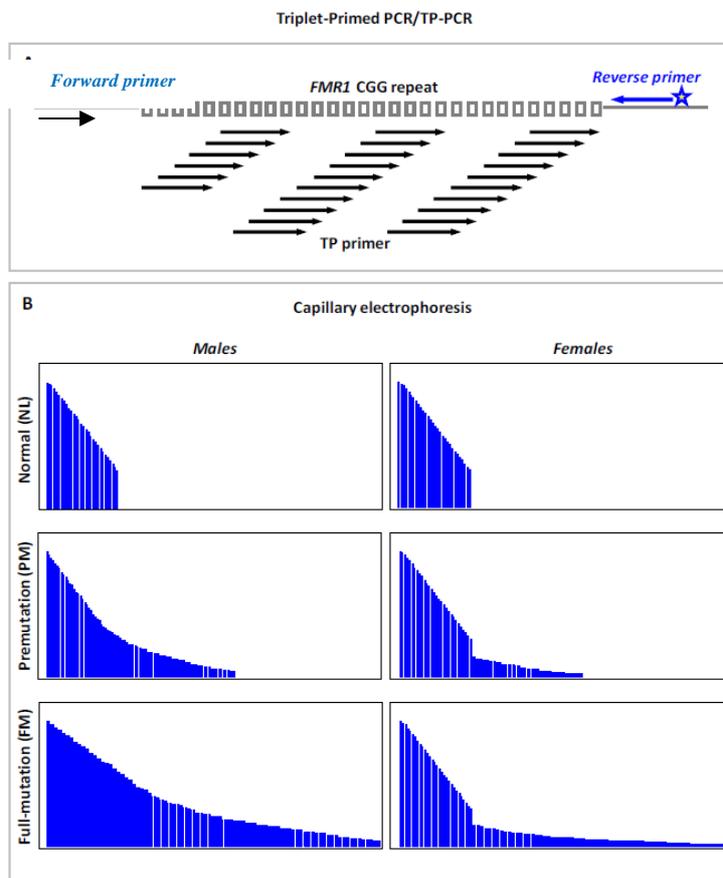


**Figura 9:** Esquema de amplificación del número de repetidos CGG del gen FMR1 a) Muestra la región flanqueante de los cebadores directo y reverso que comprende a los repetidos CGG. b) Perfiles esperados en la EC de mujeres y varones con alelos normales (NL), PM y MC. Con esta técnica también se puede determinar el número y la posición de las interrupciones AGG. Esto ha permitido el desarrollo de un modelo para estimar el riesgo de expansión a una mutación completa en las generaciones siguientes, basado la relación en el número de repetidos CGG y la cantidad de AGG en ese tramo. Esta información puede ser muy útil en el asesoramiento genético de los portadores de premutación evaluando el riesgo de expansión de su descendencia. De hecho, la información obtenida del análisis AGG puede ayudar en la toma de decisiones reproductivas<sup>69</sup>

### ***Triplet Repeat Primed PCR (TP-PCR)***

El TP-PCR fue propuesto por Warner *et al* para determinar lo las expansiones de los repetidos CAG en la distrofia miotónica<sup>70</sup>. En esta PCR se incorpora un tercer primer que alinea en el tracto de repeticiones CGG. Este primer se denomina quimérico y se une aleatoriamente en múltiples posiciones dentro de los repetidos CGG generando una mezcla de fragmentos de diferentes tamaños. Esto incrementa la cantidad de moldes de mayor tamaño que se amplifican a continuación hasta una intensidad que pueda ser detectable por un tercer cebador de cola que lleva la secuencia complementaria al tramo

que sobresale del cebador. Los productos de PCR se visualizan como una mancha en los geles de agarosa al 2% o como una escalera de picos de fluorescencia en la electroforesis capilar. Este método tiene una alta sensibilidad analítica y especificidad para detectar alelos con grandes expansiones<sup>70,71</sup>. La **figura 10** muestra el esquema del diseño del cebador TP-PCR y los perfiles de EC esperados de varones y mujeres NL, PM y MC. La generación de picos de productos de amplificación continuos e ininterrumpidos significaría la ausencia de interrupciones AGG y el número de repetidos de CGG se determina a partir del número de picos de productos de amplificación. En contraste con la PCR convencional, el TP-PCR detecta de forma fiable expansiones en ambos varones y mujeres. También detecta mujeres homocigotas y heterocigotas NL y MC<sup>24</sup>.



**Figura 10:** Triplet Repeat Primed PCR (TP-PCR) a) Esquema del diseño del TP-PCR b) Perfiles esperados en la EC de mujeres y varones NL, PM y MC.

### ***Estado de Metilación***

Aunque varias de las actuales metodologías que determina el tamaño de repetidos CGG pueden amplificar los alelos a lo largo de todo el intervalo de mutación<sup>71,66</sup> no pueden determinar el estado de metilación del mismo. El conocer el estado de metilación es de suma importancia para el diagnóstico de SXF, ya se ha demostrado que el grado de metilación se asocia con el grado de DI y/o de la sintomatología clínica<sup>21</sup>. Los distintos PCRs metilación específicos que utilizan la modificación de bisulfito de la secuencia repetida de CGG, se basan en la conversión de citosina no metilada en residuos de uracilo, permaneciendo la citosina metilada resistente a esta modificación<sup>72</sup>. Una vez amplificado y secuenciado, este "ADN modificado" puede proporcionar información sobre la metilación en determinados sitios CpG dentro de la secuencia del ADN amplificado<sup>73</sup>.

Hay otros métodos que se utilizan para determinar el estado de metilación y se basan en el tratamiento del ADNg con enzimas de restricción sensibles a la metilación como *Bst* ZI, *Eag* I, *Nru* I, o *Bss* HII que tienen un sitio de corte en las islas CpG upstream de la secuencia de repetidos CGG y otras enzimas de digestión como *Eco* RI o *Hind* III que tiene el sitio de corte downstream.

En este trabajo no se profundizó en el estatus de metilación del gen. Las muestras fueron enviadas a un laboratorio de referencia para realizarse Southern Blot que es la técnica confirmatoria.

### ***Southern Blot***

El Southern Blot permite detectar alelos premutados y mutados, aportando información sobre el estado de metilación del gen FMR1. Sin embargo, es un estudio de elevado costo y muy laborioso, por lo cual se utiliza como diagnóstico confirmatorio luego de un tamiz selectivo. Se realiza la doble digestión del ADNg con *Eco* RI y *Eag* I luego se hibrida con sondas de ADN que se han aislado del gen FMR1, tales como

StB12.3, pfxa3<sup>71</sup>. La enzima *Eag* I tiene como sitio blanco la secuencia CGGCGG que no es reconocida si la citosina está metilada, por eso los alelos metilados son cortados solo por la enzima *Eco* RI para dar un fragmento de 5.2 kb, mientras que los alelos no metilados son cortados por ambas enzimas para producir un fragmento de 2.8 kb. La visualización de bandas con tamaño superior a 5.2 kb o 2.8 kb indica la presencia de alelos premutados o con mutación completa comparados con un control normal y el estatus de metilación.

En este trabajo nos propusimos optimizar los métodos de diagnóstico del número de repetidos del gen FMR1 y caracterizar los fenotipos de las personas portadoras de la premutación.

## **OBJETIVO GENERAL**

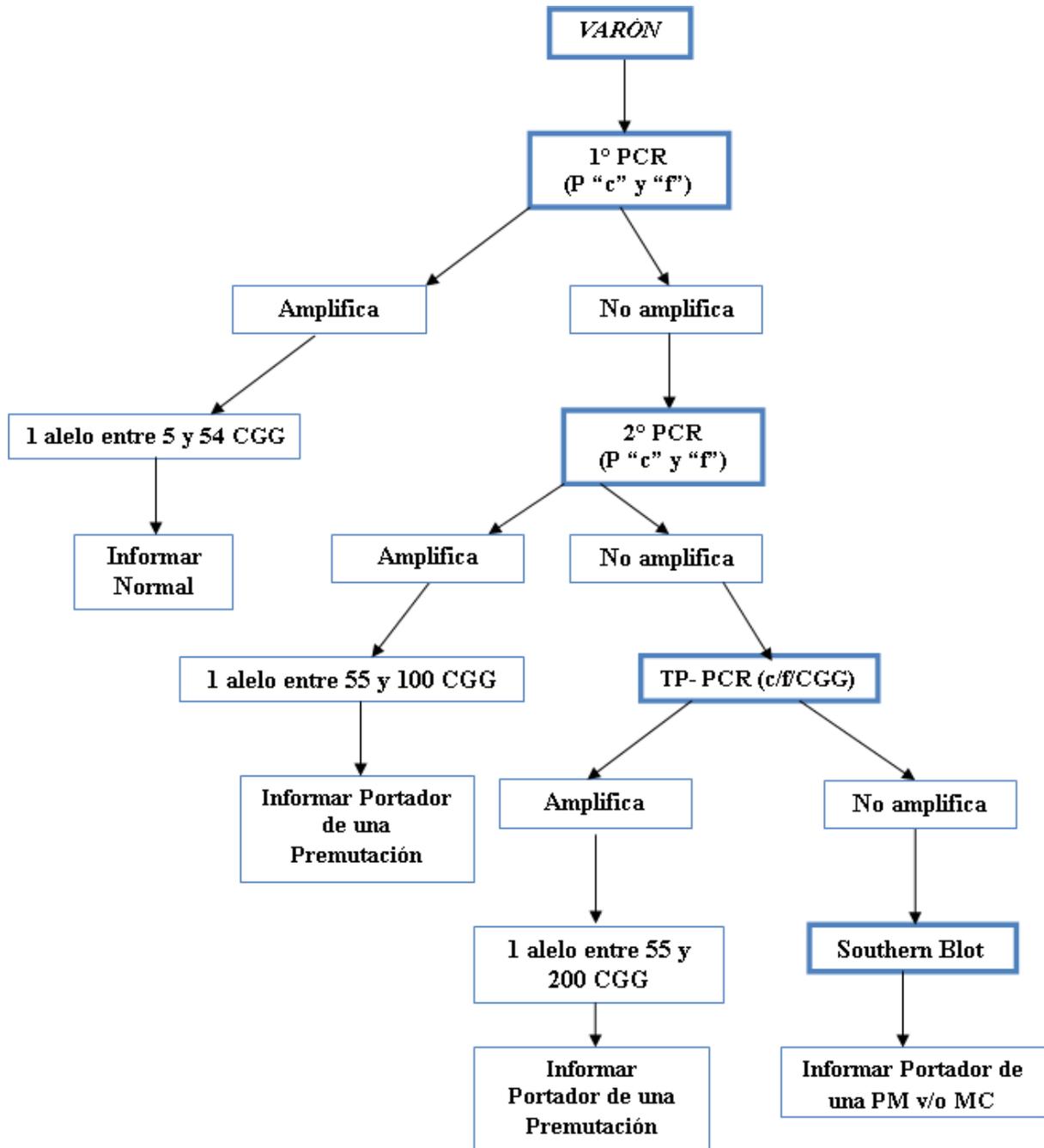
Caracterizar el número de repeticiones en el gen FMR1 en una población de individuos con fenotipos clínicos característicos de la premutación del gen.

### **Objetivos específicos:**

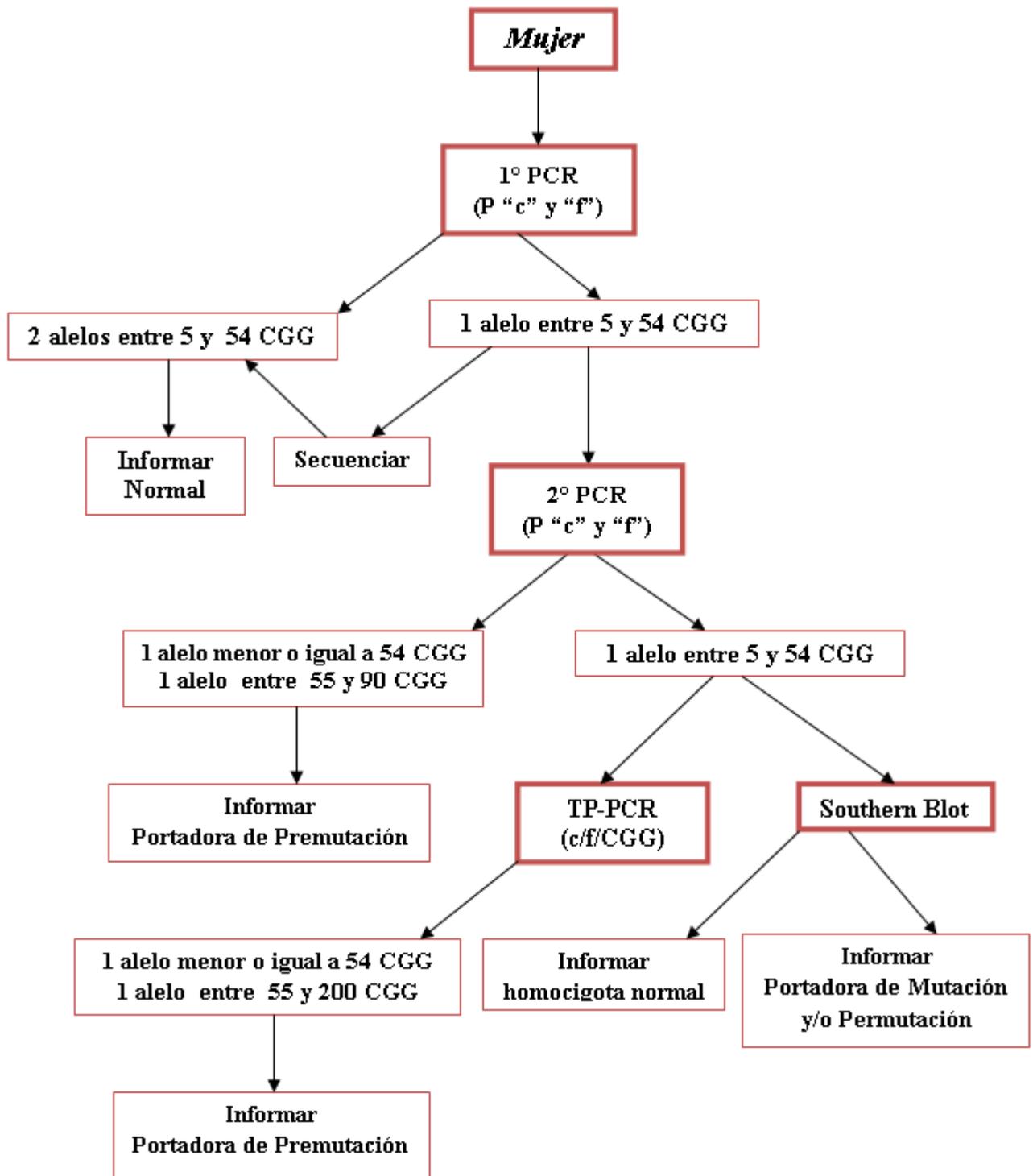
- I) Optimizar un método de PCR sencillo y económico para establecer el número de repetidos CGG del gen FMR1.
- II) Establecer el estatus de heterocigosis en mujeres en el que se observa una banda sola. (Electroforesis en Agarosa y Capilar)
- III) Determinar la frecuencia de los repetidos CCG y sus interrupciones AGG en la población estudiada.
- IV) Estudiar la transmisión de los alelos expandidos en las familias.
- V) Determinar la correlación entre el genotipo y fenotipo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Metodológico para determinar el número de repetidos CCG en varones.



**Diseño Metodológico para determinar el número de repetidos CCG en mujeres.**



Si bien esta tesis involucra investigación con seres humanos, no se plantea ningún procedimiento que no sea parte de los protocolos clínicos establecidos para la atención médica habitual de estos pacientes. De hecho, la ejecución de este trabajo apunta a mejorar la calidad de la atención clínica, especialmente en los aspectos de diagnóstico y prevención.

Todos los individuos y/o sus padres o tutores que participaron en este estudio han firmado un consentimiento informado. (Ver anexo)

### **Pacientes estudiados:**

En este estudio se valoraron tres poblaciones de pacientes con diferentes fenotipos asociados a la premutación de FMR1. Se utilizó un criterio inclusivo, ya que uno de los objetivos del estudio fue determinar la presencia de premutaciones en individuos asintomáticos o con alteraciones mínimas del fenotipo para FXTAS, TDAH, FOP.

#### ***Población 1: Niños con DI, malformaciones y /o dismorfias con alteraciones conductuales.***

Se analizaron 117 niños con DI, malformaciones y/o dismorfias, historia familiar de DI y alteraciones conductuales como déficit atencional, hiperactividad, impulsividad, y trastornos del espectro autista (TEA). Estos niños estaban incluidos en el proyecto financiado por la ANII en el año 2011 titulado “Genética clínica y molecular del retardo mental” cuyo objetivo general fue contribuir a estudiar las características de la población uruguaya con retraso del neurodesarrollo y/o DI. Se realizó anamnesis y examen clínico en la sección Clínica del departamento de Genética en el Centro Hospitalario Pereira Rossell. (CHPR). Algunos pacientes también fueron evaluados en

Clínica de Psiquiatría del Niño y del Adolescente y de la Clínica de Neuropediatría y la Unidad de TEA dirigida por la Dra. Gabriela Garrido.

***Población 2: Pacientes mujeres y varones mayores de 50 años con temblor y ataxias.***

Se analizaron 18 pacientes mujeres y varones mayores de 50 años para la búsqueda de premutación FMR1 asociada al Síndrome de temblor/ataxia asociado al X-frágil (FXTAS). Se seleccionaron todos los pacientes asistidos en la Policlínica de movimientos anormales y parkinson del Instituto de Neurología del Hospital de Clínicas (HC), durante el periodo setiembre 2011 - marzo 2013 que presentaran temblor y ataxia y cumplieran los criterios de inclusión de Berry Kravis (Pediatr Neurol 2014) para el FXTAS (ver anexo).

***Población 3:a) Familias de pacientes con resultado molecular positivo para la mutación y/o premutación del FMRI. b) Pacientes con sospecha Clínica SXF y trastornos neuroconductuales que se asocian a la premutación tales como TEA, TDAH.***

3a) Se analizaron 30 pacientes con historia familiar de SXF, son familiares de los afectados diagnosticados en este estudio y familiares de afectados enviados para asesoramiento genético por su médico. Algunos fueron contactados a través de la Asociación Síndrome X Frágil Uruguay ([facebook.com/SindromeX.Fragil.Uruguay](https://www.facebook.com/SindromeX.Fragil.Uruguay)).

3 b) Se analizaron un total de 54 pacientes de la policlínica de genética del CHPR con discapacidad intelectual, déficit atencional, hiperactividad, impulsividad y trastornos de espectro autista.

## **Extracción de ADN**

Se realizó una extracción de 5 ml de sangre periférica por punción venosa para preparación de ADN genómico.

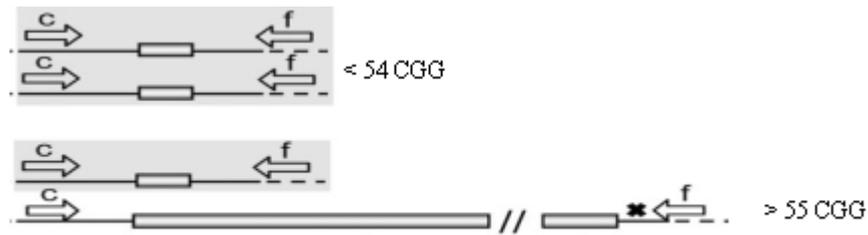
Inicialmente se realizó la extracción de ADN de 200 µl de glóbulos blancos de sangre periférica de los pacientes en tubos con EDTA, se utilizó el kit de extracción de ADN (QIAamp® DNA Blood Mini de Qiagen, USA). Este Kit se basa en la extracción de ADN por columnas de afinidad, se realizó el protocolo según las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y almacenado a -20°C para su posterior análisis.

## **Determinación del número de repetidos CGG en el gen FMR1.**

Para determinar el número de repetidos CGG realizamos 3 PCRs diferentes que se describen a continuación:

### ***PCR con taq polimerasa platinum (invitrogen) que determina el rango de 5 a 70 repetidos CGG***

Este PCR puede amplificar los alelos normales (5 a 54 CGG) y premutados pequeños (55 a 70 CGG) se utilizaron los primers “Pc” y “Pf” que flanquean la región de repetidos CGG como se muestra en la **figura 11** y que fueron descritos por Fu *et al.*<sup>6</sup> también utilizados por Saluto *et al.*<sup>65</sup> y Tassone *et al.*<sup>66</sup>. Ver Anexo.



**Figura 11:** Se observa el producto de amplificación con los primers “c” y “f” (Tomado de Tassone 2008)

PCR se realizó con las condiciones que se describieron en el trabajo de Tassone y col. (J Mol Diagn 43-9, 2008) que se muestran en la tabla 1 a continuación:

**Tabla 1**

REACTIVOS	CONCENTRACION EN LA REACCIÓN
Betaína	2M
Buffer	2X
Agua	CN para llegar a un volumen final 20 µl
Pc	0,33 µM
Pf	0,33 µM
7daza DNTPS	500 µM
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM
Taq Platinum (Invitrogen)	0,4 U

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 20µl, conteniendo de 100 a 150 ng de ADN.

La PCR se realizó en un termociclador Standard 96 Gradient de Biometra con las siguientes condiciones de ciclado: Desnaturalización inicial a 98°C por 10 min, seguida por 10 ciclos de 97°C por 35 s, 64°C por 35 s y 68°C por 4 min, 25 ciclos de 97°C por

35 s, 64°C por 35 s y 68°C por 4 min (Con 20 segundos de incremento en cada ciclo) y una extensión final a 68°C por 10 min.

Se sembraron en un gel de agarosa al 2% tenido con Gel Red™ Nucleic Acid Biotium un total de 20 µl de producto de PCR con 5µl de loading dye 6x Kapa Biosystems junto a las muestras se cargó en el gel 5 µl del Marcador de peso Molecular Kapa Express Ladder de Biosystems.

La electroforesis se realizó en una cuba (Thermo Scientificowl EasyCast™) conectada a una fuente de voltaje (EPS 300 Biotech) se corrió a 90 voltios con el amperaje constante por 3 horas. La electroforesis se visualizó en un Transiluminador (UVPBiodoc™ SYSTEM).

*PCR realizado con el kit Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics) que determina el rango de 5 a 100 repetidos CGG*

Este segundo PCR se realiza con los mismos cebadores descritos para el primer PCR, en la tabla 2 a y b se describen los reactivos y concentraciones utilizadas.

**Tabla 2**

**a) Mix A**

REACTIVOS	CONCENTRACION EN LA REACCIÓN
Betaína 5M	2,2M
DNT Ps GC Rich	500 µM
Pc	0,33 µM
Pf	0,33 µM
ADN	100 a 200ng

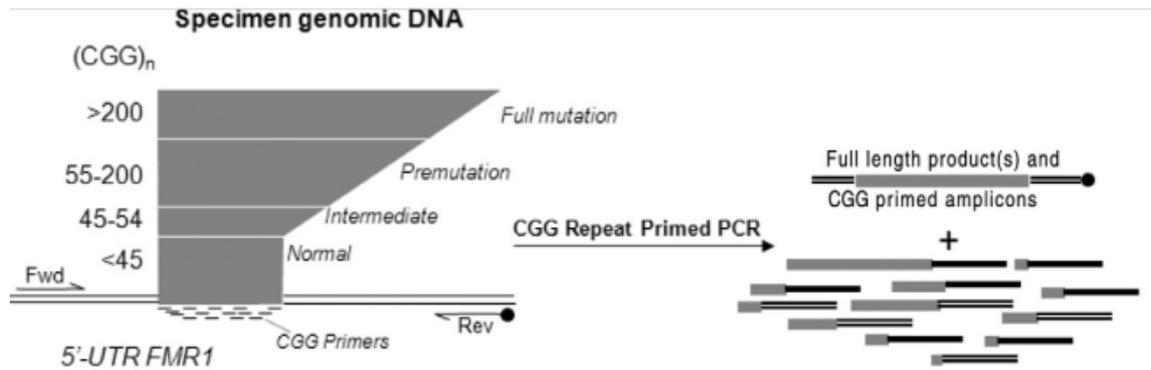
## b) Mix B

REACTIVOS	CONCENTRACION EN LA REACCIÓN
Agua	CN para un volumen final de 30µl
Buffer 3	2,25 M
Enzyme Mix	0,5 U

Esta PCR tiene dos reacciones: el MIX A que contiene a los primers con un volumen final de 20 µl con de 100 a 200 ng de ADN. Se colocó en el termociclador Standard 96 Gradient de Biometra con desnaturalización inicial de 98°C de 10 minutos (a los 7 minutos se pone una pausa para agregar 10 µl MIX B), seguida por 10 ciclos de 97°C por 35 s, 64°C por 35 s y 68°C por 4 min, 25 ciclos de 97°C por 35 s, 64°C por 35 s y 68°C por 4 min (Con 20 segundos de incremento en cada ciclo) y una extensión final a 68°C por 10 min. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones que el PCR1.

*PCR con tres 3 primers (C/F/CGG) que amplifica en el rango 5 a 200 repetidos CGG con el kit Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics)*

Se utilizaron los cebadores “SXF c” y “FAM SXF f” descritos por Filipovic-Sadic et al (2010) Clinical Chemistry<sup>66</sup> junto con el cebador quimérico CGG que se unen a los repetidos CGG de manera azarosa **figura 12**.



**Figura 12:** Esquema de la Detección y amplificación del gen FMR1 donde se describe la amplificación del ADN con dos primers gen específicos y un primer que se une a los repetidos CGG. (Tomada de Filipovic-Sadic 2010).

A continuación en la **tabla 3 a y b** se describe las reacciones realizadas con los reactivos y concentraciones utilizado propuesto por Tassone en comunicación directa con nosotros.

**Tabla 3**

**a) Mix A**

REACTIVOS	CONCENTRACION EN LA REACCIÓN
Betaína 5M	2,2M
Pc	0,33 $\mu$ M
Pf	0,33 $\mu$ M
P Chim CGG	0,5 $\mu$ M
DNT Ps GC Rich	500 $\mu$ M

**b) Mix B**

REACTIVOS	CONCENTRACION EN LA REACCIÓN
Agua	CN volumen final 30 $\mu$ l
Buffer 3	2,25M
Enzyme Mix	0,5 U

Los productos del PCR 3 se corrieron en un secuenciador ABI 3130 GENETIC ANALYZER APPLIED BIOSYSTEM, el polímero Pop-4 y el marcador DS-32 en el Banco de Órganos y Tejidos en el Hospital de Clínicas, y Pop-7 y el marcador DS-32 en el servicio UBP del Instituto Pasteur Montevideo siguiendo las condiciones del trabajo de Filipovic-Sadic et al (2010), utilizando los primers SXF Fluo F y R, el R está marcado con el flurocromo FAM para su visualización en el equipo de electroforesis capilar. Por cada reacción se puso de 1 µl de producto de PCR sin purificar con 12 µl de Formamida Hi-Di™, (Applied Biosystems, Foster City CA) y 2 µl de Marcador LIZ 1200. La desnaturalización se realiza durante 2 min a 95 °C seguido de 4 °C, la inyección usada en el equipo es de 2,5 kV, 20 s y el tiempo de corrida es 2400 sec.

#### Análisis de los resultados de la Electroforesis Capilar.(EC)

El análisis del tamaño de los fragmentos obtenidos por la electroforesis capilar se realizó utilizando el programa Peak Scanner™ Versión: 1.0 2006. Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com).

### **Secuenciación**

El producto de PCR de las mujeres en donde se observa una única banda en el gel de agarosa, se envía sin purificar a la empresa Macrogen en Corea. Allí se secuencian las dos hebras del ADN por el método de Sanger, usando los mismos primers que para el PCR. El análisis de los electroferogramas incluye la lectura visual y anotación manual de toda la secuencia de repetidos CGG en ambos sentidos directo y reverso de las dos hebras (ambos alelos) utilizando el programa Bioedit Sequence Alignment Editor.

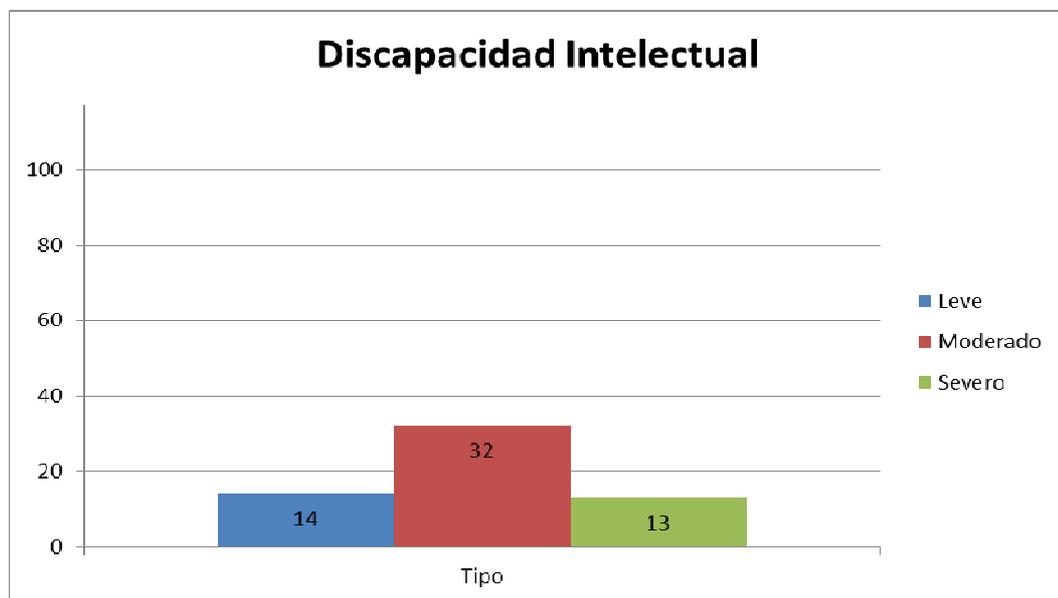
También se analizaron las secuencias de varios pacientes heterocigotos con alelos normales y con alelos en el rango de premutación hasta 80 repetidos CGG. En estos pacientes se realizó la purificación de las bandas visualizadas en el gel utilizando el kit

PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification COMBO de Invitrogen, siguiendo el protocolo adjunto al producto. Se anotaron las ubicaciones de las interrupciones de trinucleotidos AGG dentro de la secuencia de repetidos CGG.

## RESULTADOS

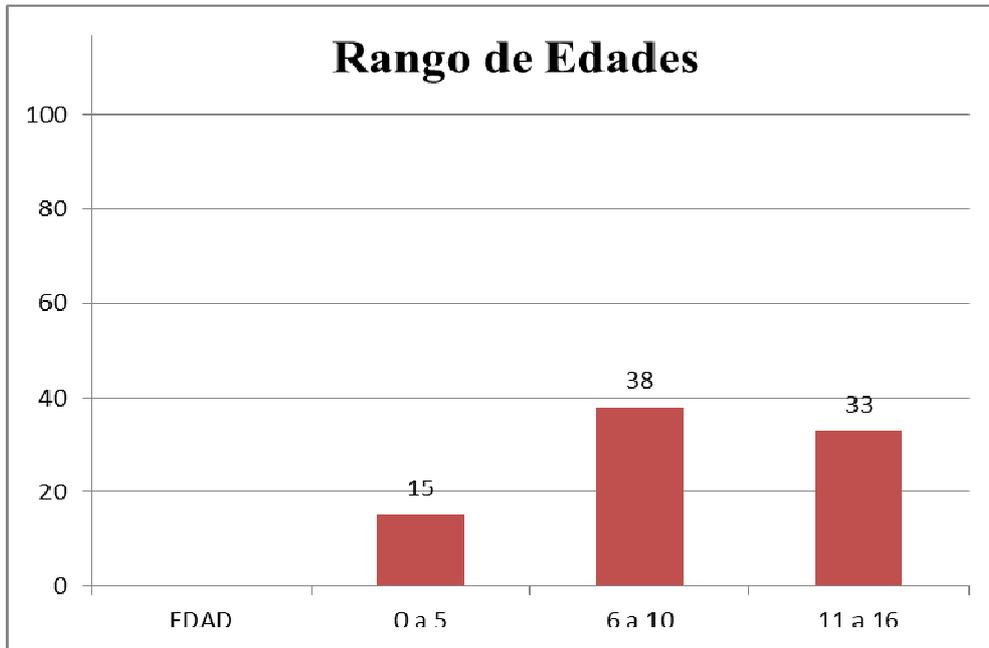
### **Población 1: Niños con DI, malformaciones y /o dismorfias con alteraciones conductuales.**

Se incluyeron niños con los siguientes Criterios: DI moderada a severa, y que presentaban además al menos una de las siguientes características: historia familiar de DI, retardo del crecimiento, y dismorfias y/o malformaciones congénitas. Se analizaron un total de 117 pacientes estos estaban incluidos en un proyecto financiado por la ANII en el año 2011 titulado: “Genética clínica y molecular del retardo mental” cuyo objetivo general fue contribuir a estudiar las características de la población uruguaya con retraso del neurodesarrollo y DI. Del total de 117 pacientes: 71 eran niños y 46 niñas. En la **figura 15** se observan el tipo de DI presente en esta población (leve, moderado, severo) con un total de 59 pacientes que se registraron en la base de datos. El resto de los pacientes no se encontramos registro del tipo de DI que presentaban.

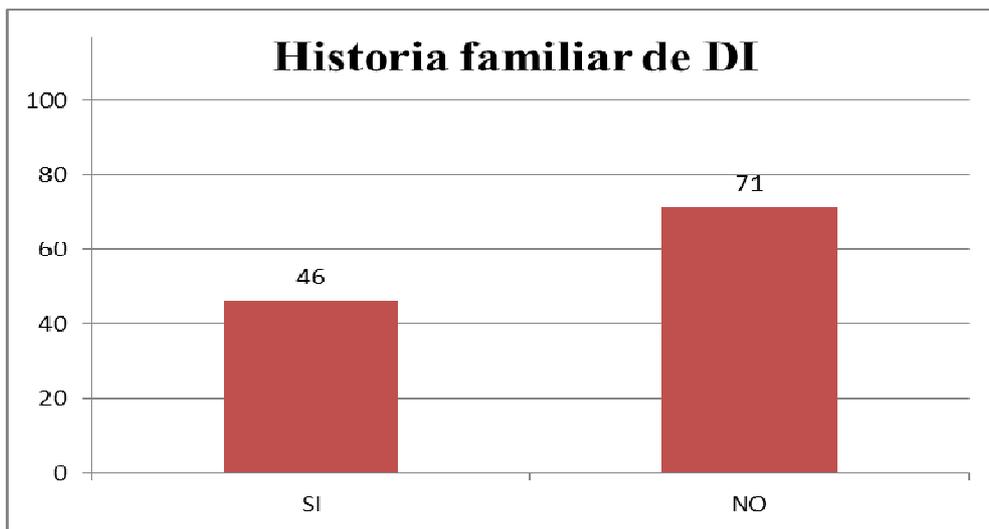


**Figura 15:** Se muestra el tipo de DI que se presenta en la población estudiada, se tomaron n=59 que son los registros en la base de datos.

El rango de edades de los pacientes registrados en la base de datos (n=86) se muestra en la **figura 16** y la historia familiar con / sin antecedentes de DI en la **figura 17** se muestra los datos con un n=117 registros en la base de datos.



**Figura 16:** Se muestra el rango de edades de la población estudiada, se tomó n=86 que son los registros en la base de datos.



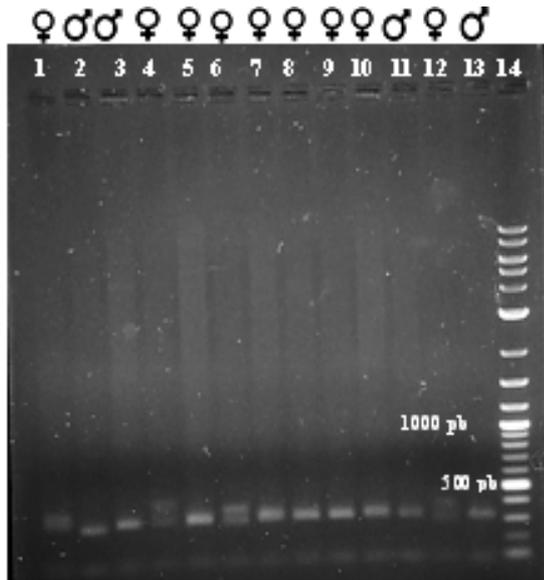
**Figura 17:** Se muestra la asociación de historia familiar de DI en la población estudiada (n=117)

### Determinación del número de repetidos CGG en la población 1

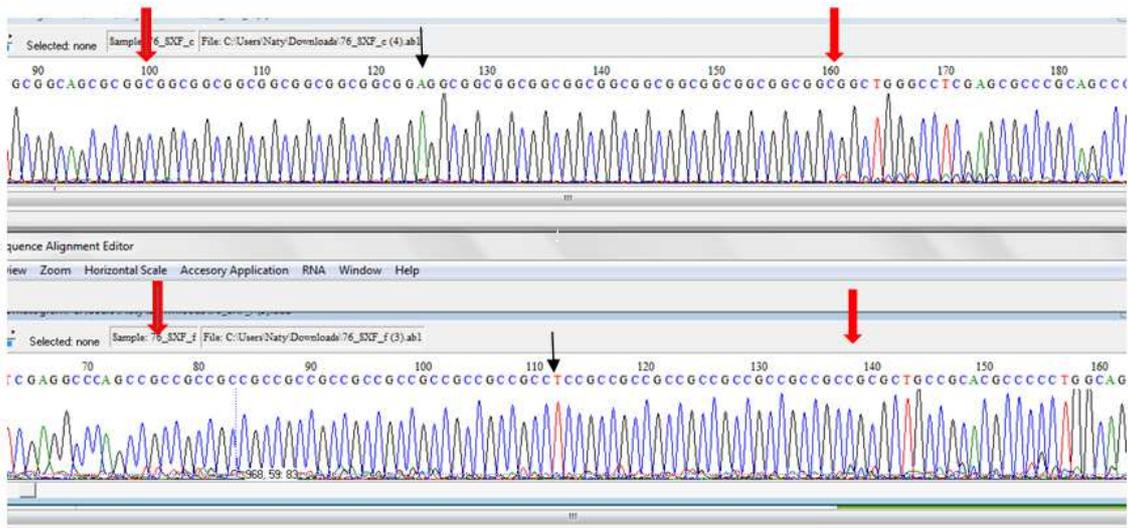
En el diagrama de flujo que se muestra en materiales y métodos se define la estrategia utilizada para determinar el número de repetidos tanto en varones como en las mujeres. A toda la población 1 se realizó en primer PCR (screening) en la **figura 18** se muestra algunos pacientes a modo de ejemplo.

Los resultados que observamos en la población 1 fueron los siguientes: en todos los varones que les realizamos el primer PCR obtuvimos una banda de amplificación cuyo tamaño fue menor a 45 repetidos CGG en todos los casos, lo que indica que no presentan una mutación en el gen. Estos pacientes fueron informados como normales, no portadores de una MC y/o PM (ver informe en el anexo). Dos de estas muestras se secuenciaron con el método de Sanger para usar como controles internos de la técnica. (**Figura 19**).

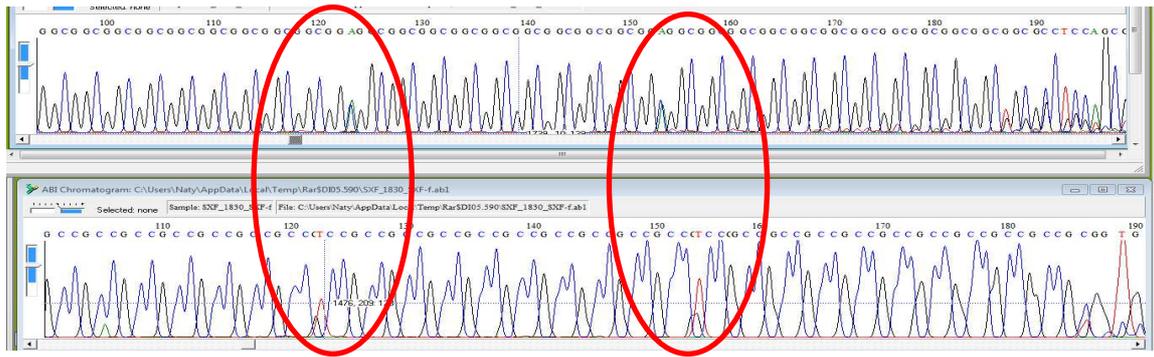
De las 42 niñas analizadas, en 29 se visualizaron en el gel de agarosa al 2% dos bandas correspondientes a ambos alelos del gen (portadoras de dos alelos menores a 45 CGG). Se informaron cómo no portadoras de una mutación en el gen FMR1. (Ver informe en el anexo). El resto (13 niñas) se observó una sola banda menor a 45 CGG que se secuenciaron. Por medio de la secuenciación se resolvieron 10 niñas por la lectura del electroferograma por visualización de polimorfismos se observaron dos alelos de tamaño similar ( $\pm 3$  repetidos CGG) determinándose el número exacto de repetidos CGG (**figura 20**). Por esta técnica también se resolvieron las interrupciones AGG, pero no se puede discriminar a que alelo pertenecen ya que en la secuencia se visualizan ambos. Las 3 niñas restantes que no se resolvieron por secuenciación donde observamos un solo alelo sin la presencia de polimorfismos (**figura 21**). Para hacer el diagnóstico diferencial de estas niñas (expansión u homocigota normal), seguimos con el protocolo establecido por *Tassone et al*<sup>66</sup>, en estas pacientes se realizó el PCR TP-PCR como se describe en el apartado de materiales y métodos y solo logramos amplificar el alelo normal, estas pacientes fueron candidatas para SB, se citarán nuevamente para repetir la muestra.



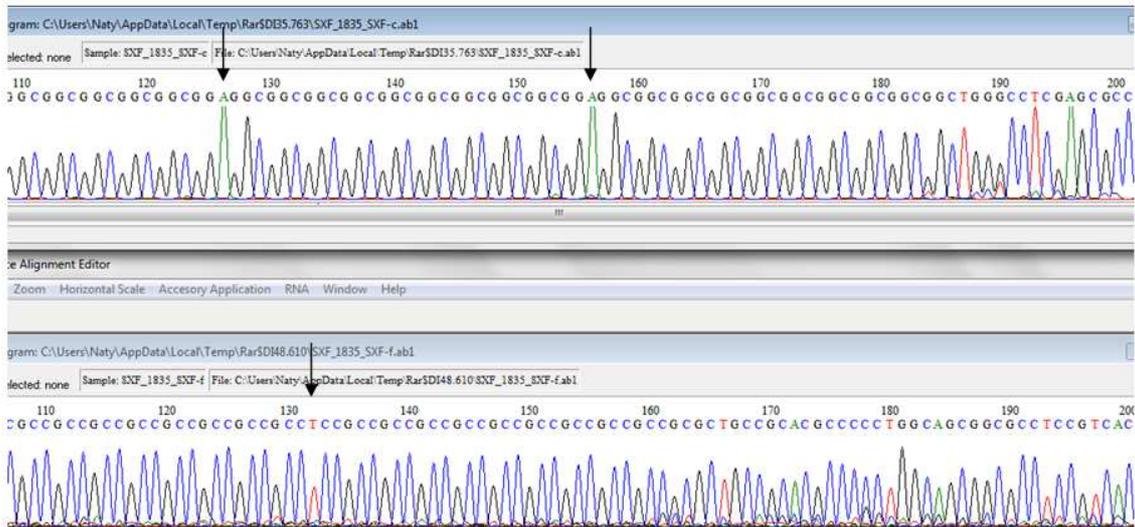
**Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 2% tenido con Gel Red del producto de PCR hasta 50 repetidos CGG del gen FMR1.** Carriles 1,4 ,6 ,12 niñas heterocigotas normales. Carriles 5,7, 8, 9, 10 Niñas con una sola banda, Carriles 2, 3 11 y13 varones normales. 14 Marcador de peso molecular de 100bp 2-Log DNA Ladder BioLabs.



**Figura 19: Electroferograma del producto de PCR del gen FMR1.** Secuencia de un varón para control interno del PCR. Arriba usando cebador f (directo) que hibrida hacia el 5´ de la secuencia repetida CGGn. Abajo usando el cebador c (reverso) de la secuencia que hibrida hacia el 3´. Las flechas rojas indican el principio y fin de las secuencia de repetidos CGG, la flecha delgada indica la única interrupción AGG.



**Figura 20: Electroferograma del producto de PCR del gen FMR1:** Secuencia de una niña heterocigota 29/30 CGG. Arriba usando cebador f (directo) que hibrida hacia el 5' de la secuencia repetida CGGn. Abajo usando el cebador c (reverso) de la secuencia que hibrida hacia el 3'. Se visualizan dos polimorfismos en la secuencia marcados con el óvalo rojo.



**Figura 21: Electroferograma del producto de PCR del gen FMR1:** Secuencia de una niña de un solo alelo observado en el gel de agarosa al 2%. Arriba usando cebador f (directo) que hibrida hacia el 5' de la secuencia repetida CGGn. Abajo usando el cebador c (reverso) de la secuencia que hibrida hacia el 3'. No se visualizan polimorfismos en la secuencia. La flechas delgadas indican las interrupciones AGG.

## Población 2: Pacientes mujeres y varones mayores de 50 años con temblor y ataxias.

Se estudiaron varones y mujeres mayores de 50 años con signos clínicos de temblor de intención y ataxia con alteraciones cognitivas. Se identificaron 18 pacientes, 5 varones y 13 mujeres con un rango de edades de 52 hasta 72 años. Los criterios de inclusión siguieron las pautas diagnósticas de FXTAS de Berry Kravis (Pediatr Neurol 2014) (ver anexo). Un total de 10 pacientes fueron casos de Ataxia de causa indeterminada, 2 casos de parkinsonismo atípico con deterioro cognitivo, 4 casos de temblor intencional y 2 casos con diagnóstico clínico de atrofia multisistémica tipo C. Dos de las 13 mujeres son hermanas con antecedentes de historia familiar con SXF (FXTAS 16 y 17). A todos los pacientes se les realizó el primer PCR, los resultados se muestran en la **tabla 4**:

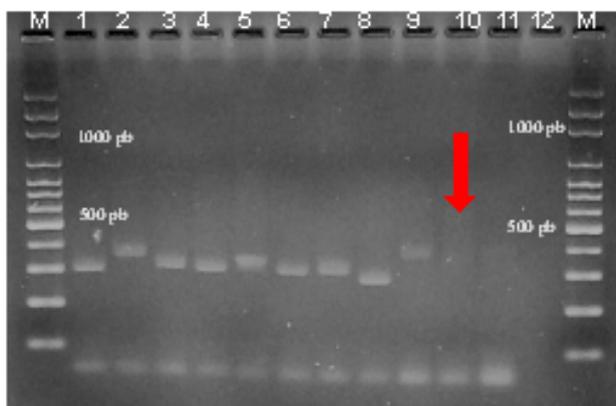
**Tabla 4:**

Pacientes	Sexo	Resultados
FXTAS 1	Masculino	No se visualizó Banda (posible expansión)
FXTAS 2	Masculino	Normal
FXTAS 3	Femenino	Normal
FXTAS 4	Femenino	Normal
FXTAS 5	Femenino	Una solo alelo de 20 CGG (secuenciación)
FXTAS 6	Femenino	Normal
FXTAS 7	Femenino	Normal
FXTAS 8	Femenino	Normal
FXTAS 9	Femenino	Normal
FXTAS 10	Femenino	Normal
FXTAS 11	Femenino	Una solo alelo de 30 CGG (secuenciación)
FXTAS 12	Masculino	Normal
FXTAS 13	Femenino	Dos alelos de 43 y 45 CGG (secuenciación)
FXTAS 14	Masculino	Normal
FXTAS 15	Masculino	Normal
FXTAS 16	Femenino	Una sola Banda de 23 CGG (secuenciación)
FXTAS 17	Femenino	Normal Dos alelos 23 y 30 CGG(secuenciación)
FXTAS 18	Femenino	Normal

Hermanas  
 con Historia  
 Familiar de  
 SXF

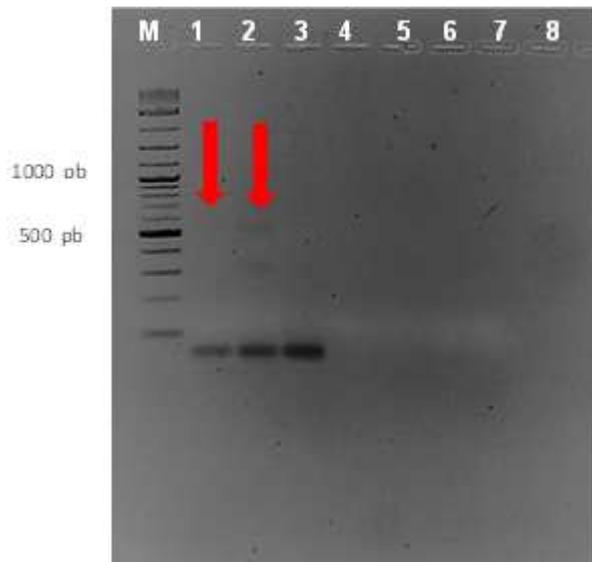
Como se observa en la **Tabla 4**, solo uno de los pacientes varones FXTAS 1 es probable portador de una expansión ya que no se visualiza una banda de amplificación con el primer PCR. (**Figura 22**)

El paciente FXTAS1 tenía 53 años al momento de la consulta y presentó temblor cefálico y de miembros superiores de intención, ataxia cerebelosa leve y parkinsonismo. En la esfera neuropsicología se observó un deterioro cognitivo leve. La Resonancia magnética de cráneo mostró el característico “Signo del Pedúnculo Cerebeloso Medio” Este es el primer caso descrito con diagnóstico molecular y clínico de FXTAS en Uruguay.



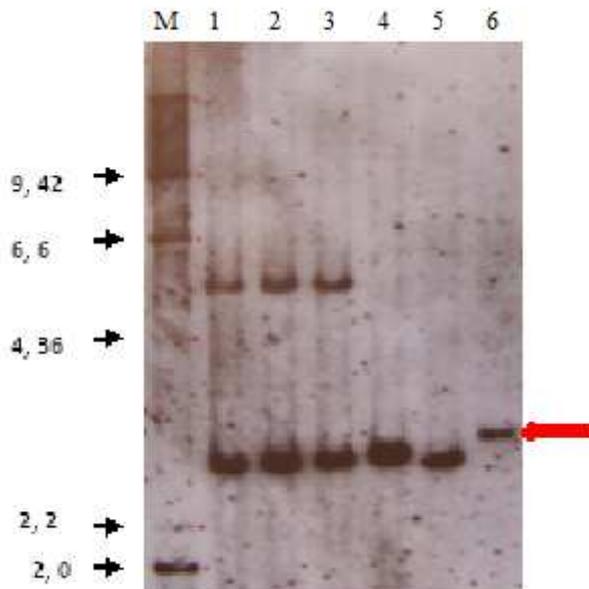
**Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del gen FMR1** M: Marcador de peso molecular 100pb 2-Log DNA Ladder BioLabs. Carriles 2, 3,4, 6, 7,8: varones normales. Carriles 2 y 5: mujeres con una sola banda amplificada, carril 9: Control interno varón 50 CGG, carril 10 paciente II2 probable portador de un alelo en el rango de premutación. Carril 11 control negativo.

El diagnóstico molecular se confirmó con el segundo PCR donde observamos una banda a la altura de 600 pb del marcador de peso molecular, se estimó que el número de repetidos de este paciente corresponde a 85 (+/- 3) CGG (**Figura 23**). La estimación se realiza en base al tamaño del producto de amplificación del PCR. (Ver anexo). Más adelante volveremos a este paciente a través de su genealogía.



**Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del gen FMR1 M:** Marcador de peso molecular 100pb 2-Log DNA Ladder BioLabs, Carril 1: Paciente III1 portador de un alelo premutado estimado 85 CGG (Flecha), Carril 2: Paciente III1 se observan dos alelos uno en el rango normal y otro en el rango de premutación estimado 85 CGG (Flecha). Carril 3: control negativo.

Como se muestra en la **figura 24** confirmamos el diagnóstico del paciente por Southern Blot mediante el análisis del DNA genómico con enzimas de restricción que detectan la metilación y posterior hibridación con sondas específicas marcadas con radioactividad, esta técnica se realizó en un laboratorio de referencia: Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina a cargo del Dr. Alberto Rosa y Dra. Carla Bidinost.



**Figura 24: Southern Blot del Paciente FXTAS1** M: Marcador peso molecular ( $\lambda$  – HindIII) Carriles: 1, 2, 3: Pacientes mujeres normales Carril: 4: Paciente varón normal (alelo de 32 repeticiones) 5: Paciente varón normal (alelo de 28 repeticiones) 6: EL Paciente II2 varón con FXTAS con una expansión en el rango de premutación.

En los 4 varones restantes mediante el primer PCR observamos una banda menor a 45 repetidos CGG. Estos pacientes fueron informados como no portadores de mutaciones en el gen FMR1. De las 11 mujeres analizadas, 7 son heterocigotas (dos bandas menores a 45 CGG) que se visualizaron en un gel de agarosa al 2% y se informaron cómo no portadoras de una mutaciones en el gen FMR1.

En las 4 mujeres restantes observamos una sola banda por lo tanto se secuenciaron. Con la lectura de las secuencias pudimos solo resolver una paciente FXTAS 13, tiene dos alelos de 43 y 45 repetidos CGG. Uno de sus alelos se encuentra en la zona gris (45-54 repeticiones CGG).

Las otras 3 pacientes quedaron sin resolver hasta el momento: FXTAS 5, 11 y 16 con la lectura del electroferograma pudimos concluir que tenían un solo alelo con el número de repetidos que indica en la **tabla 4**. Una de ellas, FXTAS 16, es pariente de un paciente con SXF estamos a la espera de nueva muestra para realizarles SB.

### Población 3 a) Familias de pacientes con resultado molecular positivo para la mutación y/o premutación del FMR1.

En total se estudiaron 5 Familias con historia familiar de SXF, 3 se ellas se contactaron con la policlínica de genética del CHPR a través de la Asociación Síndrome X Frágil Uruguay. Y las otras 2 fueron diagnosticadas por primera vez en nuestro laboratorio.

#### Familia 1723N

1723N



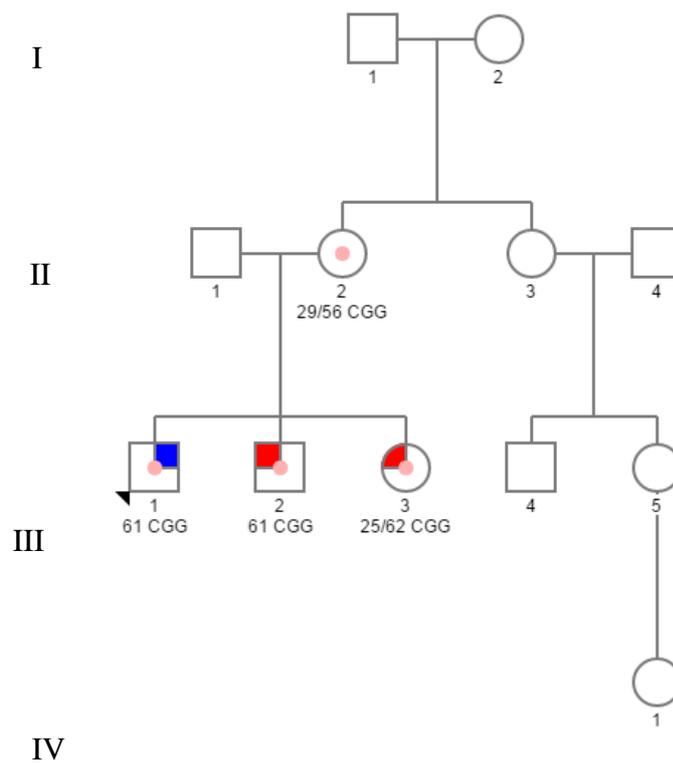
TDAH



Trastorno de Aprendizaje



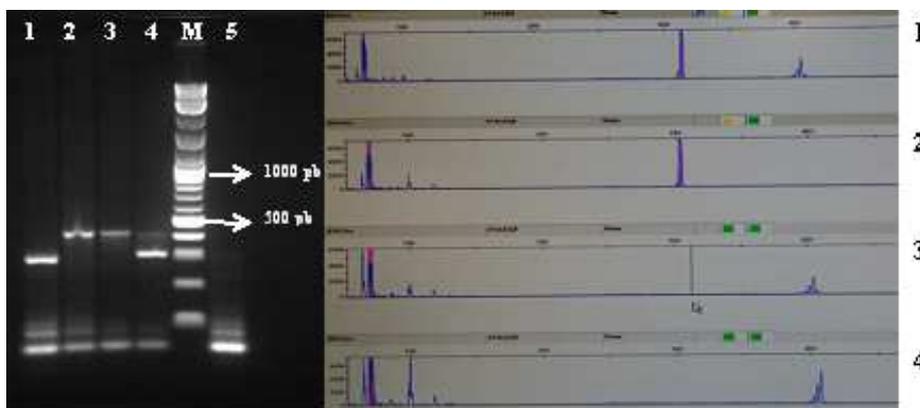
Portador PM



La genealogía de la familia 1723N presenta cuatro generaciones con un espectro de desórdenes relacionados con el SXF. El caso índice III1, es el primer hijo de una pareja no consanguínea, actualmente tiene 21 años y es portador de una premutación de 61 repetidos CGG, presenta dificultad en el aprendizaje y trastorno del lenguaje, actualmente está cursando en Facultad de Medicina, UdelaR. El individuo III2 es hermano del caso índice como se observa en la genealogía y también es portador de una premutación de 61 repetidos CGG, actualmente tiene 19 años y presenta TDAH en tratamiento. El individuo III3 tiene un alelo de 25 repetidos CGG y es portadora de un alelo premutado de 62 repetidos CGG, actualmente tiene 17 años y presenta TDAH.

La madre del caso índice es II2 tiene un alelo de 29 repetidos CGG y es portadora de un alelo premutado de 56 repetidos CGG. La hermana II3 tiene dos hijos III4 y III5 que también refieren que tienen dificultad en el aprendizaje. El individuo IV1 tiene TDAH ninguno de ellos tiene diagnóstico molecular.

El diagnóstico molecular de la familia 1723 fue realizado usando el primer PCR con los primers c y f y luego se visualizó los alelos con un gel de agarosa al 2% (**Figura 22 A**), se recortó las bandas y se secuenciaron. También se realizó el segundo PCR con los primers SXF fluo para electroforesis capilar. (**Figura 22B**)



**Figura 22 A: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del gen FMR1 de la Familia 1723.** M: Marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder BioLabs. ; 1 paciente varón normal, 2 y 3, pacientes III1 y III2 portadores de una expansión en el rango de premutación; 4 paciente II2 heterocigota con un alelo normal y otro alelo en el rango de premutación, 5 control negativo. **22 B:** Corrida de los mismos Pacientes en Electroforesis Capilar: 1: Paciente II2 portadora de una premutación .2: Varón normal, 3 y 4: Pacientes III1 y III2 respectivamente, ambos portadores de una premutación del gen FMR1. . El eje de la y corresponde a la amplitud de los picos de la fluorescencia y en el eje de las X corresponde el tamaño en pb de los picos.

Los productos de PCR de estos pacientes se mandaron a secuenciar para determinar el número de repetidos y la estabilidad de sus alelos, en la **Tabla 5** se muestran los resultados de la secuencias incluyendo las interrupciones AGG.

**Tabla 5 secuencias de la familia 1723.**

<b>Individuo</b>	<b>Número de Repetidos</b>	<b>AGG</b>
II2 (1723N)	29/56 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG (CGG) <sub>36</sub>
III1 (1724N)	61 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG (CGG) <sub>41</sub>
III2 (1725N)	61 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG (CGG) <sub>41</sub>
III3 (1726N)	25/62 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG (CGG) <sub>42</sub>

**Familia del paciente FXTAS 1. (Paciente diagnosticado en la población 2)**

La genealogía FXTAS 1 muestra una familia de 4 generaciones. El caso índice II2 es portador de un alelo premutado de 85 repetidos CGG , su fenotipo se describe con la población 2. El individuo III1 hija del caso índice que es una profesional de 30 años es heterocigota portadora de un alelo normal de 29 CGG y otro premutado de 90 CGG (**figura 25**), al momento de la consulta no refiere ningún síntoma a destacar. El individuo II3 hermano del caso índice tiene un alelo normal de 31 CGG y por último el individuo IV1 que al momento no se le ha realizado el estudio clínico y molecular.

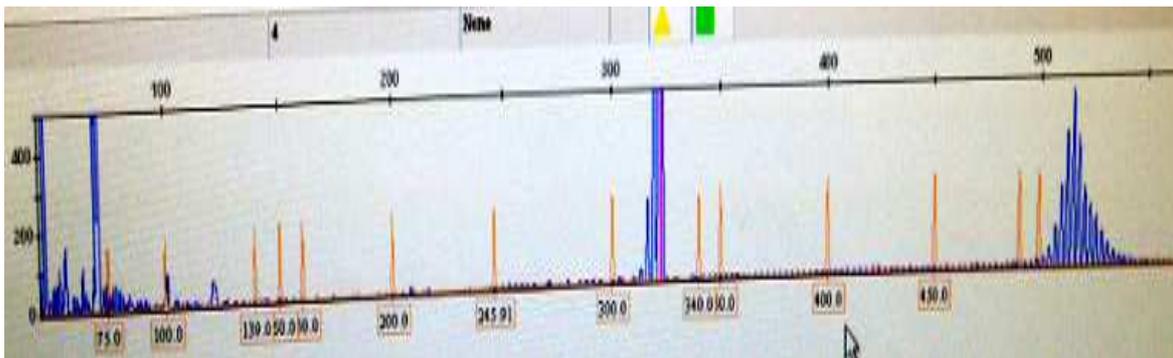
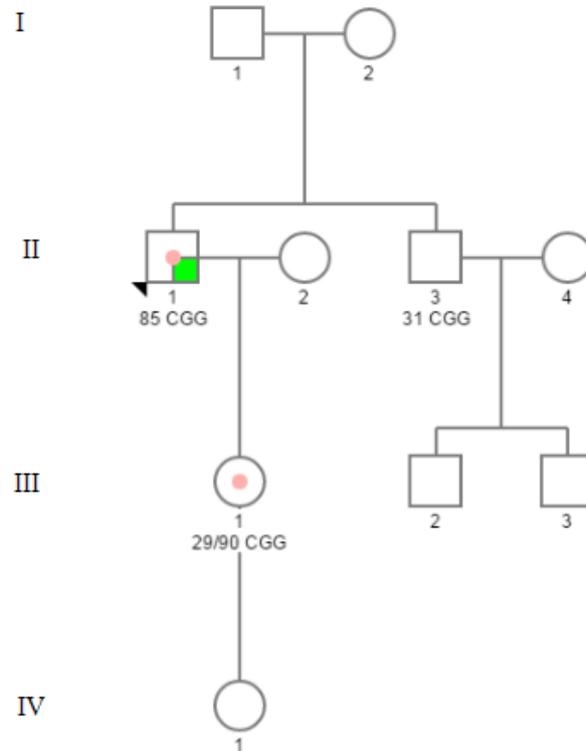
FXTAS1



FXTAS



Portador PM

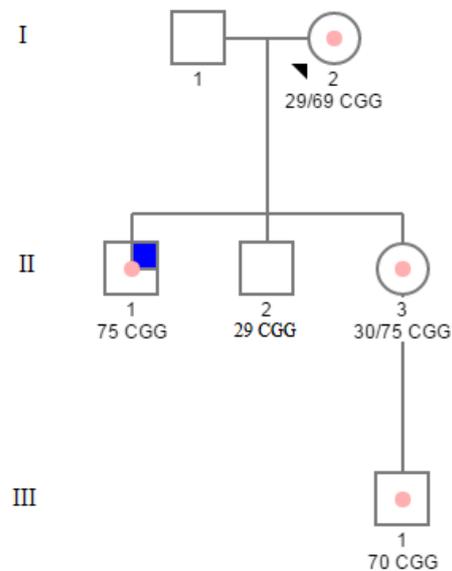
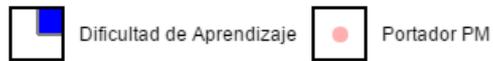


**Figura 25:** Electroforesis capilar de la paciente III1 identificada como 1666N donde se observan dos picos (color azul) uno de 330 pb y otro de mayor a 500 pb que al realizar la conversión, da un tamaño de 29 y 90 CGG (+3 CGG) repetidos CGG respectivamente. . El eje de la y corresponde a la amplitud de los picos de la fluorescencia y en el eje de las X corresponde el tamaño en pb de los picos

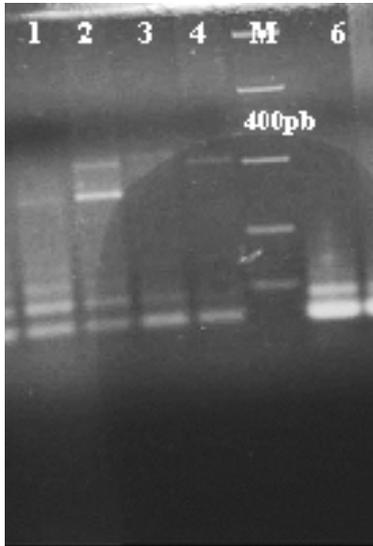
### Familia 1773N

La siguiente genealogía de tres generaciones corresponde a la Familia 1773N, con historia familiar con SXF<sub>2</sub>, el caso índice es la paciente I2 que tiene actualmente 35 años y es portadora de un alelo premutado de 69 repetidos CGG. El individuo II1 tiene actualmente 21 años y es portador de un alelo premutado de 69 repetidos CGG. El individuo III1 tiene actualmente 2 años y es portador de un alelo premutado de 75 repetidos CGG la anamnesis se desprende que tiene de dificultad de aprendizaje, el individuo II2 tiene 20 años y posee un alelo de 29 repetidos CGG por lo tanto no presenta una mutación en el gen y el individuo II3 es una mujer de 19 años y es portadora de un alelo premutado de 75 CGG tiene un hijo III1 que tiene 2 años de edad y posee un alelo premutado de 70 repetidos CGG.

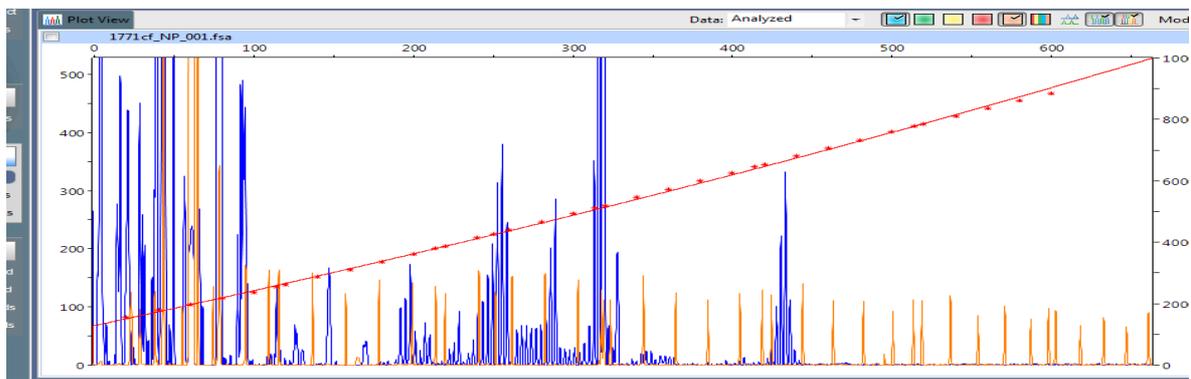
1773 N



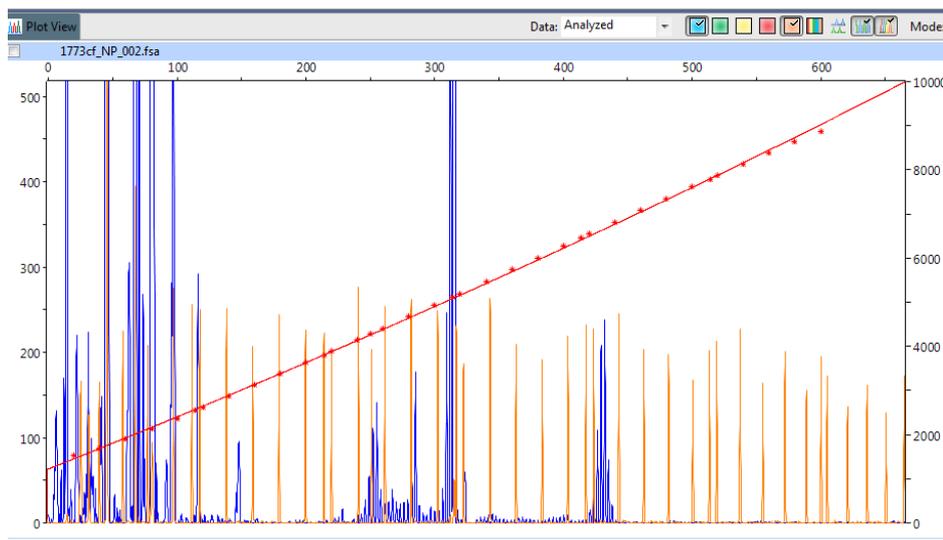
Se realizó el diagnóstico molecular usando el primer PCR y luego se visualizó los alelos con un gel de agarosa al 2% (**figura 27**) se recortó las bandas y se mandaron a secuenciar. Como se muestra en las **figuras 28 y 29** se realizó el segundo PCR con los primers SXF fluo y se visualizó por E.C.



**Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR del gen FMR1 :** Marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder Biosystems. Carril 1: Paciente I2 se observan dos alelos: uno en el rango normal de 29 CGG y otro alelo premutado estimado en 69 CGG. Carril 2: Paciente II3 se observan dos alelos uno en el rango normal de 30 CGG y otro en el rango de premutación estimado 75 CGG, Carril 3: Paciente III se observa un alelo en el rango de premutación estimado en 75 CGG. Carril 4 control positivo paciente de 70 repetidos CGG.



**Figura 28: Electroforesis capilar de un paciente II3 identificado como 1771 N:** Se observan dos picos (color azul) uno de 319 pb y otro de 435pb que al realizar la conversión, da un tamaño de 30 y 75 (+-3 CGG) repetidos CGG respectivamente. El eje de la y corresponde a la amplitud de los picos de la fluorescencia y en el eje de las X corresponde el tamaño en pb de los picos



**Figura 29 Electroforesis capilar de un paciente I2 identificado como 1773N** donde se observan os picos (color Azul) uno de 315 pb y otro de 432pb que al realizar la conversión, da un tamaño de 28 y 69 (+3 CGG) repetidos CGG respectivamente. El eje de la y corresponde a la amplitud de los picos de la fluorescencia y en el eje de las X corresponde el tamaño en pb de los picos.

Los productos de PCR de estos pacientes se mandaron a secuenciar para determinar el número de repetidos y la estabilidad de sus alelos, en la **Tabla 6** se muestran los resultados de la secuencias incluyendo las interrupciones AGG.

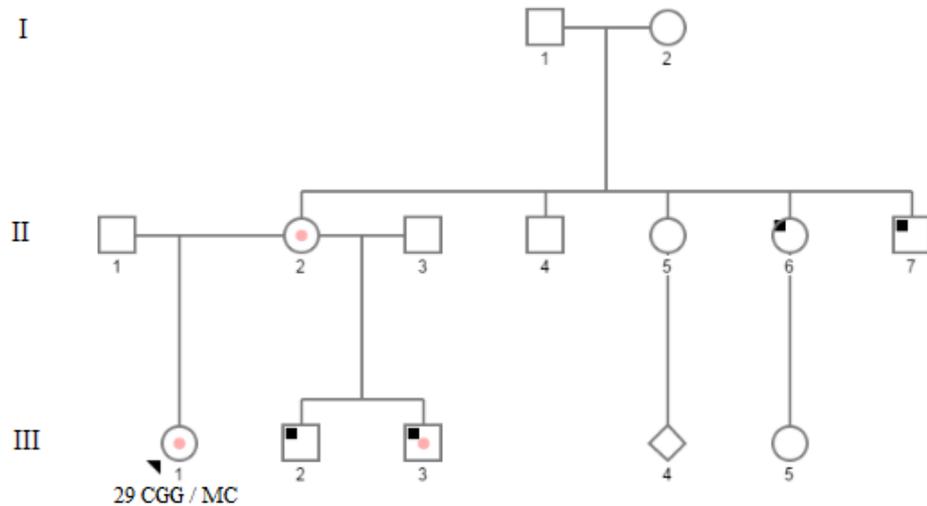
**Tabla 6: Secuencias de la familia 1773N**

Individuo	Número de Repetidos	AGG
I2 (1773N)	29/69 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>49</sub>
III1 (1770N)	75 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>55</sub>
II2 (1772N)	29 CGG	N/D
II3 (1771N)	30/75 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>55</sub>
III1 (1926N)	70 CGG	(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>9</sub> AGG(CGG) <sub>50</sub>

## Genealogía de la familia 1835.

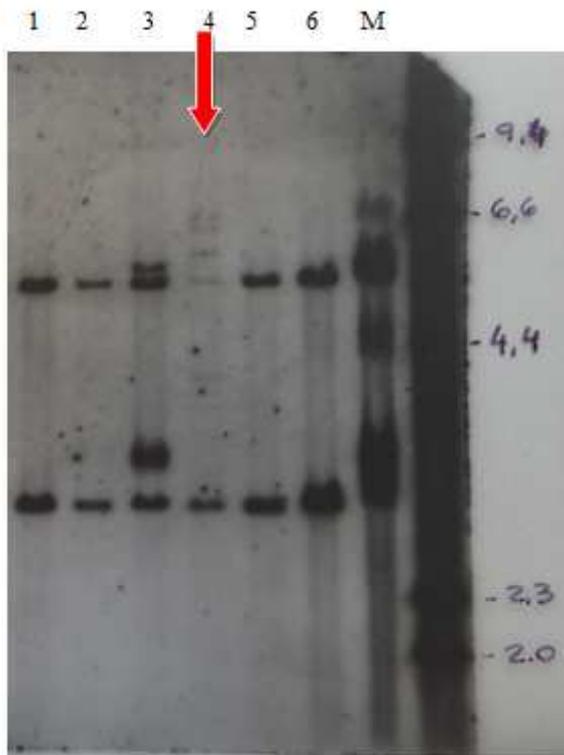
1835

Portadora PMMC    DI



La siguiente genealogía de tres generaciones corresponde a la Familia 1835, con historia familiar con SXF, el caso índice es la paciente III1 que presenta dos alelos 29CGG/ MC, de la anamnesis se desprende que es “sana” no se visualizan rasgos fenotípicos asociadas a mutaciones en el gen FMR1. Su madre II2 es portadora de la PM, tiene 34 años y terminó primaria el individuo III2 tiene DI y el individuo III3 con DI es portador de una MC para el gen FMR1 (Diagnóstico realizado en otro laboratorio). De la anamnesis se establece que los individuos II6 y II7 tienen DI y no tienen estudios realizados para determinar si tiene PM y/o MC del gen FMR1.

A la paciente III1 nuestro caso índice y a su madre II2 se realizó el primer PCR donde se visualizó una sola banda (dato que no se muestra), como indica el protocolo se realizó secuenciación donde no se pudo visualizar polimorfismos determinando así que podrían ser portadoras un alelo expandido o en su defecto homocigotas. No se realizó un segundo PCR para preservar el ADN para SB. Solo se mandó el ADN del individuo III1 para SB cuyos resultados se muestran en la **figura 30**.



**Figura 30: Southern Blot para determinar expansiones mayores a 200 CGG:** M: Marcador peso molecular ( $\lambda$  – HindIII) Carriles: 1, 2, 5 y 6: mujeres normales, Carril 3 mujer portadora de una expansión mayor a 200CGG se observan ambos alelos el normal y otro en el rango de PM y el alelo con MC, carril 4 se observa a la paciente III1 presenta un alelo PM/MC.

### Familia 1879 N

La siguiente genealogía de tres generaciones corresponde a la Familia 1879, el caso índice es el paciente III1 actualmente tiene 7 años presenta un mosaismo de PM/MC y fue diagnosticado con TEA, actualmente está en tratamiento. Su madre II2 es portadora de la PM sana. Los individuos III2 y III4 de 6 años y 7 meses de edad son sanos y el individuo III3 tiene TEA. Solo se determinó el número de repetidos CGG al caso índice el resto de la familia aún no se pudo determinar se lo va a citar para pedir muestra para el diagnóstico.

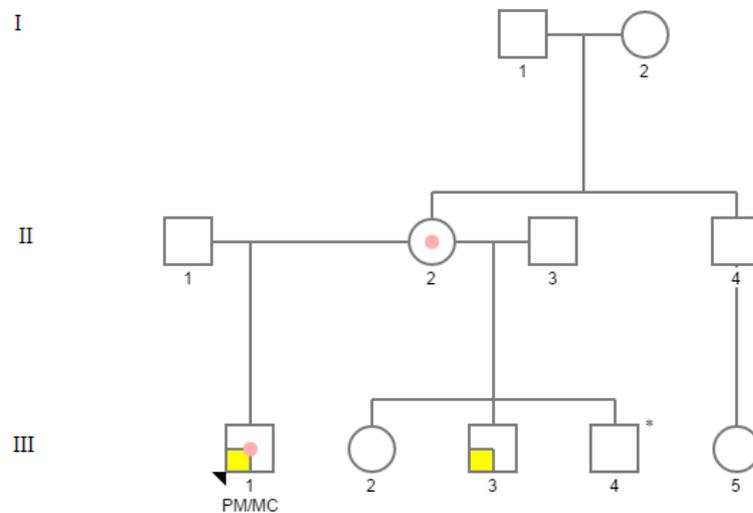
1879 N



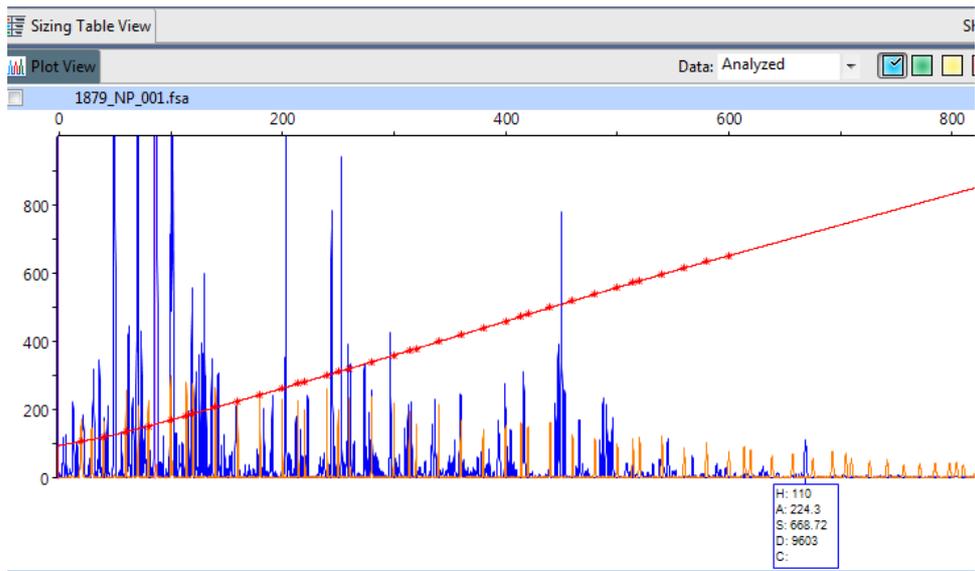
TEA



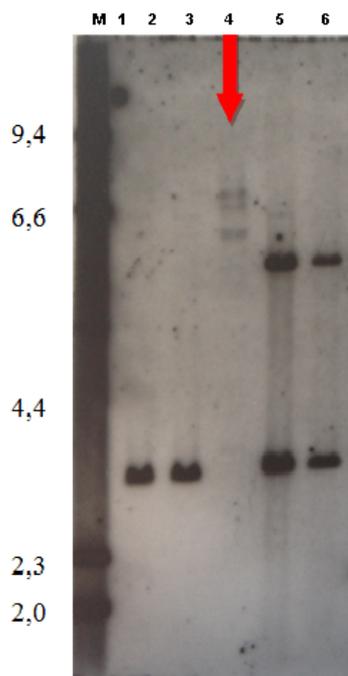
Portadora de PMMC



Se realizó el diagnóstico molecular usando el primer PCR y no se visualizó producto de amplificación, luego realizamos el TP-PCR con el primer quimérico y se visualizó por electroforesis capilar (**figura 31**). El ADN del paciente fue enviado para SB y los resultados se muestran en la **figura 32**.



**Figura 31 Electroforesis capilar del paciente III1 identificado como 1879 N** donde se observan varios picos (color Azul) uno los más prominentes son de 432, 495 y 668 pb que al realizar la conversión, de 69, 127 y 184 (+3 CGG) repetidos CGG. Los picos naranjas corresponden al control interno de la técnica. El eje de la y corresponde a la amplitud de los picos de la fluorescencia y en el eje de las X corresponde el tamaño en pb de los picos.



**Figura 32: Southern Blot para determinar expansiones mayores a 200 CGG:** M: Marcador peso molecular ( $\lambda$  – HindIII) Carriles: 1, 2, varones normales, Carril 3 el individuo III1 varón portador de una expansión mayor a 200CGG, carril 4 y 5 mujeres normales.

Población 3 b) Pacientes con trastornos neuroconductuales que se asocian a la premutación

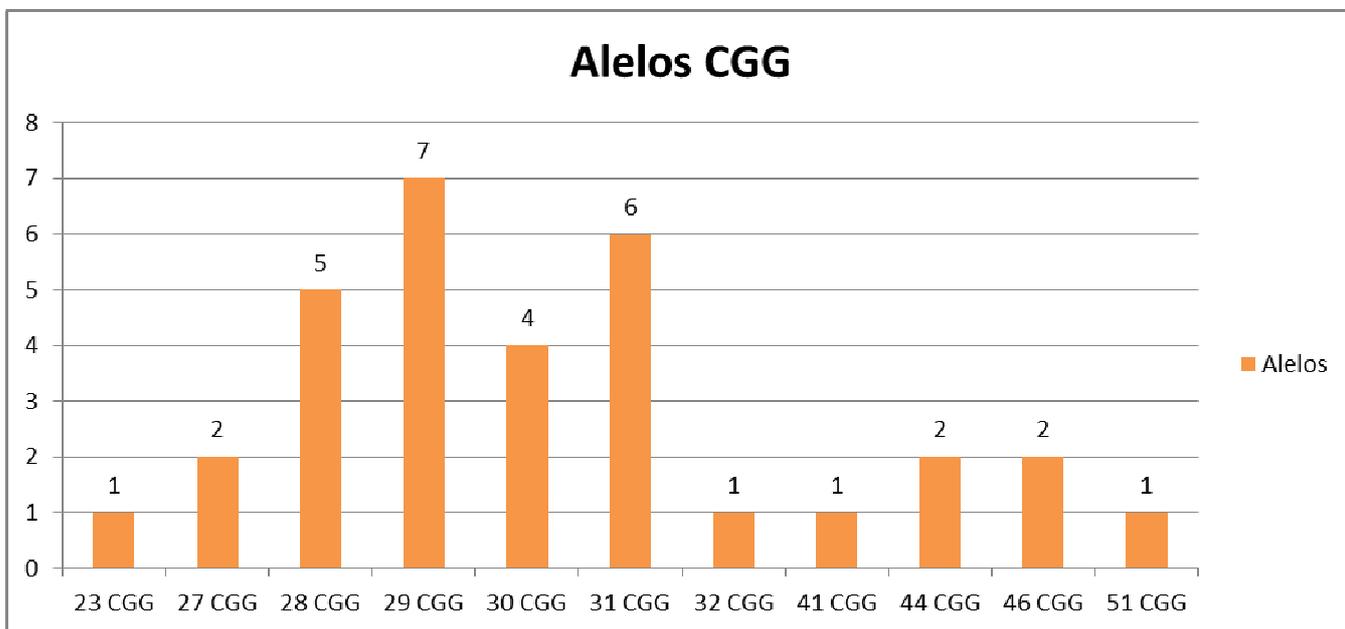
A continuación se presenta la **tabla 7** con los resultados en un total de 54 pacientes que cumplen los criterios mencionados en el enunciado.

Nº Muestra ADN	Sexo	Resultados	Nº Muestra ADN	Sexo	Resultados
1660N	M	Normal	1612N	F	Normal
1670N	M	Normal	1624N	F	Normal
1671N	M	Normal	1645N	F	Normal
1672N	M	Normal	1673N	F	Normal
1682N	M	Normal	1690N	F	Normal
1697N	M	Normal	1717N	F	Normal
1718N	M	Normal	1735N	F	Normal
1730N	M	Posible Premutado	1802N	F	Posible Premutada
1747N	M	Normal	1814N	F	Normal
1774N	M	Normal	1815N	F	Posible Premutada
1778N	M	Normal	1816N	F	Normal
1792N	M	Normal	1830N	F	Normal
1793N	M	Normal	1847N	F	Normal
1799N	M	Normal	1870N	F	Normal
1805N	M	Normal	1877N	F	Normal
1806N	M	Normal	1883N	F	Normal
1807N	M	Normal	1895N	F	Normal
1817N	M	Normal	1899N	F	Posible Premutada
1851N	M	Normal	1908N	F	Normal
1865N	M	Normal	1927N	F	Normal
1871N	M	Normal			
1879N	M	Mutación Completa			
1886N	M	Normal			
1893N	M	Normal			
1898N	M	Normal			
1900N	M	Normal			
1902N	M	Normal			
1905N	M	Normal			
1906N	M	Normal			
1914N	M	Normal			
1915N	M	Normal			
1918N	M	Normal			
1920N	M	Normal			
1921N	M	Normal			

De los resultados presentados en la **tabla 7** con un total de 54 pacientes con trastornos neuroconductuales como TEA y TDAH: 49 del total se informaron cómo no

portadores de una PM y/o MC en el gen FMR1. Dos pacientes varones con sospecha de tener un alelo con una PM y/o MC: El paciente 1789N fue confirmado y cuya genealogía ya se describió anteriormente en la población 3 y el paciente 1730 la extracción de ADN dio una baja concentración (4 ng/μl) y no se pudo realizar ningún estudio más. Hasta la fecha no se pudo realizar el contacto para repetición de muestra.

Para la realización del grafico que se presenta en la **figura 31** se utilizaron las secuencias de los alelos de 28 pacientes de la poblaciones 1, 2, 3a y 3b. Dado que todos los métodos usados tienen un error de  $\pm 3$ , no es posible determinar con mayor exactitud.



**Figura 31: Grafico de barras que muestran la distribución de repetidos CGG en la Población estudiada: Se utilizó la población 1, 2, 3 a y 3 b.**

## DISCUSIÓN

### **Optimización de métodos para la determinación del número de repetidos en la región 5' del gen FMR1**

Los recientes avances en las tecnologías basadas en la PCR han permitido caracterizar el espectro completo de las expansiones de la región 5' del gen FMR1, incluyendo la evaluación del estado de metilación, y como resultado, se han reducido los casos en el que se deben realizar la técnica estándar de oro: el Southern Blot (SB). El SB continúa siendo necesario para verificar los casos dudosos y para distinguir las mujeres homocigotas de las que tienen un alelo normal y otro expandido. Dado el número de pacientes de nuestro medio, resulta poco práctico optimizar el SB por ser una técnica laboriosa y costosa, por lo tanto nuestra estrategia se dirigió al desarrollo de métodos de PCR y secuenciación que nos permitieran disminuir el número de casos que necesitan SB para ser resueltos y realizar esta técnica en un laboratorio de Córdoba, Argentina con mucha experiencia y que maneja un número anual de casos mucho mayor.

En este trabajo se realizó la puesta a punto de un protocolo propuesto por Tassone *et al.* (2008) para determinar el número de repetidos CGG del gen FMR1. Se pudo implementar el primer y segundo PCR cuya diferencia es la taq polimerasa utilizada y cuyo rango de amplificación para el primero es de 5 a 70 repetidos CGG y para el segundo de 5 a 90 repetidos CGG ambos se visualizan por electroforesis (de agarosa y/o capilar) los varones normales, mujeres heterocigotas normales y expansiones pequeñas de hasta 90 repetidos CGG. Se optimizó el TP-PCR (tercer PCR) que es una técnica robusta y sirve para determinar el número de repetidos hasta 200 CGG, además permite el mapeo de las interrupciones AGG, que influyen en la estabilidad de la expansión de los repetidos CGG como se mencionó anteriormente en este trabajo.

Fue determinante para la puesta a punto el uso de polimerasas (taq platinum (Invitrogen), GCrich systems (Roche Diagnostics) y Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics) en todos los casos agregamos un “*hot start*” en el



Para los pacientes que no se pudieron resolver con los dos primeros realizamos el tercer PCR denominado TP-PCR para la amplificación de números de repetidos hasta 200 CGG y que es seguido de electroforesis capilar, donde se incluyó: a) Mujeres con una sola banda de amplificación y b) Varones donde no se visualiza una banda de amplificación.

En el total de 11 pacientes (1 varón y 10 mujeres) que cumplieron con estos criterios, solo pudimos resolver al único paciente varón donde observamos en la EC varios picos mayores de 100 CGG (figura 29 de resultados) por este motivo valoramos la posibilidad de realizarle el SB para visualizar alelos mayores de 200 CGG (figura 30 de resultados), y cuyo resultado fue el primer varón que diagnosticamos portador de alelos en el rango PM y MC (Mosaico). Este paciente nos permitió resolver un rango de amplificación de hasta 184 repetidos con la técnica de TP-PCR optimizando el rango de las premutaciones diagnosticadas en los pacientes varones. Se estudió a la familia de este paciente la cual discutiremos más adelante en este capítulo.

En las 10 mujeres el TP-PCR no pudo resolver la condición de homocigotas o portadoras de una premutación y se realizó el SB cuyo resultado fue el siguiente: 8 eran mujeres homocigotas normales y 2 portadoras de un alelo expandido mayor a 200 CGG (ambas tenían antecedentes de familiares con SXF). Dado estos resultados para el caso de las mujeres con una sola banda de amplificación y sin polimorfismos en la secuencia, la técnica confirmatoria fue el SB donde se pudo observar el alelo de tamaño 2,8 Kb normal sin metilar y el alelo normal de 5.8 Kb metilado. Para estas pacientes las técnicas de PCRs de los protocolos establecido por Tassone *et al* 2008 y Filipovic *et al* 2010 no pudimos reproducir los resultados obtenidos de ambos protocolos, pensamos que tendríamos que evaluar las condiciones de los ADNs y reactivos utilizados que puedan haber interferido.

## **Correlación genotipo-fenotipo en las poblaciones estudiadas**

En este trabajo se estudiaron 3 poblaciones diferentes debido al espectro de fenotipos que genera la premutación del gen.

### *Población 1: Niños con DI, malformaciones y /o dismorfias con alteraciones conductuales*

El objetivo de estudiar esta población fue evaluar la frecuencia de expansiones del gen FMR1 en niños con discapacidad intelectual (DI) no sindrómica, en el caso de encontrar niños con expansiones en el rango de la mutación completa estaríamos detectando presentaciones atípicas del SXF, y en caso de las expansiones menores a 200 repetidos CGG contribuiríamos al conocimiento del papel de los alelos premutados de FMR1 como genes de predisposición en las DI de etiología multifactorial.

Se realizó el diagnóstico a 117 niños con DI, malformaciones y/o dismorfias, historia familiar de DI y alteraciones conductuales como déficit atencional, hiperactividad, impulsividad, trastornos de espectro autista. Los resultados en esta población sesgada no fueron los esperados ya que pensamos que la probabilidad de encontrar algunos niños portadores de la PM eran mayor a lo que observamos (ningún paciente fue portador de PM o MC) debido a la mayor frecuencia de autismo y trastornos de aprendizaje encontrados en esta población, que son algunas de las características asociadas a los fenotipos de niños que presentan la premutación del gen. Esto podría deberse al número pequeño de la muestra con que trabajamos ya que la frecuencia de SXF es de 1 en 4000 en varones y 1 en 6000 en mujeres y para la PM es 130-250 mujeres y 1 en 250-810 varones, además sabemos que influyen otros factores como nivel socioeconómico y factores ambientales. Cabe destacar que en esta muestra predominan los niños con discapacidad intelectual moderada y severa, y en los premutados esperaríamos formas leves de DI y/o trastornos del aprendizaje o del lenguaje como se describe en la introducción de este trabajo.

*Población 2) Mujeres y varones mayores de 50 años con temblor y ataxias.*

Se diagnosticaron 18 pacientes mayores de 50 años con signos clínicos de temblor de intención y ataxia; de los resultados obtenidos con el primer y segundo PCR solo observamos un varón que presentó la PM del gen FMR1 y es portador de un alelo de 85 repetidos CGG. En el diagnóstico clínico se presenta como un caso clásico de FXTAS.

El paciente realiza la consulta a los 52 años por temblor y ataxia, como antecedentes presentaba temblor postural en miembro superior izquierdo desde la infancia, sin repercusión funcional. A los 49 años notó temblor cefálico en negación, agregando importante temblor distal en miembros superiores, sobre todo de intención y en menor medida postural que llega a perturbar francamente la escritura. Observamos que en este paciente la aparición de los primeros síntomas es temprana (49 años) siendo la edad media de presentación de 62 años, también llama la atención la rápida progresión de la enfermedad (3 años de evolución) por ejemplo: en el área cognitiva en el entorno familiar refiere cambios conductuales tales como: desinhibición e irritabilidad y en los test neuropsicológicos se observa un deterioro cognitivo leve a forma amnésica. No está claro si los signos cognitivos preceden, o son contemporáneos con el inicio del temblor y la ataxia, y si estos pueden estar asociados con anomalías neuropatológicas y / o neuroradiológicas.

Los datos neurofisiológicos y de neuroimagen, junto con el examen neuropsicológico, pueden ayudar a responder a esta pregunta. En la bibliografía se ha correlacionado la gravedad de los síntomas con el número de repetidos CGG. Las inclusiones intranucleares en neuronas y astrocitos de los individuos afectados son el sello neuropatológico de FXTAS, y se ha visto que su número está correlacionado con el número de repetidos CGG lo que recalca la importancia del diagnóstico molecular como predicción de la extensión de la afectación neurológica en los portadores de PM<sup>74</sup>. En nuestro estudio, no podemos establecer ninguna correlación, ya que solamente tenemos un paciente diagnosticado, que presenta una forma relativamente precoz y grave con 85 repetidos.

De las 11 mujeres con ataxias, 3 mujeres son posibles candidatas de portar un alelo premutado, y una de ellas tiene antecedentes familiares de SXF. No pudimos confirmar nuestra hipótesis en estas pacientes debido a que con los 3 PCRs y la secuenciación solo llegamos a observar una banda de amplificación por lo tanto no podemos correlacionar su fenotipo con el genotipo. Debido a la degradación que observamos en el ADN de estas pacientes no se pudo realizar el SB. Si se confirma positivo para la PM en estas pacientes habría una proporción de 3 mujeres premutadas con FXTAS en un total 13 mujeres con ataxias. Sería un porcentaje alto (23%), la frecuencia esperada para las mujeres que presentan la premutación del gen y desarrollen FXTAS es entre 8 -16%. En el caso de los varones de esta población 1 de 5 estudiados presenta la PM del gen y desarrolló FXTAS. Se espera que la frecuencia esperada en los varones portadores de la premutación y desarrollen FXTAS sea del 30%. Sabemos que nuestro n poblacional es muy pequeño para transpolar las frecuencias encontradas en nuestro país con las encontradas a nivel mundial. Este sesgo en la población estudiada se obtuvo debido la experiencia clínica de los neurólogos de la Policlínica de Movimientos Anormales y Enfermedad de Parkinson en el diagnóstico de esta enfermedad ya que a edades más avanzadas se puede confundir con Parkinson habiendo un sub-diagnóstico clínico del FXTAS.

El objetivo central de este trabajo fue estudiar los distintos fenotipos neurológicos de los premutados, en los que se centró la población 3. Se estudiaron dos subpoblaciones, en la primera se analizaron familias con integrantes conocidos con expansiones del gen FMR1, esperando encontrar premutados y estudiar su fenotipo. En la segunda subpoblación se estudió el gen FMR1 en pacientes con fenotipos que podrían estar asociados a la premutación. Si bien es importante la determinación de la frecuencia de portadores de premutaciones en los niños con estos fenotipos, lo esperado es encontrar un bajo número de premutados en esta segunda subpoblación. El motivo es que los fenotipos de TDAH, TEA extendido, trastornos del lenguaje y dificultades de aprendizaje son muy frecuentes en la población general y tienen una base genética multifactorial. Las premutaciones del gen FMR1 constituirían un factor genético

importante, pero su manifestación fenotípica depende del contexto genético y epigenético y de los factores ambientales.

3 a) Familias de pacientes con resultado molecular positivo para la mutación y/o premutación del FMR1.

Este estudio permitió caracterizar fenotípicamente y genotípicamente a un grupo de familias con antecedentes de SXF. Encontramos un total de 5 familias en las cuales estudiamos la segregación y estabilidad de los alelos. En las familias denominadas 1723N y 1773N se observó una tendencia a la estabilidad de los alelos premutados en la descendencia de las mujeres premutadas. En ambas familias las mujeres casos índices eran portadoras de 2 interrupciones AGG (determinadas por secuenciación). De la literatura sabemos que la cantidad y posición de los AGG son importantes en la estabilidad replicativa y por ende, en la posibilidad de expansión en la siguiente generación. De hecho, se ha establecido que el riesgo de expansión a MC en hijos de madres portadoras de una PM disminuye en un 60% si la madre presenta 2 interrupciones AGG dentro de una repetición total en el rango de 70 a 80 repetidos CGG, en comparación con aquellas madres que no tienen ninguna interrupción dentro del mismo rango<sup>28</sup>. Este dato es muy importante a la hora de asesorar a los familiares en edad reproductiva. Además de la tendencia del alelo a no expandirse se observó en la familia 1773 una contracción de 5 repetidos CGG en el alelo del individuo III1 (70 repetidos CGG) siendo su madre portadora de un alelo de 75 CGG. Las contracciones de los repetidos cuando se trata de la transmisión del alelo de la madre PM a su hijo se presentan en un porcentaje menor a las expansiones. Este niño tiene actualmente 2 años y aún no se pueden determinar las características fenotípicas. Esta familia está en seguimiento por los médicos de la policlínica de Genética.

Los fenotipos de ambas familias son similares siendo que tanto en la familia la 1723 al igual que la 1773 en los hijos portadores de la PM, (rango de 69 a 75 CGG) se observan trastornos de aprendizaje, lenguaje y TDAH. Estas características fenotípicas

están de acuerdo a las edades que van desde 16 a 21 años. De la Familia del paciente FXTAS 1 solo se pudo observar una pequeña expansión de alelo III de 85 repetidos CGG en el individuo III1 lo que es esperado de la transmisión de padre a hija ya que las grandes expansiones se producen en la meiosis materna. El fenotipo del paciente con FXTAS se describió en la población 2. Sería interesante estudiar el número de repetidos CGG en la integrante IV 1 y si presenta alguna característica fenotípica asociada en el caso que sea portadora de la PM.

En la Familia 1879 el caso índice fue diagnosticado como portador de una PM por PCR y una MC por SB vemos la presencia de ambos tipos de mutaciones tanto en el tamaño de los alelos como en su metilación. Este paciente presenta un mosaicismo este se observa en 12% de los pacientes afectados con SXF<sup>56</sup>. Este niño presenta características de los trastornos del espectro autista (ecolalias, aleteos, estereotipos) y del SXF como cara alargada, orejas grandes y desplegadas, pero no presenta la DI y otras características típicas del SXF. La presencia de características fenotípicas típicas del SXF y otras atípicas sería coherente con el mosaicismo. Como existen algunas formas no metiladas del gen FMR1, se espera que pueda haber cierta expresión de la proteína FMRP en algunos tejidos. En los casos de mutación en mosaico se han descrito cantidades variables de FMRP y un mayor coeficiente intelectual<sup>56</sup>, en la familia también hay otro individuo con TEA en tratamiento, en este caso no se determinó el estado de portador de la PM y/o MC del gen aún falta evaluar el número de repetidos del resto de la familia, en especial en el hermano menor.

En la Familia 1835 se observó que 3 integrantes tienen DI, el individuo III3 con diagnóstico positivo de SXF, los individuos II6, II7 y III2 aún no se les determinó el número de repetidos CGG. El caso índice III1 es portadora de una PM /MC (mosaico) como se muestra en resultados, de la anamnesis se desprende que no se observan fenotipos asociados con la PM/MC. En el caso de una mujer, además de la expresión de la proteína FMR1 en los alelos premutados, también influye en la expresividad la inactivación del cromosoma X (ICX) o lyonización<sup>75</sup>. En las mujeres, el fenotipo está influenciado por el patrón de ICX que presentan; y se han reportado niveles de Coeficiente Intelectual (CI) más altos en mujeres con MC que portan

predominantemente el alelo del gen FMR1 normal que codifica la proteína FMRP (NL, 5-44 CGG) en el cromosoma X activo<sup>76</sup>. El número de repetidos CGG y el mosaismo asociado a la metilación del gen puede tener un efecto positivo en las funciones cognitivas de los individuos con MC y reducir la penetrancia de SXF<sup>21</sup>. Sin embargo, el mosaismo de un alelo PM, que suele asociarse con niveles altos del ARNm (de 2-10 veces) y con niveles ligeramente menores de FMRPs, aumenta los riesgos de desarrollar síntomas psicóticos<sup>35</sup>. En una reciente revisión se resume que las mujeres que tienen la MC tienen 30% de probabilidades de tener un CI normal, 25% de tener DI con CI menor a 70, sin embargo pueden presentar dificultades de aprendizaje (60%) y trastornos emocionales (70%)<sup>8</sup>.

### 3b) Pacientes con Trastornos neuroconductuales asociados a la premutación.

En ambas poblaciones se incluyó antecedentes de historia familiar, y antecedentes de TEA extendido, TDAH, dificultades de aprendizaje y dificultades del lenguaje. En la mayoría de los casos los datos fenotípicos surgieron de la anamnesis, examen clínico e informes de consultas anteriores con especialistas.

En los pacientes en las que se logró determinar que son portadores de la premutación, se deben realizar estudios neuropsicológicos y psiquiátricos más completos para establecer un fenotipo neuroconductual más preciso. Estos estudios se han comenzado con algunos pacientes, pero aún no tenemos resultados para analizar. Sin embargo, a partir de los datos de la anamnesis y de los estudios que tienen algunos pacientes, nos llama la atención que casi todos los premutados estudiados presentan alguno de los rasgos fenotípicos estudiados. Si bien no podemos descartar otros factores genéticos, epigenéticos y ambientales, concluimos que es muy importante profundizar el estudio de las premutaciones y las correlaciones fenotipo-genotipo, más allá de la importancia en el consejo genético con respecto al riesgo de SXF. Los enfoques terapéuticos también deberían tomar en cuenta los mecanismos moleculares de los trastornos que derivan de la acumulación del ARNm en el tejido nervioso.

También observamos que en la población de DI moderada y severa, sin el fenotipo característico del SXF, la frecuencia de las expansiones del gen FMR1 es baja, si bien nuestro número de pacientes no permite sacar conclusiones estadísticas, el hecho de no haber encontrado expansiones del gen FMR1 en todos los varones estudiados nos permite estimar un frecuencia menor a 1/50.

Si bien consideramos que sigue siendo recomendable incluir el estudio del número de repetidos del gen FMR1 como rutina en todos los niños con DI, por tratarse de un estudio de costo accesible, no esperamos un número de positivos importante cuando no se encuentra el fenotipo del SXF aunque sea en forma parcial. También resulta muy útil la determinación de las premutaciones, cuyo espectro fenotípico es menos definido y podría encontrarse en los niños con DI leve que presentan otros trastornos asociados.

Para finalizar con trabajo nos propusimos determinar en las poblaciones estudiadas 1, 2 y 3 la frecuencia de los diferentes tipos de alelos que presenta el gen FMR1 tomando las secuencias de los alelos en el rango normal y zona gris de 28 pacientes lo que observamos con un porcentaje de 18,7 % al alelo de 29 repetidos CGG siendo este el más frecuente (figura 31 de resultados) esta frecuencia coincide con las observadas en otras poblaciones a nivel mundial. Con respecto a los alelos que se encuentran en la zona gris (45-54 CGG) encontramos un 10% (3 en un total de 28). En estudios realizados de niños recién nacidos en varias partes del mundo (USA, Israel, Taiwán y España) se determinó la prevalencia de los alelos de la zona gris o intermedios: 1:22-66 en mujeres y 1:42-112 en varones las diferencias numéricas observadas se debe a las características de cada población estudiada. Siendo una frecuencia bastante alta comparada con las frecuencias observadas de otras poblaciones sin embargo creemos que debemos realizar un muestreo más grande para transpolar a otras poblaciones ya que nuestro n poblacional es muy pequeño (n=28) y partimos de una población sesgada que no necesariamente refleja la frecuencia de la población general. Cabe destacar que este tipo de expansiones no están claramente asociadas con un fenotipo en particular.

# CONCLUSIONES

## Conclusión General

Con este trabajo se ha establecido un equipo interdisciplinario que estudia las bases clínico-moleculares de los distintos fenotipos patológicos asociados a las premutaciones y/o mutaciones del gen FMR1 (Causante de síndrome de X Frágil) permitiendo el asesoramiento genético integral a las familias estudiadas.

## Conclusiones específicas.

Se optimizó la metodología de PCR como técnica de diagnóstico para PM y/o MC del gen FMR1 que nos permitió determinar el número de repetidos CGG en tres poblaciones estudiadas que presentaron características asociadas a fenotipos de portadores con la PM y/o MC del gen FMR1. Pudimos resolver alelos de hasta 90 repetidos CGG en las mujeres y alelos de hasta 180 repetidos CGG en los varones.

Es importante resaltar que utilizando PCR como técnica de diagnóstico nos permitió disminuir considerablemente el número de pacientes sin resolver (11 en un total de 202) que necesitaron para su diagnóstico la técnica de SB. Por tal motivo pensamos que estamos en condiciones de ofrecer un servicio diagnóstico confiable a un costo accesible para nuestro sistema de salud, y el costo de SB se atenúa con un pequeño costo agregado al estudio básico. Además el diagnóstico molecular se vincula con un equipo calificado de genetistas clínicos que realizan el asesoramiento genético.

De las familias estudiadas se estudió en dos familias la transmisión del alelo expandido y observamos la importancia de las interrupciones AGG en la estabilidad de los repetidos CGG ya que notamos pequeñas expansiones en las siguientes generaciones, lo que permitió el asesoramiento genético para futuras decisiones reproductivas.

Se describió el primer caso de Síndrome Temblor-Ataxia Asociado al X-Frágil (FXTAS) en un paciente que presenta una premutación de 85 repetidos CGG en el Uruguay siendo importante su divulgación en la comunidad de Neurología para que no haya un sub-diagnóstico de FXTAS en la población más añosa con ataxias.

## **PERSPECTIVAS**

Estamos trabajando para conformar un grupo interdisciplinario con la colaboración del Instituto de Neurología y la Clínica de Psiquiatría Pediátrica de la Facultad de Medicina, para realizar estudios neuropsicológicos y psiquiátricos sistematizados a los pacientes portadores de premutaciones. De esta manera esperamos caracterizar mejor los fenotipos, establecer marcadores cognitivos tempranos descriptos en varios trabajos y sugerir un protocolo diagnóstico.

Nos proponemos optimizar un método de PCR para estudio del estado de metilación del promotor del gen FMR1, que puede resultar útil en los casos de varones con expansiones en el límite entre la premutación y mutación completa que se puedan diagnosticar sin realizar el SB disminuyendo más el número de pacientes que requieran esta técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hagerman PJ. The fragile X prevalence paradox.;45:498—9. *J Med Genet.* **45:498—9**, (2000).
2. Hagerman RJ, Rivera SM, H. P. he fragile X family of Curr, disorders: A model for autism and targeted treatments. *Pediatr Rev. Pediatr Rev.* **4:40—52.**, (2008).
3. Turned G, Webb T, Wake S, R. H. The prevalence of the fragile X syndrome. 196–197. (1996).
4. Coffee B, Zhang F, Ceman S, W. S. y R. D. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile X syndrome. 923–32. (2002).
5. RJ., H. Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research. *Phys. Behav. phenotype* **3—109.**, (2002).
6. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, N. D. Absence of expression of the FMR1 gene in fragile X syndrome. 817–822. (1991).
7. Tassone F, De Rubeis S, Carosi C, La Fata G, Serpa G, Raske C, Willemsen R, Hagerman PJ, B. C. Differential usage of transcriptional start sites and polyadenylation sites in FMR1 premutation alleles. *Nucleic Acids Res* (2011).
8. Hagerman R J, LeeheyM, Heinrichs W, Tassone F , Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, H. P. J. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* **Volume: 57**, (2001).
9. Del Barrio Del Campo, J. A., Castro Zubizarreta, A. & Buesa Casaus, L. Síndrome de X fragil. *Síndromes y apoyos. Panorámica desde la Cienc. y desde las Asoc.* 161–189 (2006).
10. Rodríguez, M. *et al.* (GCG)11 founder mutation in the PABPN1 gene of OPMD Uruguayan families. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 185–190 (2005).
11. Giangreco CA, Steele MW, Aston CE, Cummins JH, W. S. A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J Pediatr* **129**, 611–614. (1996).
12. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C. & Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C. et al. The transcriptional landscape of the mammalian Science. *Genome* **309**, 1559–1563 (2005).
13. Annie Sittler, D. D. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum. Mol. Genet. Vol. 5, No. 1 95* **Vol. 5, No.** 95–102 (1996).
14. Tassone F, Ka Pou Iong K, Tong T, H. R. (2012). FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome*

- Med.* **4**, (2012).
15. Tassone, F. *et al.* FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Med.* **4**, 100 (2012).
  16. Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, *et al.* Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn.* **11**, 306–310 (2009).
  17. Madrigal I, Xunclà M, T. M. Intermediate FMR1 alleles and cognitive and/or behavioural phenotypes. *Eur J Hum Genet* **19**, 921–923 (2011).
  18. Lozano, R. *et al.* Genomic studies in fragile X premutation carriers. *J. Neurodev. Disord.* **6**, 27 (2014).
  19. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Mills JB, Harris SW, G., LW, *et al.* C. involvement and protein expression in, . individuals with the F. premutation. A. J. G. M. & 2000;91:144—52. Clinical involvement and protein expression in, individuals with the FMR1 premutation. *Am J Genet Med* **91:144—52.**, (2000).
  20. Pietrobono R, Tabolacci E, Zalfa F, Zito I, Terracciano A, Moscato U, *et al.* The Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 Gene.,. *Hum Mol Genet.* 267–77., (2005).
  21. Pretto D, Yrigollen CM, Tang HT, Williamson J, Espinal G, Iwahashi CK, *et al.* Mutations., Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1. *Front Genet.* (2014).
  22. Gonçalves, T. F. *et al.* Finding *FMR1* mosaicism in Fragile X syndrome. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **16**, 501–507 (2016).
  23. Development., C. T. M. M. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 786–799 (2010).
  24. Rajan-Babu, I.-S. & Chong, S. Molecular Correlates and Recent Advancements in the Diagnosis and Screening of FMR1-Related Disorders. *Genes (Basel).* **7**, 87 (2016).
  25. Lokanga, R.A.; Zhao, X.N.; Usdin, K. I. The mismatch repair protein MSH2 is rate limiting for repeat expansion in a fragile X premutation mouse model. *Hum. Mutat.* **35**, 129–136 (2014).
  26. Zhao, X.N.; Kumari, D.; Gupta, S.; Wu, D.; Evanitsky, M.; Yang, W.; Usdin, K. M. generates both expansions and contractions in a mouse model of the F. X. D. H. M. G. & Press, I. MutSbeta generates both expansions and contractions in a mouse model of the Fragile X-associated Disorders. *Hum. Mol. Genet.* (2015).
  27. Tomé, S.; Manley, K.; Simard, J.P.; Clark, G.W.; Slean, M.M.; Swami, M.; Shelbourne, P.F.; Tillier, E. R. . & Monckton, D.G.; Messer, A. . *et al.* MSH3 polymorphisms and protein levels affect CAG repeat instability in Mice., Huntington’s disease. *PLoS Genet.* (2013).
  28. Yrigollen, C. M. *et al.* AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *J. Neurodev. Disord.* **6**, 24 (2014).

29. Ashley, C. T., Wilkinson, K D., Reines D. & Warren, S. T. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* (80-. ). 563–566.
30. D’HULST, C.; KODY, R. F. Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy. *J.Med. Genet.* **46**, 577–584 (2009).
31. O’Donnell WT, W. ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci.* **25**, (2002).
32. Ceman., S. T. W. . S. Isolation of an FMRP-Associated Messenger Ribonucleoprotein Particle and Identification of Nucleolin and the Fragile X Related Proteins as Components of the Complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7925–7932 (1999).
33. Edbauer, D, Foster, K, Batterton, M. N, & Sheng, M. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 373-384. **65**, (2010).
34. Greenough William, W. I. J. Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. *PNAS* **Vol 101**, 17504–1750 (2004).
35. Grigsby, J. *et al.* The cognitive neuropsychological phenotype of carriers of the FMR1 premutation. *J. Neurodev. Disord.* **6**, 28 (2014).
36. Dyer-Friedman, J. *et al.* Genetic and environmental influences on the cognitive outcomes of children with fragile X syndrome. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **41**, 237–44 (2002).
37. Lozano, R., Rosero, C. A. & Hagerman, R. J. Fragile X spectrum disorders. *Intractable rare Dis. Res.* **3**, 134–46 (2014).
38. Murray, A, Webb, J, Grimley, S, Conway, G, Jacobs, P. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J. Med. Genet.* **35**, 637–640 (1998).
39. Farzin, F, Perry, H, Hessel, D, Loesch, D, Cohen, J, Bacalman, S, Gane, L, Tassone, F, Hagerman, P. and H. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. *R. J. Dev. Behav. Pediat* 137–144. (2006).
40. Jacquemont S. Aging in Individuals With the FMR1 Mutation,. *Am. J. Ment. Retard.* **109**, 154–164 (2004).
41. Hagerman, R. J. *et al.* Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* **57**, 127–130 (2001).
42. Leehey, M. A, Munhoz, R. P., Lang, A. E, Brunberg, J. A, Grigsby, J, Greco, C, Jacquemont, S, Tassone, F, Lozano, A. M, Hagerman, P. J, Hagerman, R. J. The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch. Neurol.* **60**, 117–121 (2003).
43. H, V. E. Screening for FMR-1 premutations in 122 older Flemish males

- presenting with ataxia. *Eur J Hum Genet.* **121–123**, (2005).
44. Dombrowski, C, Levesque, M. L, Morel, M. L, Rouillard, P, Morgan, K, & Rousseau, F. Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10,572 males from the general population: Loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 371–378. (2002).
  45. Hagerman, R. J. & Hagerman, P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome — features, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 403–412 (2016).
  46. Rodriguez-Revengea, L. *et al.* Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 1359–1362 (2009).
  47. Dolores García Arocena, Yolanda de Diego, Ben Oostra, R. Willemsen, M. M. R. A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum. Genet.* **106**, 336–339 (2000).
  48. Tassone, F, Beilina, A, Carosi, C, Albertosi, S, Bagni, C, Li, L, Glover, K, Bentley, D. and Hagerman, P. J. Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. *RNA* **13**, 555–562 (2007).
  49. Ennis S, Murray A, Youings S, Brightwell G, Herrick D, Ring S, Pembrey M, Morton NE, J. P. An investigation of FRAXA intermediate allele phenotype in a longitudinal sample. *Ann Hum Genet.* 170–180
  50. Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M, H. P. Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain* **125**, 1760–1771 (2002).
  51. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M, Thornton CA,. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing and expanded CUG repeat. *Sci.* 289 1769–73 (2000).
  52. Brega, A. G. *et al.* The primary cognitive deficit among males with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) is a dysexecutive syndrome. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* **30**, 853–69 (2008).
  53. Fuster, J. M. Executive frontal functions. *Exp. Brain Res.* **133**, 66–70 (2000).
  54. Greco, C. M. *et al.* Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain* **129**, 243–55 (2006).
  55. Hall DA, Berry-Kravis E, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Rice CD, Leehey MA. Symptomatic treatment in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Mov Disord.* (2006).
  56. A. Pugin, V. Faundes, L. Santa María, B. Curotto, S. Aliaga, I. Salas, P. Soto, P. Bravo, M.I. Peña, M. A. A. Aspectos clínicos, moleculares y farmacológicos en los trastornos asociados a gen 1 del retraso mental del X frágil. *Neurología* (2014).
  57. SV., F. Genetics of childhood disorders: XX. ADHD, Part 4: is ADHD genetically heterogeneous? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1455–1457

- (2000).
58. Bailey DB Jr, Raspa M, Olmsted M, H. D. Cooccurring conditions associated with FMR1 gene variations: findings from a national parent survey. *Am J Med Genet* (2008).
  59. Ezzell Hunter, Michael P. Epstein , Stuart W. Tinker , Ann Abramowitz, S. L. S. The FMR1 Premutation and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Evidence for a Complex Inheritance. *Behav Genet* (2011).
  60. Fariña L, Galli E, Lazo M, Mattei L, R. V. Genética Molecular y Trastornos del Espectro Autista. *An Fac. Med (Univ Repúb Urug)*. **Supl 1**, 9–21. (2015).
  61. Nelson, L. M. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N. Engl. J. Med.* **360**, 606–14 (2009).
  62. Sullivan, A. K. *et al.* Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum. Reprod.* **20**, 402–12 (2005).
  63. Bretherick, K. L., Fluker, M. R. & Robinson, W. P. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum. Genet.* **117**, 376–82 (2005).
  64. Tassone, F. Newborn Screening for Fragile X Syndrome. *JAMA Neurol.* **71**, 355 (2014).
  65. Saluto, A. *et al.* An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *J. Mol. Diagn.* **7**, 605–12 (2005).
  66. Tassone, F., Pan, R., Amiri, K., Taylor, A. K. & Hagerman, P. J. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J. Mol. Diagn.* **10**, 43–9 (2008).
  67. Hećimović, S. *et al.* Expand Long PCR for fragile X mutation detection. *Clin. Genet.* **52**, 147–154 (2008).
  68. Monaghan, K. G., Lyon, E. & Spector, E. B. 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. *Genet. Med.* **15**, 575–586 (2013).
  69. Nolin, S. L. *et al.* Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am. J. Med. Genet. Part A* **161**, 771–778 (2013).
  70. Warner, J. P. *et al.* A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* **33**, 1022–6 (1996).
  71. Filipovic-Sadic, S. *et al.* A Novel FMR1 PCR Method for the Routine Detection of Low Abundance Expanded Alleles and Full Mutations in Fragile X Syndrome. *Clin. Chem.* **56**, (2010).
  72. Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M. High sensitivity mapping of

- methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2990–7 (1994).
73. Laird, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 191–203 (2010).
  74. Loesch, D. Z. *et al.* Novel Blood Biomarkers Are Associated with White Matter Lesions in Fragile X- Associated Tremor/Ataxia Syndrome. *Neurodegener. Dis.* **17**, 22–30 (2017).
  75. Saldarriaga, W. *et al.* Fragile X syndrome. *Colomb. médica (Cali, Colomb.* **45**, 190–8 (2014).
  76. Rousseau, F. *et al.* Direct Diagnosis by DNA Analysis of the Fragile X Syndrome of Mental Retardation. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1673–1681 (1991).

## ANEXO

**TABLA de estimación de repetidos CCG:** La estimación se realiza en base al tamaño del producto de amplificación del PCR con los primers “c” y “f” descriptos por Tassone 2008.

<b>Numero Repetidos</b>	<b>PB</b>										
20	301	62	427	104	553	146	679	188	805	230	931
21	304	63	430	105	556	147	682	189	808	231	934
22	307	64	433	106	559	148	685	190	811	232	937
23	310	65	436	107	562	149	688	191	814	233	940
24	313	66	439	108	565	150	691	192	817	234	943
25	316	67	442	109	568	151	694	193	820	235	946
26	319	68	445	110	571	152	697	194	823	236	949
27	322	69	448	111	574	153	700	195	826	237	952
28	325	70	451	112	577	154	703	196	829	238	955
29	328	71	454	113	580	155	706	197	832	239	958
30	331	72	457	114	583	156	709	198	835	240	961
31	334	73	460	115	586	157	712	199	838	241	964
32	337	74	463	116	589	158	715	200	841	242	967
33	340	75	466	117	592	159	718	201	844	243	970
34	343	76	469	118	595	160	721	202	847	244	973
35	346	77	472	119	598	161	724	203	850	245	976
36	349	78	475	120	601	162	727	204	853	246	979
37	352	79	478	121	604	163	730	205	856	247	982
38	355	80	481	122	607	164	733	206	859	248	985
39	358	81	484	123	610	165	736	207	862	249	988
40	361	82	487	124	613	166	739	208	865	250	991
41	364	83	490	125	616	167	742	209	868		
42	367	84	493	126	619	168	745	210	871		
43	370	85	496	127	622	169	748	211	874		
44	373	86	499	128	625	170	751	212	877		
45	376	87	502	129	628	171	754	213	880		
46	379	88	505	130	631	172	757	214	883		
47	382	89	508	131	634	173	760	215	886		
48	385	90	511	132	637	174	763	216	889		
49	388	91	514	133	640	175	766	217	892		
50	391	92	517	134	643	176	769	218	895		
51	394	93	520	135	646	177	772	219	898		
52	397	94	523	136	649	178	775	220	901		

53	400	95	526	137	652	179	778	221	904
54	403	96	529	138	655	180	781	222	907
55	406	97	532	139	658	181	784	223	910
56	409	98	535	140	661	182	787	224	913
57	412	99	538	141	664	183	790	225	916
58	415	100	541	142	667	184	793	226	919
59	418	101	544	143	670	185	796	227	922
60	421	102	547	144	673	186	799	228	925
61	424	103	550	145	676	187	802	229	928



### **Criterios de inclusión de Berry Kravis :**

- Inicio de una ataxia cerebelosa de causa desconocida en un paciente por encima de los 50 años.
- Inicio de un temblor de acción de causa desconocida en un paciente por encima de los 50 años con parkinsonismo o deterioro cognitivo.
- Diagnóstico previo de Atrofia Múltiple Sistémica, subtipo cerebeloso.
- Signo del Pedúnculo Cerebeloso Medio en imágenes de RNM en T2/FLAIR en un paciente con clínica consistente con FXTAS.
- Historia familiar positiva de mutación en FMR1 en un individuo con probabilidad de ser un portador basado en su posición en la genealogía, si presenta clínica consistente con FXTAS.
- Historia familiar o personal de infertilidad/menopausia prematura en un paciente con clínica consistente con FXTAS.

En cada paciente se realizaron escalas clínicas, estudio neuropsicológico y neuroimagen estructural y funcional.

*DEPARTAMENTO DE GENÉTICA*

**Estudio del gen FMR1**

Dra. Leda Roche

Fecha:

Dr. Víctor Raggio

Fecha de recepción de la muestra:

Dra. Alejandra Tapié

Paciente:

Dra. Faride Ututbey

CI:

Código:

Material: 5 ml de sangre periférica

Procedencia: Departamento de Genética, Proyecto SXF

Motivo del pedido:

Solicitante

**Estudio:** El síndrome del cromosoma X-frágil (SXF) está causado, en un 99% de los casos, por una expansión del trinucleótido CGG en la región 5' del gen FMR1, localizado en el cromosoma X. Las expansiones mayores a 200 repetidos denominadas mutación completa causan el SXF, y las expansiones entre 50 y 200 repetidos denominadas premutaciones son inestables y pueden expandirse en la descendencia.

**Método:** Se ha analizado el gen FMR1 en una muestra de ADN del paciente mediante la amplificación por PCR con cebadores específicos, visualización por electroforesis en gel de agarosa y secuenciación.

**Resultado:**

Depto. Genética

Facultad de Medicina

Av. Gral. Flores 2125

Montevideo 11800,

Uruguay

Dra. Leda Roche  
Profesora Directora del Departamento de Genética  
Responsable del Laboratorio de Diagnóstico  
Molecular

Tel: 292492562

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### ESTUDIO DE FENOTIPOS PATOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DE PREMUTACIONES DEL GEN FMR1

**Responsable:** Lic. Natalia Pi Denis ( [npi@fmed.edu.uy](mailto:npi@fmed.edu.uy))

**Tutor:** Dra. Leda Roche ([lroche@fmed.edu.uy](mailto:lroche@fmed.edu.uy))

#### **Teléfonos y dirección de contacto:**

Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR

Avda. Gral. Flores 2125

Telf: 2924 3414 (int. 3469)

Fax: 2924 3414 (int. 3362)

#### INFORMACIÓN DEL PROYECTO

En esta investigación participarán los pacientes que presenten el diagnóstico de “trastorno por déficit de atención e hiperactividad” (TDAH), esta es una enfermedad neuroconductual que se caracteriza por una inquietud excesiva, falta de atención, distracción e impulsividad. Por lo general, se detecta cuando los niños están en edad escolar, aunque también puede diagnosticarse en personas de todas las edades. Este cuadro tiene un gran impacto en la sociedad en términos de coste económico, estrés familiar, problemas académicos y vocacionales así como una importante disminución de la autoestima del sujeto afectado. Algunas afecciones que causan dichos trastornos son genéticas o hereditarias, esto significa que son causadas por un cambio o “mutación” de los genes que están en los cromosomas.

Los genes son fragmentos de ADN que se transmiten de generación en generación y que sirven como instrucciones para que el organismo lleve a cabo sus funciones. El ADN se puede extraer de las células del organismo, por ejemplo de la sangre, para estudiar en el laboratorio y se puede almacenar por mucho tiempo.

EL gen FRM1 esta localizado en el brazo largo del cromosoma X, su mutación resulta en la ausencia de la proteína FMRP produciendo el Síndrome del X-frágl Este gen, contiene una secuencia repetida CGG en el 5'UTR del exón 1. El numero de repetidos es altamente polimórfico en la población y sus variantes se pueden clasificar en: individuos normales, número de repetidos CGG varía entre 12 y 44, en portadores de una premutación en los que el número de repetidos varía entre 52 y 200, siendo en principio normales y por ultimo individuos afectados (mutación completa) tienen más de 200 repeticiones. Actualmente se estudia intensamente algunos fenotipos patológicos en los portadores de la premutación.

En el marco de este proyecto, se intenta identificar mediante el estudio clínico a los pacientes que presenten una base genética conocida y a aquellos donde los factores ambientales sean los principales y/o no se conozcan las causas genéticas.

## **ESTUDIO DE FENOTIPOS PATOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DE PREMUTACIONES DEL GEN FMR1**

**Responsable: Lic. Natalia Pi Denis** ( [npi@fmed.edu.uy](mailto:npi@fmed.edu.uy))

**Tutor: Dra. Leda Roche** ([lroche@fmed.edu.uy](mailto:lroche@fmed.edu.uy))

**Teléfonos y dirección de contacto:**

Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UdelaR

Avda. Gral. Flores 2125

Telf: 2924 3414 (int. 3469)

Fax: 2924 3414 (int. 3362)

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

- 1) Extracción de una muestra de sangre periférica (5 ml) mediante punción de una vena superficial del pliegue del codo. Este procedimiento se realizará con las medidas de higiene óptimas, como es realizado de rutina en todos los centros asistenciales. La toma de la muestra no implica ningún riesgo, más allá de aquellos que normalmente se pueden encontrar en este tipo de acción y que se describen en el punto 4.
  
- 2) Cuando el examen médico permita sospechar la existencia de causas genéticas conocidas entrarán en un programa que podrá incluir una serie de pruebas diagnósticas genéticas aceptadas internacionalmente para el diagnóstico clínico, que se incorporan a la historia clínica.
  
- 3) También se solicitará la participación de los miembros de la familia en la donación de una muestra, así como completar la encuesta. Esto permitirá generar un banco de datos que serán analizados para comprender cuales son las posibles causas y características epidemiológicas de los trastornos del neurodesarrollo y trastornos del aprendizaje en la población uruguaya.

- 4) Los riesgos de participar en este estudio incluyen:
- Pérdida de confidencialidad. Dado que se está colectando información personal, existe la posibilidad de que la identidad del participante sea revelada durante este estudio. Sin embargo, el equipo de investigadores tomará todas las precauciones necesarias para asegurar de que esto no suceda.
  - Durante la extracción de la muestra de sangre es posible que se presente un hematoma, sangrado o inflamación donde la aguja fue insertada. En raras ocasiones puede ocurrir un desmayo. El hematoma desaparecerá en pocos días.
- 5) Para evitar la pérdida de confidencialidad, los datos serán mantenidos mediante el uso de un código que asegure el anonimato.
- 6) Para evitar el desarrollo de hematomas durante la extracción de sangre, esta se hará por técnicos calificados con amplia experiencia en estos procedimientos.
- 7) La responsabilidad de daños y perjuicios eventualmente ocasionados a los participantes de la investigación recaerán en los responsables del proyecto
- 8) Este proyecto de investigación se desarrollará en la Policlínica del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina del Centro Hospitalario Pereira Rosell.
- 9) La extracción de sangre se realizará en el Centro Hospitalario Pereira Rosell por técnicos debidamente capacitados de esa institución en situaciones que los participantes concurren a realizarse una extracción de sangre ya programada por sus médicos tratantes en el marco de su tratamiento actual. Este procedimiento tiene una duración aproximada de 15 minutos.
- 10) El objetivo general del proyecto de investigación es determinar la frecuencia de portadores de premutación para FMR1 en niños que presenten el diagnóstico de trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH).
- 11) A partir de la muestra obtenida, se estudiarán el gen FMR1 para ofrecer la

confirmación diagnóstica y asesoramiento genético a las familias afectadas por este problema y colaborar con el equipo de salud en el manejo clínico y apoyo a los pacientes y las familias.

12) La muestra de sangre (ADN) y la información colectada en este estudio podrán ser guardadas para futuros estudios genéticos vinculados a trastornos del neurodesarrollo, discapacidad intelectual y trastornos del aprendizaje.

13) La información no contendrá el nombre del participante o forma de identificarlo, solo se mantendrá el código del estudio.

14) La información personal, los registros médicos y los resultados de los estudios serán manejados en forma confidencial. La confidencialidad de los datos será mantenida por el uso de un código que asegure el anonimato. La información identificatoria sólo será mantenida por el equipo de investigación.

15) En el caso de tener preguntas sobre sus derechos como sujeto de estudio el abajo firmante puede contactar al Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de la República (Avda. Gral. Flores 2125, Montevideo; Tel: 2924 3414 int. 3364; Fax: 2924 3414 int. 3362); o a los investigadores responsables: Dra. Leda Roche , Víctor Raggio o Lic Natalia Pi por el teléfono 9243414 interno 3469.

16) No recibirá ningún tipo de remuneración o beneficio por participar en este estudio.

17) Los beneficios eventuales de participar en el estudio van a permitir el asesoramiento al paciente y a la familia y también la identificación de los individuos portadores y en riesgo. Un diagnóstico etiológico tiene implicancias inmediatas en relación al riesgo de recurrencia, pronóstico y ciertas medidas terapéuticas. A su vez permite establecer un pronóstico y dirigir las medidas terapéuticas y las necesidades educativas en el caso de los niños que padezcan TADH.

18) En el caso que lo desee, el participante podrá retirarse del estudio en cualquier momento, previo aviso al responsable del proyecto, sin explicación de la(s) causa(s) y sin verse afectada la atención medica que recibe actualmente.

19) Al término del proyecto de investigación podrá tener acceso, en lo posible, a los

resultados obtenidos del análisis de la muestra que cedió voluntariamente.

20) Recibirá una copia de este consentimiento informado

Acepto participar en el estudio Si..... No.....

Autorizo que mi muestra de ADN almacenada y sea utilizada para futuros estudios genéticos vinculados a trastornos del neurodesarrollo, discapacidad intelectual y trastornos del aprendizaje. ( Marque con una cruz)

Si ..... No.....

Nombre ..... del  
paciente.....

Dirección.....  
.....

Teléfono.....  
.....

Correo  
electrónico.....

Firma del participante (padre/madre o tutor).....

Aclaración de firma.....

Firma del Investigador Responsable.....

ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN PROYECTO DE INVESTIGACION (para jóvenes entre 13 y 17 años, se acompañará del Consentimiento informado del padre, madre o tutor)

**Proyecto de investigación: Estudio de fenotipos patológicos característicos de premutaciones del gen FMR1**

Responsables: Lic Natalia Pi, Dra. Leda Roche,

Departamento de Genética de la Facultad de Medicina.

Este asentimiento informado brinda información importante sobre una investigación. Si decides participar en este estudio, deberás firmar este asentimiento y se te entregará una copia.

En esta investigación se estudiará a personas pertenecientes a familias en que algunos integrantes están afectados de trastornos del neurodesarrollo y trastornos del aprendizaje. En algunos casos, estos trastornos son causados por un cambio o “mutación” de los genes. Los genes son fragmentos de ADN que se transmiten de generación en generación y que sirven como instrucciones para que el organismo lleve a cabo sus funciones. El ADN se puede extraer de las células del organismo, por ejemplo de la sangre, para estudiar en el laboratorio y se puede almacenar por mucho tiempo.

En el estudio se les solicitará a los pacientes y familiares, en el caso de los menores de 18 años a sus padres o tutores, la autorización para recolectar su información médica y muestras de sangre y ADN para obtener mayor información sobre cómo las distintas mutaciones en el ADN pueden causar trastornos del neurodesarrollo y trastornos del aprendizaje y como se transmiten en las familias. Estos conocimientos pueden ayudar en el futuro a planificar mejor la atención, el tratamiento y la educación de los niños que presenten estas afecciones.