

# Estudio genético y molecular de 85 familias afectas del síndrome del cromosoma X frágil

M. Milà Recasens<sup>1</sup>, A. Sánchez Díaz<sup>1</sup>, G. Glover López<sup>2</sup>, S. Castellví Bel<sup>1</sup>, P. Carbonell Meseguer<sup>2</sup>, H. Kruyer<sup>3</sup>, F. Ballesta Martínez<sup>1</sup>, X. Estivill Pallejà<sup>1,3</sup>

**Resumen.** *Objetivo:* Estudiar clínica, citogenética y molecularmente 85 familias españolas afectas de síndrome del cromosoma X frágil. *Material y métodos:* Para el estudio clínico se siguió el protocolo de Hagerman, el estudio citogenético se realizó en presencia de 5-fluorodeoxiuridina y para el estudio molecular se combinaron la técnica de Southern blotting utilizando la sonda StB12.3 y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Resultados:* En total se caracterizaron 620 individuos. En 126 varones se confirmó la sospecha clínica de síndrome del cromosoma X frágil, se identificaron 197 mujeres portadoras del síndrome (48 de ellas afectas de retraso mental) y 15 varones asintomáticos transmisores (NTM), a la vez que se descartó la presencia de la mutación en 246 individuos con riesgo y en 36 individuos correspondientes a parejas de los consultantes. Se detectó un varón asintomático con una expansión superior a las 200 repeticiones y sin metilación de la isla CpG adyacente al gen *FMR-1*. No se ha detectado ninguna mutación «de novo» ni ninguna otra mutación distinta a la expansión del triplete (CGG)n. El análisis del triplete (CGG)n mediante PCR en 297 cromosomas normales mostró una distribución del número de (CGG)n entre 17 y 54 repeticiones, con el alelo de 29 como el más frecuente, representando el 24% del total de cromosomas estudiados. *Conclusiones:* La combinación de Southern blotting y PCR permite la caracterización de todos los miembros implicados en una familia, sustituyendo al diagnóstico citogenético, y facilitando el consejo genético y el diagnóstico prenatal.

*An Esp Pediatr* 1996;44:250-256.

**Palabras clave:** Síndrome del cromosoma X frágil; Triplete (CGG)n; Retraso mental; Gen *FMR-1*.

## GENETIC AND MOLECULAR STUDIES OF 85 FAMILIES AFFECTED WITH FRAGILE X SYNDROME

**Abstract.** The objective of this study was to analyze clinically, cytogenetically and molecularly 85 Spanish families with fragile X syndrome. Clinical studies were based on the score proposed by Hagerman, cytogenetic studies were made by adding 5-fluorodeoxyuridine and molecular studies were performed by using a StB12.3 probe and the polymerase chain reaction (PCR). The results of the molecular studies in 620 individuals at risk confirmed the clinical diagnosis of fragile X syndrome in 126 affected males. In addition, 197 carrier females were detected (48 with mental retardation) and 246 "at risk" individuals and 36 non-related members were found not to have the expansion. Fifteen cases of normal transmitting males (NTM) were

detected. We found one non-mentally retarded male where the CpG island of the *FMR-1* gene was not methylated, but with more than 200 (CGG)n repeats (high functioning male). In the sample studied, no de novo mutations were found and all of the mutations detected were (CGG)n expansions. PCR analysis of the (CGG)n repeat in 297 normal chromosomes showed an allele distribution that ranged from 17 to 54 repeats, with an allele of 29 (CGG)n repeats accounting for 24% of the chromosomes. In conclusion, molecular genetic study of fragile X provides accurate diagnosis and facilitates genetic counselling in families with affected members. Southern blot analysis and PCR of the (CGG)n repeat provides efficient diagnosis, compared to cytogenetic techniques, for the detection of female carriers, NTMs, and prenatal diagnosis.

**Key words.** Fragile X syndrome; (CGG)n repeats; Mental retardation; *FMR-1* gene.

## Introducción

El síndrome del cromosoma X frágil es la causa más frecuente de retraso mental familiar. Desde el punto de vista clínico se caracteriza por retraso mental que va de moderado a severo, cara alargada, orejas grandes y macroorquidismo<sup>(1,2)</sup>. A pesar de sus características clínicas definidas, el síndrome del cromosoma X frágil presenta una gran variabilidad, dificultando el diagnóstico, especialmente en la edad prepuberal.

El síndrome del cromosoma X frágil se caracteriza citogenéticamente por la presencia de una constricción o rotura a nivel de la banda q27.3, la cual es visible sólo empleando cultivos de linfocitos en medios pobres en ácido fólico<sup>(3)</sup>. El defecto molecular consiste en la expansión de la secuencia repetitiva (CGG)n del gen *FMR-1*<sup>(4,5,6)</sup>. El gen *FMR-1* normal transcribe un RNA mensajero de 4,8 kb y expresa una proteína de 70 kD en individuos normales. La transcripción se encuentra ausente o intensamente disminuida en pacientes con síndrome del cromosoma X frágil<sup>(7)</sup>. La alteración en la transcripción del gen *FMR-1* está relacionada con la expansión de la secuencia (CGG)n por encima de 200 repeticiones, incremento que favorece la metilación anómala de la isla CpG adyacente y la inactivación de *FMR-1*, impidiendo en los afectados la transcripción del mismo. En la población general el número de (CGG)n es altamente polimórfico variando de 6 a 52 repeticiones. Una expansión entre 54 y 200 copias se asocia al estado de premutación que corresponde a los portadores asintomáticos, pero adquiere una gran inestabilidad pudiendo pasar a mutación completa cuando supera las 200 repeticiones y se transmite a través de una mujer<sup>(8)</sup>.

<sup>1</sup>Servei de Genètica, Centre de Genètica Mèdica, Hospital Clínic, Barcelona.

<sup>2</sup>Centro de Bioquímica y Genética Clínica, Espinardo, Murcia. <sup>3</sup>Departament de Genètica Molecular, Institut de Recerca oncològica, Hospital Duran i Reynals, Barcelona

Correspondencia: M. Milà

Servei de Genètica, Hospital Clínic. C/ Villarroel 170, 08036 Barcelona.

Recibido: Noviembre 1994

Aceptado: Mayo 1995

El síndrome del cromosoma X frágil afecta a uno de cada 1.250 varones y una de cada 2.500 mujeres<sup>(9,10)</sup>, se hereda como un trastorno mendeliano de tipo dominante ligado al cromosoma X, con una penetrancia incompleta (80% para varones y 30% para mujeres) y una expresividad variable<sup>(11,12)</sup>. La frecuencia de portadores se estima en 1/700, siéndolo tanto las mujeres como los varones, denominados NTM («normal transmitting males»)<sup>(13)</sup>. Este tipo de herencia peculiar dificulta el consejo genético en las familias con miembros afectados de este proceso.

En este trabajo presentamos el estudio de 85 familias españolas con síndrome del cromosoma X frágil, las cuales han sido estudiadas con la sonda StB12.3 y la amplificación de la zona repetitiva (CGG)<sub>n</sub> mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Este análisis ha permitido la caracterización de 620 individuos, y el consejo genético adecuado en todas las familias.

## Material y métodos

### Familias

Se han estudiado 85 familias con uno o más miembros afectados de síndrome del cromosoma X frágil. En 40 familias existía un diagnóstico citogenético anterior y se completó el estudio a nivel molecular. En las 45 familias restantes el estudio clínico se basó en el protocolo de Hagerman<sup>(2)</sup> y se consideraron indicativos de estudio molecular cuando los valores del protocolo fueron iguales o superiores a 13, basándose el diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil, en la clínica y el estudio molecular. En total se han estudiado 620 individuos: 285 varones y 335 mujeres, distribuyéndose de la forma siguiente: 149 (126 varones y 23 mujeres) con retraso mental, 435 (148 varones y 287 mujeres) sanos a riesgo y 36 (11 varones y 25 mujeres) correspondientes a parejas de los consultantes, aparentemente sin ningún riesgo de ser portadores. Adicionalmente se estudiaron 297 cromosomas normales independientes procedentes de una población control.

### Estudios citogenéticos

Como mínimo el caso índice afecto de cada familia fue analizado citogenéticamente, en algunos casos la madre y las hermanas a riesgo también fueron estudiadas, 30 mujeres en total.

El estudio se realizó mediante un cultivo de linfocitos de 72 horas al que se le incorporó 5-fluorodeoxiuridina (FrdU) a una concentración final de 4µM. Se estudiaron 100 metafases con tinción habitual y posteriormente se realizaron bandas GTG para confirmar la fragilidad del cromosoma X en q27.3.

### Estudio molecular

Todos los miembros de riesgo en cada familia, una vez diagnosticado el caso índice de síndrome del cromosoma X frágil, fueron seleccionados para análisis molecular de la zona repetitiva (CGG)<sub>n</sub> del gen *FMR-1* mediante la sonda StB12.3 y/o PCR<sup>(4,8)</sup>. En total fueron estudiados 620 individuos de 85 familias, incluyendo 285 hombres y 335 mujeres.

Tabla I Caracterización molecular de 85 familias afectadas del síndrome del cromosoma X frágil

	Hombres	Mujeres	Total	%
Afectos	126	23	149	24
Portadores	15	174	189	30,5
Sanos de riesgo	133	113	246	39,7
Parejas de los consultantes	11	25	36	5,8
Total	285	335	620	
<i>Sanos 6-50 (CGG)<sub>n</sub></i>				
<i>Portadores 50-200 (CGG)<sub>n</sub></i>				
<i>Afectos más de 200 (CGG)<sub>n</sub></i>				

De cada individuo se extrajeron 10 ml. de sangre periférica en EDTA y el DNA se aisló según protocolo de precipitación de sales<sup>(14)</sup>. 5 µg de DNA genómico se digirieron con 40 U de *EcoRI* (Boehringer-Mannheim) y 40 U de *EagI* (New England Biolabs), durante 18 horas a 37°C, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% durante 20 horas, se transfirieron a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) y se hibridaron con la sonda StB12.3<sup>(4)</sup>, marcada radioactivamente mediante *oligolabelling*. El lavado de los filtros fue con una astringencia de 0,1 x SSC a 65°C. Los filtros se expusieron frente a una película radiográfica, a -80°C durante 48-72 horas. La interpretación de los resultados se realizó atendiendo a los patrones descritos por Rousseau y cols.<sup>(15)</sup>.

Se realizó el análisis de la zona repetitiva (CGG)<sub>n</sub> mediante PCR, según la técnica descrita por Fu y cols.<sup>(8)</sup> y Kruyer y cols.<sup>(16)</sup>, según las siguientes modificaciones: Primers: P1 5'-GCTAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3' y P2 5'-TTGTAGAAAGCGCCATTGGAGCCCCGCACT-3'. La amplificación del DNA se realizó con: 200 ng de DNA genómico, 3 pmol de cada primer (P1 y P2) en un volumen final de 15 µl, conteniendo 10mM Tris-HCl (pH 9,0 a 25°C), 50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 150 µM 7-deaza-dGTP, 10% DMSO, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dTTP, 50µM dGTP, 3µCi de <sup>32</sup>P a - dCTP y 1U de Taq Polimerasa (Promega) en un termociclador (Perkin-Elmer 480). Las condiciones fueron: 5 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de denaturalización (95°C, 1,5 minutos) e hibridación/elongación (65°C, 2 minutos). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de secuenciación desnaturante al 5%. Los alelos se identifican por el tamaño en relación con el marcador M13. Para el análisis simultáneo de la región (CGG)<sub>n</sub> del gen *FMR-1* y del receptor androgénico (*AR*), como control positivo de PCR, se emplearon los primers ARA 5'- ACCAGGTAGCCTGTGGGGCCTCTACGATGGGC-3' y ARb 5' CCAGAGCGTGCGGAAGTGATCCAGAACCCG-3', a una concentración de 1,2 pmols de cada uno y se analizaron en las mismas condiciones descritas para el *FMR-1*.

HOSPITAL  
**CLÍNICA**  
I PROVINCIAL  
DE BARCELONA  
SERVIO DE GENÉTICA  
TEL: 93 40001000 ext. 4004  
Fax: 93 40001013

Nº FRA-X: \_\_\_\_\_  
Nº HIST.: \_\_\_\_\_

APELLIDOS Y NOMBRE: \_\_\_\_\_  
FECHA DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_  
HOSPITAL DE PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_  
DIRECCIÓN: \_\_\_\_\_ C.P.: \_\_\_\_\_  
POBLACIÓN: \_\_\_\_\_ TFNO: \_\_\_\_\_  
FECHA Y EDAD DE EXPLORACIÓN: \_\_\_\_\_

**CHECKLIST**

RETRASO MENTAL	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
HIPERACTIVIDAD	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
PROBLEMAS EN MANTENER LA ATENCIÓN	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
DEFENSA TÁCTIL	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
ALETEO DE MANOS	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
MORDERSE LAS MANOS	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
ESCASO CONTACTO OCULAR	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
LENGUAJE REPETITIVO	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
HIPEREXTENSIBILIDAD ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
OREJAS GRANDES Y/O PROMINENTES	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
MACROORQUIDISMO	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
SURCO SIMESCO O LÍNEA DE SYDNEY	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
HISTORIA FAMILIAR DE RETRASO MENTAL	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
PUNTUACIÓN TOTAL	<input type="checkbox"/>

Criterio de puntuación: 0=No presente, 1=Dado o presente en el pasado, 2=Presente

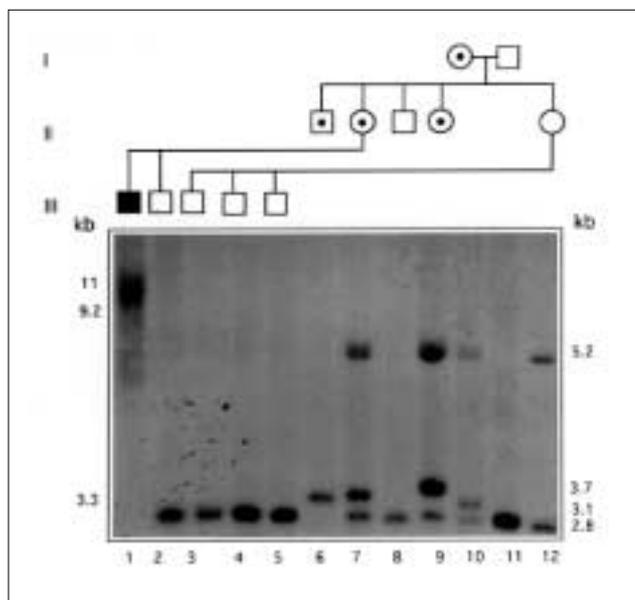
**Figura 1.** Protocolo clínico para el diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil (Hagerman 1991). Se valoran 13 parámetros clínicos, con puntuación de 0 a 2 para cada uno, que proporcionan un valor orientativo sobre el fenotipo del paciente. Una puntuación por encima de 13 es un valor indicativo para realizar un estudio genético del síndrome del cromosoma X frágil.

## Resultados

La valoración clínica de los varones afectados según el protocolo de Hagerman (fig. 1) dio una media general de 16,5 sin tener en cuenta la edad. En la edad prepuberal los parámetros más indicativos fueron: la hiperactividad y la hiperlaxitud articular, mientras que en la edad postpuberal fueron la evitación de la mirada y el macroorquidismo.

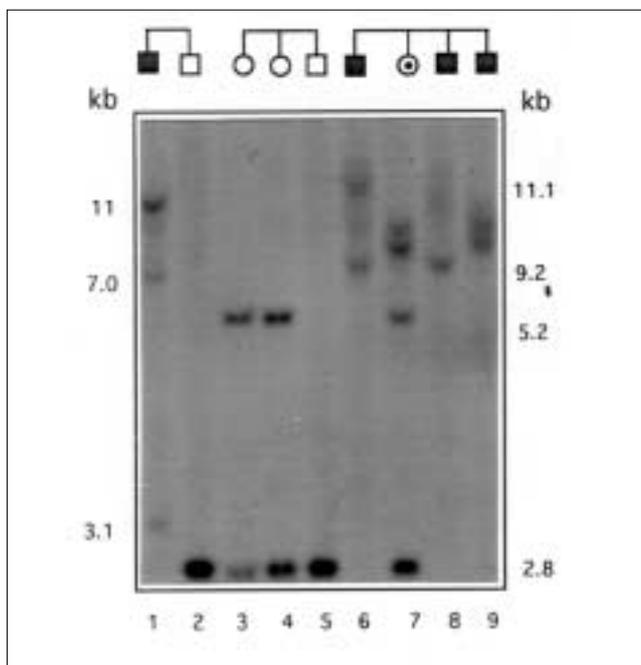
Todos los varones afectados que se estudiaron citogenéticamente, mostraron fragilidad en Xq27.3 entre un 3 y un 20% de las metafases estudiadas. Respecto a las mujeres tan sólo se observó citogenética positiva en 6 de ellas.

En la tabla I se describen los diferentes grupos de individuos según los resultados del estudio molecular en las 85 familias. Mediante el análisis con la sonda StB12.3 se confirmó el diag-



**Figura 2.** Análisis del síndrome del cromosoma X frágil con la sonda StB12.3 tras doble digestión con *EcoRI/EagI* en una familia con un miembro afecto. Los símbolos en blanco indican normales, los negros afectados y los punteados portadores. El tamaño de las bandas se indica en kilobases (kb). Carril 1 varón afecto; carriles 2,-5, 8 y 11 varones normales; carril 6, NTM; carriles 7, 9 y 10 mujeres portadoras; y carril 12 mujer normal.

nóstico de síndrome del cromosoma X frágil en 126 varones, se detectaron 197 mujeres portadoras (23 de ellas con retraso mental 12%), en 282 individuos se descartó la presencia de la mutación, se observaron 15 casos de varones normales transmisores (NTM) y se dedujo la existencia de otros 6 casos más. La deducción se hizo en base a la presencia de dos o más hermanas portadoras de la premutación, madre sin alteraciones en el gen *FMR-1* y padre fallecido. En la muestra estudiada no se observaron mutaciones *de novo*, ni otras mutaciones distintas a la descrita para la zona repetitiva. En las figuras 2 y 3 se muestra el análisis de varios individuos afectados y portadores de síndrome del cromosoma X frágil. En esta figura se muestran los patrones obtenidos para algunos de los casos, tras una doble digestión con *EcoRI* y *EagI* y posterior hibridación con la sonda StB12.3. El varón normal muestra una sola banda de 2,8 kb, y la mujer normal muestra dos bandas una de 2,8 kb que corresponde al cromosoma X activo y otra de 5,2 kb que corresponde al cromosoma X inactivo (metilado). Los NTMs muestran una sola banda, pero sensiblemente de mayor tamaño que los varones normales, aunque por debajo de la banda de 5,2 kb, lo que nos indica que no está metilado. En las mujeres portadoras observamos cuatro bandas, las dos normales de 2,8 y 5,2 kb respectivamente y otras dos próximas a éstas, según el tamaño de la expansión. El varón afecto del síndrome muestra una banda superior a 5,2 kb indicando expansión y metilación, o una zona difusa que indica la inestabilidad mitótica de la repetición (CGG)n. La mujer portadora de la mutación completa muestra el cro-



**Figura 3.** Análisis del síndrome del cromosoma X frágil con la sonda StB12.3 tras doble digestión con *EcoRI/EagI* en miembros de tres familias. Los símbolos en blanco indican normales, los negros afectados y los punteados portadores. El tamaño de las bandas se indica en kilobases (kb). Carril 1, varón afecto en mosaico, mostrando una banda de 3,3 kb y una zona difusa de 8 kb; carriles 6, 8 y 9 varones afectados; carril 7, mujer portadora de la mutación completa; carriles 3 y 4 mujeres normales; y carriles 2 y 5 varones normales.

mosoma normal en la banda de 2,8 kb y el mutado por encima de 5,2 kb ya sea una sola banda o una zona difusa. Finalmente hemos de contemplar la posibilidad de mosaicos cuando coexiste la situación de premutación y mutación. (Fig. 3).

La región repetitiva (CGG)<sub>n</sub> fue estudiada mediante PCR en todas las familias, lo que permitió obtener alelos entre 20 y 50 repeticiones en los miembros que no mostraron expansión de la zona repetitiva y permitió definir el rango de repeticiones de 53 a 127, cuando se estudiaron las mujeres portadoras y los varones NTM. No se obtuvo amplificación por encima de 127 (CGG)<sub>n</sub>.

Adicionalmente se analizaron 297 cromosomas normales independientes, obteniéndose el valor de 29 repeticiones como el más frecuente (24%) y un rango de 17 a 54 repeticiones (Fig. 4).

## Discusión

### Manifestaciones clínicas del síndrome del X frágil

Martin y Bell describieron en 1943 un cuadro clínico de retraso mental, que afecta a varones y se caracteriza por cara alargada, orejas grandes y salientes, y macroorquidismo<sup>(1)</sup>. A pesar de estas características clínicas específicas, el único rasgo presente en todos los varones afectados es el retraso mental, y la

clínica completa se encuentra solamente en el 60% de los afectados. Desde el punto de vista clínico y diagnóstico, debe distinguirse entre la etapa pre y postpuberal, y lógicamente entre varones y mujeres. Incluso dentro de cada uno de estos subgrupos se observa una gran variabilidad fenotípica, por lo que el diagnóstico clínico a veces resulta muy difícil.

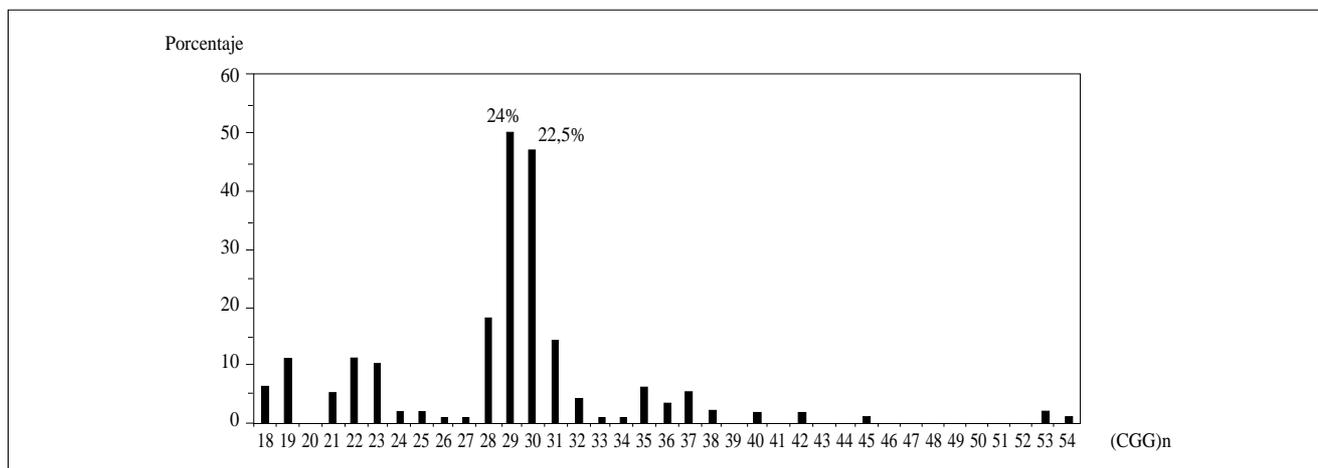
En los varones de edad prepuberal las manifestaciones clínicas del síndrome del cromosoma X frágil están muy atenuadas, con retraso mental que va de leve a moderado y retraso en la maduración motora. La sedestación se produce alrededor de los 9 meses, la deambulación a los 18 meses y el inicio del habla entre los dos años y medio y los tres, con un lenguaje muy pobre y repetitivo, que resulta muy característico. Existe hiperactividad motriz como signo más constante. En este período el aspecto facial no suele ser característico. Finalmente, en algunos casos puede observarse hiperlaxitud articular.

A medida que estos niños crecen, van apareciendo los signos descritos originalmente. El retraso mental se hace más evidente, la cara se alarga y el 80% de los varones en edad postpuberal presentan macroorquidismo. La hiperlaxitud articular puede estar presente y también es frecuente el prolapso de la válvula mitral. Los trastornos de conducta son característicos, con un lenguaje pobre y repetitivo, tendencia a autolesiones en las manos como consecuencia de mordeduras, movimientos estereotipados, evitación de la mirada y actitud defensiva. De este modo, el diagnóstico clínico en el período postpuberal resulta más fácil. Hagerman describió un protocolo en el que se valoran 13 parámetros clínicos, con puntuación de 0 a 2 para cada uno, que proporciona una información cuantitativa sobre el fenotipo del paciente<sup>(2)</sup> (Fig. 1). Una puntuación por encima de 13 es un valor indicativo para solicitar un estudio genético de síndrome del cromosoma X frágil.

En las mujeres no existen rasgos físicos característicos, manifestando un retraso mental ligero, con trastornos de conducta, aislamiento y angustia social, así como un sentimiento de indefensión. El retraso en el lenguaje está presente y el retraso escolar se centra fundamentalmente en el área de las matemáticas.

### Citogenética del síndrome del cromosoma X frágil

Durante muchos años los estudios citogenéticos fueron el único instrumento de laboratorio para confirmar el diagnóstico clínico de este síndrome. El cromosoma frágil en Xq27.3 puede detectarse en prácticamente todos los varones afectados, pero difícilmente en las mujeres portadoras. De las mujeres portadoras estudiadas, sólo el 20% presentaban fragilidad del cromosoma Xq27.3 y todas ellas eran portadoras de la mutación completa en el estudio molecular, no se detectó nunca en los varones portadores, ni en mujeres que resultaron ser portadoras de la premutación en el estudio molecular. De forma similar, el análisis cromosómico tiene muy poca fiabilidad en el diagnóstico prenatal de este síndrome. Por todo lo mencionado se deduce que actualmente los estudios cromosómicos no deben utilizarse como método diagnóstico para el síndrome del cromosoma X frágil al disponer de métodos moleculares mu-



**Figura 4.** Distribución del número de repeticiones (CGG)n del gen *FMR-1* en 297 cromosomas normales independientes de la población española.

cho más precisos.

### Diagnóstico molecular de síndrome del cromosoma X frágil

El análisis de la secuencia repetitiva (CGG)n del gen *FMR-1* permite el diagnóstico directo de la mutación principal del síndrome del cromosoma X frágil, mejorando los estudios moleculares previos basados en métodos indirectos<sup>(17)</sup>. El estudio consiste en analizar el número de repeticiones y el estado de metilación de la isla CpG adyacente al gen *FMR-1*. Mediante el análisis de Southern estudiamos el tamaño de la expansión (CGG)n y el estado de metilación de la isla CpG de *FMR-1*, permitiendo identificar tanto los individuos afectados como los familiares a riesgo.<sup>(18)</sup>

Con el estudio por PCR, obtenemos información sobre el número exacto de repeticiones que tiene un individuo, pero no sobre la metilación. No obstante, el análisis mediante PCR tiene importancia para el consejo genético de los portadores, ya que existe una relación directa entre el número de repeticiones y la probabilidad de que se produzca el paso de premutación a mutación completa en la siguiente generación y por lo tanto la probabilidad de tener hijos afectados. Así, para una mujer con una premutación por encima de las 90 repeticiones la penetrancia es del 100%. Si la mujer portadora tiene alrededor de 54 repeticiones (límite inferior) la penetrancia es del 18%<sup>(8)</sup>. La técnica de PCR presenta algunas limitaciones, siendo la principal que los alelos con un elevado número de repeticiones (CGG)n son muy difíciles de amplificar. En nuestro caso, el máximo conseguido fue de 127 repeticiones. De este modo, las mujeres portadoras de la mutación completa podrían aparecer como falsos negativos, por lo que es necesario combinar el estudio de PCR con el análisis de Southern.

Nuestros resultados indican que todos los varones con mutación completa (incremento superior a 200 repeticiones) presentan retraso mental, excepto uno, que a pesar de mostrar la mutación completa presenta la isla CpG adyacente sin metilar. Este caso tiene un coeficiente intelectual (C.I.) de 102, sin mostrar

ningún rasgo fenotípico del síndrome, comportándose como un varón transmisor a los que se ha llamado altamente funcionantes (*high functioning male*, HFM)<sup>(19)</sup> el término altamente hace referencia a su nivel intelectual respecto a los otros varones afectados del síndrome. Esta observación apoya que el fenotipo se correlaciona fundamentalmente con la metilación de la isla CpG, más que con el incremento del número de tripletes (CGG)n.

Los 15 varones catalogados de NTM (10,5%) presentaban inserciones pequeñas que corresponden a una premutación (50-200 (CGG)n). El número de NTMs detectados es inferior al citado en la literatura (20%), pero en 6 casos adicionales se ha podido deducir la existencia obligada de NTMs, los cuales habían fallecido, cuya contabilización permite obtener una proporción del 14%.

Todas las madres de los varones afectados eran portadoras de la premutación o de la mutación completa, por lo que no se observó ninguna mutación «de novo». De las 197 mujeres portadoras identificadas, 57 presentan la mutación completa (29%) y 140 (71%) muestran un pequeño incremento que corresponde a una premutación. La PCR mostró variaciones de 53 a 127 repeticiones, siendo muy difícil de amplificar los alelos que estaban por encima de 100 repeticiones. Según nuestros datos un 40% del total de mujeres portadoras de la mutación completa, tienen retraso mental que precisa de educación especial, mientras que el resto de portadoras de la mutación completa tienen un coeficiente intelectual en el límite de la normalidad. Una de estas mujeres portadoras tiene retraso mental y citogenética positiva, y es portadora de la expansión en ambos cromosomas<sup>(20)</sup>, uno heredado del padre con la premutación y el otro con la mutación completa heredado de la madre.

Considerando todos los casos, se han detectado 15 casos de mosaicismo (4,5%), donde coexisten la mutación completa y la premutación, valor que de nuevo resulta inferior al citado por otros autores de 15%<sup>(4)</sup> y 28%<sup>(21)</sup>. La mayoría de estos mosaicos se detectaron en varones, apoyando los resultados publicados por Rousseau<sup>(22)</sup>.

Se han estudiado dos casos de gemelos monocigóticos, comprobados mediante estudios moleculares. El primero de ellos se trata de dos varones, ambos con retraso mental, con citogenética positiva (3%) y con un incremento distinto de la zona repetitiva, debido a inestabilidad mitótica que daría lugar a un patrón de Southern heterogéneo, contrariamente a los datos citados por Rousseau<sup>(4)</sup> que menciona tres pares de gemelos mono- zigóticos con un patrón idéntico. Por el contrario, el otro caso consiste en dos gemelas, con idéntica expansión, pero una de ellas presenta retraso mental y la otra no. La explicación para este caso estaría en la inactivación preferencial de uno u otro cromosoma X, de forma que la mujer en la cual el X inactivo es preferentemente el que tiene el alelo con la mutación no presenta retraso mental, mientras que en la otra mujer ocurre lo contrario<sup>(16)</sup>. Este caso apoya la necesidad de realizar una doble digestión *EcoRI* y *EagI*, que permite el análisis simultáneo de la amplificación y del estado de metilación de la isla CpG.

El estudio de 297 cromosomas independientes, pertenecientes a la población general, mostró que el número más frecuente de repeticiones (CGG)n fue de 29, como en población americana, incluyendo los grupos caucásico, negro, hispano y asiático<sup>(8)</sup>. El rango de 17 a 54 (CGG)n es igualmente comparable, si bien el límite inferior en nuestro caso se sitúa por encima y el máximo de 54 corresponde a la zona de solapamiento entre el límite superior normal y el premutado (Fig. 3).

### Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que el estudio directo de la zona repetitiva (CGG)n del gen *FMR-1* representa el test de elección para el diagnóstico de familiares de riesgo de los individuos afectados de síndrome del cromosoma X frágil: varones normales, transmisores y afectados y mujeres normales y portadoras. El estudio molecular de *FMR-1* resulta fundamentalmente eficaz para el diagnóstico prenatal, debido a la perfecta correlación entre las distintas situaciones clínicas y el patrón molecular observado. Tan sólo en el caso del diagnóstico prenatal en fetos del sexo femenino, permanece la incógnita sobre su nivel de afectación de retraso mental cuando se observa la mutación completa, por el contrario, si conocemos perfectamente que en estado de premutación o gen sin alteraciones, no van a tener repercusiones fenotípicas.

Los individuos con clínica sugestiva de síndrome del cromosoma X frágil y estudios citogenéticos y moleculares negativos podrían tener mutaciones distintas a la descrita para la zona repetitiva (CGG)n, como ya ha sido descrito en algunos casos<sup>(23-26)</sup>. Por otra parte, los casos negativos pueden ser estudiados para el gen *FRAXE*, localizado en la región Xq28, el cual tiene una región repetitiva (CGG)n que se encuentra expandida en los pacientes afectados y en las mujeres portadoras<sup>(27)</sup>.

La metodología de que disponemos en la actualidad permite el diagnóstico y prevención del síndrome del cromosoma X frágil (FRAXA) de forma eficaz. Teniendo en cuenta que es la causa más frecuente de retraso mental hereditario, el análisis de la expansión (CGG)n del gen *FMR-1* debe realizarse, no sólo cuando existen criterios clínicos de FRAXA, sino ante cualquier

caso de retraso mental no filiado. El estudio molecular del gen *FMR-1* en los casos con sospecha clínica debe permitir el diagnóstico de esta patología, facilitando una intervención precoz en los individuos afectados, posibilitando así un mejor desarrollo psicomotor de los mismos.

Finalmente, la prevención en las familias afectas deberá conducir a una reducción de la incidencia de esta causa de retraso mental.

### Agradecimientos

Agradecemos a J.L. Mandel por proporcionarnos la sonda StB12.3, al «Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social» (FISS) (beca 93/0004-01 y 0004-02), al Servicio de Neuropediatría de San Juan de Dios, y al Servicio Neuro-Infantil del Hospital Virgen de la Arrixaca por su colaboración en el envío de los pacientes.

### Bibliografía

- 1 Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J.Neurol Neurosurg Psychiatry* 1943;**6**:154-160.
- 2 Hagerman R, Amiri K, Conister A. Fragile X checklist. *Am J Hum Genet* 1991;**38**:283-287.
- 3 Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 1969;**21**:231-235.
- 4 Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in Fragile X syndrome. *Science* 1991;**252**:1097-1102.
- 5 Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schelessinger D, S Utherland GR, Richards RI. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;**252**:1179-1181.
- 6 Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl PA, Pizutti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen Be, Van Ommen GJB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunts CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson D, Oostra BA, Warren ST. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG Repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in Fragile X Syndrome. *Cell* 1991;**65**:905-914.
- 7 Pieretti M, Zhang F, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson D. Absence of Expression of the FMR-1 Gene in Fragile X Syndrome. *Cell* 1991;**66**:817-822.
- 8 Fu YH, Kuhl PA, Pizutti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH, Holden JA, Fenwick RG, Warren ST, Zhang F, Oostra BA, Caskey CT, Nelson D. Variation of the cgg repeat at the fragile x site results in genetic instability : resolution of the sherman paradox. *Cell* 1991;**67**:1047-1058.
- 9 Gustavson KH, Blomquist H, Holmgren G. Prevalence of fragile-X syndrome in mentally retarded children in a Swedish country. *Am J Med Genet* 1986; **23**: 581-588.
- 10 Webb TP, Bunday SE, Thake AI, Todd J. Population incidence and segregation ratios in the Martin Bell syndrome. *Am J Med Genet* 1986;**23**:573-580.
- 11 Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* 1984;**48**:21-37.
- 12 Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-

- Peebles PN, Nielsen KB, Partington NW, Sutherland GR, Turner G, Watson M. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985;**69**:3289-329.
- 13 Tizzano E, Gallano P, Baiget M. Importancia del diagnóstico molecular en la detección de varones sanos transmisores de síndrome del X-frágil. *An Esp Pediatr* 1992;**36**:272-276.
- 14 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;**16**:1215.
- 15 Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberlé I, Mandel JL. On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1992;**43**:197-207.
- 16 Kruyer H, Milà M, Glover G, Carbonell P, Ballesta F, Estivill X. Fragile X syndrome and the (CGG)<sub>n</sub> mutation, two families with discordant monozygotic twins. *Am J Hum Genet* 1994;**54**:437-442.
- 17 Ramos FJ. Síndrome frágil X: ¿Que sabemos hoy?. *An Esp Pediatr* (1989);**31**:417-419.
- 18 García-Marcos JA, Moreno F, Pascual-Castroviejo I, López Pajares I, Delicado A, Lorenzo G. Diagnóstico molecular en familias afectadas de síndrome X frágil. *Rev Esp Pediatr* (1992);**48**:183-188.
- 19 Hagerman R, Hull C, Carpenter I, Staley L, O'connor R, Seydel C, Mazzocco M, Taylor A. High functioning fragile X males. *Am J Hum Genet* 1993;**53**:A 144.
- 20 Mazzocco MMM, White BN, Holden JJA. The fragile X syndrome: A family with three homozygous fra(X) sisters. *Am J Hum Genet* 1993;**53**:A 143.
- 21 De Vries BA, Wiegers A, Graaff E, Verkerk A, Van Hemel JO, Halley D, Fryns JP, Curf L, Niermeijer M, Oostra B. Mental status and fragile X expression in relation to FMR-1 gene mutation. *Eur J Hum Genet* 1993;**1**:72-79.
- 22 Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, Macpherson J, Petterson U, Mathew C, Mornet E, Maddalena A, Schinzel A, Marcos Jag, Schorderet Df, Schaap T, Maccioni L, Russo S, Jacobs PA, Schwartz C, Mandel JL. Fragile X collaborative group. *Am J Hum Genet* 1993;**53**:A 78.
- 23 Wöhrle D, Kotzot D, Hirtst M, Manca A, Korn B, Schmidt A, Gotthold B, Rott HD, Poustka A, Davies KE And Steinbach P. A microdeletion of less than 250kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 1992;**51**:299-306.
- 24 Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GrR, Mulley JC. Fragile X syndrome without CGG amplification has an FMR1 deletion. *Nat Genet* 1992;**1**:341-344.
- 25 De Boule K, Verkerk AJMH, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van Den Bos F, Graaff E, Oostra B, Willems PJ. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 1993;**3**:31-35.
- 26 Tarleton J, Richie R, Schwartz CH, Rac K, Aylsworth As, Lachiewicz A. An extensive de novo deletion removing FMR-1 in a patient with mental retardation and fragile X syndrome phenotype. *Hum Mol Genet* 1993;**2**:1973-1974.
- 27 Knight J, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou SR, Phelps SR, et al. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* (1993) **74**:127-