

Gran variabilidad de los alelos del gen FMR2 en una población normal del departamento de Risaralda.

• **LUCERO RENGIFO R.**

Bióloga Genetista. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira.

• **JORGE RODRÍGUEZ RUEDA.**

Magister en Bioquímica. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira.

• **PAULA ALEJANDRA OSORIO VARGAS**

Química Industrial. Asistente de Investigación, Laboratorio Cenbiotep.

Miembros del grupo de Investigación del Centro de Biología Molecular y Biotecnología (Cenbiotep), Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira.

Resumen

Se analizó por PCR y Southern Blot 1220 alelos del gen FMR2 correspondientes a 464 hombres y 378 mujeres con edades entre 18 y 81 años en una población normal del Departamento de Risaralda para encontrar la frecuencia y la distribución. La distribución alélica del gen FMR2 mostró una gran variabilidad en esta población. Se encontraron alelos entre 2 y 57 repeticiones CCG. Los alelos en el rango normal (3-30 repeticiones) los agrupamos en las siguientes categorías: 2-15 repeticiones, 137 alelos (11.2%); 16-30 repeticiones, 743 alelos (60.9%). El alelo más frecuente fue de 26 repeticiones (203, 16.6%) seguido por el alelo con 21 repeticiones (192, 15.7%). Los alelos intermedios en el rango entre 31-60 repeticiones fueron 340 (27.9%), el más frecuente con 32 repeticiones en 143 alelos (11.7%) seguido por el alelo de 34 repeticiones en 62 alelos (5.1%). No encontramos alelos mayores de 57 repeticiones. Las mujeres homocigóticas fueron el 78.5% y el genotipo más frecuente fue de 21-21 en 55 casos seguido por el de 26-26 con 46 casos. No hubo diferencias significativas por género.

Palabras clave: Gen FMR2, retardo mental, alelos normales, intermedios y premutados, frecuencia alélica

Recibido para publicación: 5-10-2004

Aceptado para publicación: 29-10-2004

Introducción

El síndrome frágil X E (FRAX E; MIM#309548) es la forma más prevalente de retardo mental ligado al X no sindrómico (NS-XLMR) y afecta al menos 1 de cada 23423 varones (1,2). Como en el síndrome FRAXA, en esta entidad se ha identificado otro sitio folato-sensitivo entre las regiones Xq27 y Xq28 denominado FRAXE y se encuentra localizado a 600 kb distalmente a la región FRAXA (3).

Los síndromes FRAXA y FRAXE son desórdenes debidos a expansiones de tripletas repetitivas y aunque se encuentran relacionados por mecanismos comunes de expansión y metilación anormal, se reconocen como entidades diferentes. Se clasifican como retardo mental ligado al cromosoma X por el gen FMR-1 (Fragile Mental Retardation-1) para el síndrome FRAXA y por el gen FMR-2 para el síndrome FRAXE (1,2). Deben buscarse en pacientes que presenten retardo mental severo, moderado o leve, conductas autistas, autismo, dificultad en el aprendizaje e hiperactividad (3). Los individuos con esta expansión tienen el marcador citogenético del síndrome FRAXA pero son negativos para la mutación FMR1 (4, 5).

El alelo normal tiene entre 3-30 repeticiones de la tripleta CCG el cual es naturalmente polimórfico en la población general y no se encuentra interrumpido por la tripleta AGG (6). Los individuos afectados presentan más de 200 repeticiones de la tripleta CCG en el gen FMR-2 que a su vez se encuentra anormalmente metilado, aunque estudios recientes muestran que la expansión y la metilación son menores para el locus FRAXE comparado con el locus FRAXA (7, 8). Tanto la expansión como la metilación ocasionan una síntesis incompleta o una ausencia de la proteína FMR2. El extremo 5' del gen FMR2 se encuentra dentro de la isla CpG (9). Los alelos intermedios y premutados no se están

bien definidos. Los estudios poblacionales realizados hasta ahora consideran que el rango del alelo intermediario puede estar entre 31 y 60 repeticiones CCG y el alelo premutado entre 60 y 199 repeticiones CCG (1, 6, 10).

Los afectados con el síndrome FRAXE no expresan un fenotipo característico y por esto se encuentra dentro de los síndromes denominados como retardo mental no sindrómico. Los individuos afectados presentan retardo mental de leve a moderado y otras alteraciones de la conducta (7, 10, 11). Sin embargo, individuos sin retardo mental que tienen la mutación completa FRAXE y en consecuencia carecen de la expresión de la proteína FMR2 también han sido reportados (8). Diferentes estudios poblacionales han calculado la prevalencia en un rango de 1/50.000-1/23.423 varones (6, 11, 12). Ningún estudio de portadores de la premutación se ha hecho para medir el posible impacto de este alelo.

En común con otras enfermedades por repetición de tripletas, el síndrome FRAXE ha demostrado estados de anticipación con incremento progresivo en el número de repeticiones en generaciones sucesivas de familias afectadas (7,12). Reducciones en el número de repeticiones de FRAXE también se observan frecuentemente incluyendo reversiones de la mutación completa a premutación y en este respecto FRAXE difiere de FRAXA (3, 7, 13).

Se conoce que los hombres con la mutación FRAXE pueden tener hijas afectadas (14), en contraste con FRAXA donde los varones con la mutación completa rara vez se reproducen y cuando lo hacen transmiten un alelo premutado a sus hijas (15,16). No parece existir la misma restricción sexo-específica en la transmisión de los alelos FRAXE

como se ve en FRAXA. La incidencia de la mutación completa de FRAXE es desconocida. La mayoría de las mutaciones completas detectadas para FRAXE han sido el resultado de las pruebas para FRAXA ya que los tamizajes para FRAXE son raros (14).

En un estudio para determinar la frecuencia de los alelos inusuales, incluyendo el rango de los tamaños de los alelos con premutación y mutación completa de FRAXA y FRAXE y la estabilidad de los alelos en la transmisión de madre a hijo en una población de niños con dificultades en el aprendizaje, se encontró en los cromosomas X de los muchachos una premutación con 87 repeticiones CCG. También se encontró un exceso significativo de alelos intermediarios de FRAXE en los cromosomas X de los niños en comparación con los cromosomas X maternos controles. Estos resultados sugieren que repeticiones relativamente grandes entre 31-60 repeticiones para FRAXE pueden jugar algún papel en la disfunción mental, contribuyen en 0.0020 a la prevalencia total y en 0.0012 a la prevalencia atribuible de la dificultad en el aprendizaje (Murray et al, 1997). No se ha observado ninguna inestabilidad en transmisiones de alelos comunes o normales en FRAXA y FRAXE (17).

Sin embargo en un estudio de 276 niños con retardo mental no específico y con dificultades del aprendizaje y un grupo control de 207 niños en el Brasil donde se analizó la relación fenotípica con los alelos expandidos no metilados (intermediarios y permutados) de los loci FRAXA/FRAE, no se encontró una diferencia significativa de los alelos intermedios entre la población control y la población con retardo mental y alteraciones cognitivas. Esto sugiere que repeticiones no metiladas largas pueden no estar asociadas con alteraciones cognitivas y de la conducta (18).

Recientemente se identificó el gen FMR3 asociado con el síndrome FRAXE. Se origina en la isla CpG de FRAXE y se transcribe desde la cadena opuesta del gen FMR2. FMR3 se encuentra silenciado por la mutación completa de FRAXE. Aún no se conoce la asociación de la mutación completa con retardo mental moderado y posiblemente FMR3 está potencialmente involucrado (19).

En un estudio anterior donde realizamos el análisis de las mutaciones FRAXE por métodos citogenéticos y moleculares en 204 pacientes con alteraciones cognitivas y otras alteraciones de la conducta, 124 (60.8%) hombres y 80 (39.2%) mujeres con edades comprendidas entre los 5 y 32 años, institucionalizados en 3 centros de educación especial de las ciudades de Pereira y Armenia, se encontraron 2 hermanos con la mutación completa FRAXE; éstos representan el 1.96% de la población estudiada (20).

En el presente estudio se determinó la frecuencia de los alelos del gen FMR2 en una población del departamento de Risaralda sin alteraciones cognitivas con el propósito de valorar el riesgo de la población para la manifestación de alelos premutados o mutados que determinen el fenotipo del síndrome FRAXE.

Materiales y métodos

Población analizada: 464 hombres (55.1%) y 378 mujeres (44.9%) en edades comprendidas entre 18 y 87 años, quienes participaron voluntariamente previo consentimiento informando, procedentes de 11 municipios del departamento de Risaralda: Pereira, Dosquebradas, La Virginia, Santa Rosa, Apía, Pueblo Rico, Santuario, Quinchía, Guática, Balboa y Belén de Umbría.

Extracción de ADN: Se aisló el ADN de 5 mL de sangre recolectada en tubos con EDTA, utilizando el PUREGENE DNA Isolation Kit de Gentra Systems (Minneapolis, USA).

Amplificación por PCR: El sitio frágil fue detectado usando el método de amplificación por PCR con los primers FMR598 y FMR603 de acuerdo con el método descrito en Knigh et al, 1993 (13) y Rengifo et al, 1999 (20).

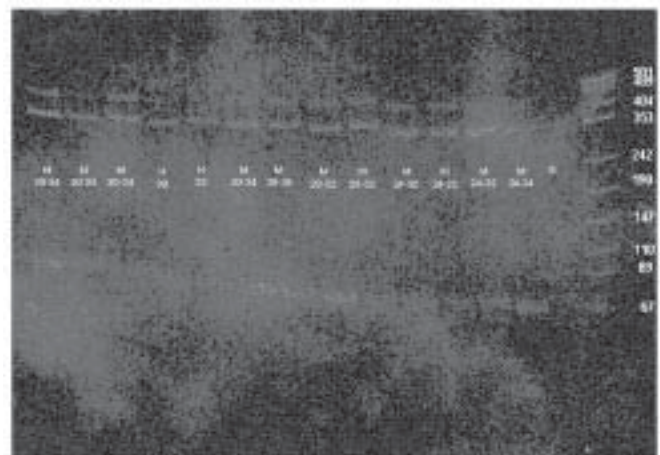
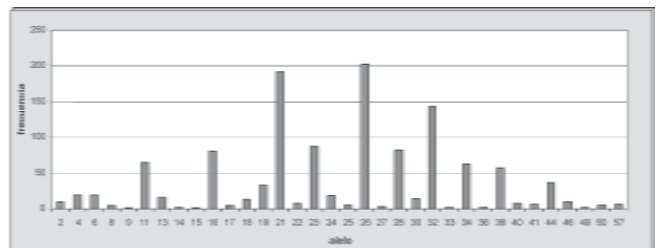
En un volumen final de 15µl que contenía: buffer Tris-HCl 100mM pH 8.0, KCl 50mM, MgSO₄ 25mM, dATP, dTTP, dCTP, 10mM each, 7deaza deoxiguanosine-5' trifosfato en vez de dGTP 10mM, Enhancer 3X (Lifetech GIBCO), 5uM de los iniciadores FMR598 y FMR603 (13), *platinum Taq polymerase* (Lifetech GIBCO) 1,2U y 50-100ng de ADN. Fue usado el termociclador Gen Amp PCR system 9700 PE. Para la amplificación se incluyó una denaturación inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos con desnaturalización a 95° durante 60s, unión de los primers a 65°C durante 90s, extensión a 72°C durante 2 min y una extensión final a 72°C durante 7,5 min. El monitoreo se hizo mezclando 15µl del producto de PCR con 5µl buffer de carga. La identificación se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida no denaturante al 10% y se corrió en buffer Tris borato EDTA (TBE) a 300V por 45 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio usando como marcador de peso molecular pUC digerido con *MspI* que nos permitió determinar de manera precisa el tamaño de cada uno de los fragmentos.

El análisis estadístico se realizó considerando: (a) el estado heterocigótico y homocigótico de las mujeres para los dos cromosomas X para las repeticiones de las tripleteas GGC en el sitio FRAXE; (b) los cromosomas X de los hombres.

Resultados

El número de alelos analizados para el locus FRAXE fue de 1220. Se encontraron alelos entre 2 y 57 repeticiones GGC. Los alelos en el rango normal (3-30) repeticiones GGC fueron agrupados así: 2-

15 repeticiones, 137 alelos (11.2%); 16-30 repeticiones, 743 alelos (60.9%). El alelo más frecuente tenía 26 repeticiones (203, 16.6%), seguido por el alelo de 21 repeticiones (192, 15.7%). El número de alelos intermedios en el rango de 31-60 repeticiones fue de 340 (27.9%). El alelo más frecuente fue el de 32 repeticiones (143, 11.7%) seguido por el alelo de 34 repeticiones (62, 5.1%). No se encontró ningún alelo con más de 52 repeticiones (figuras 1, 2).



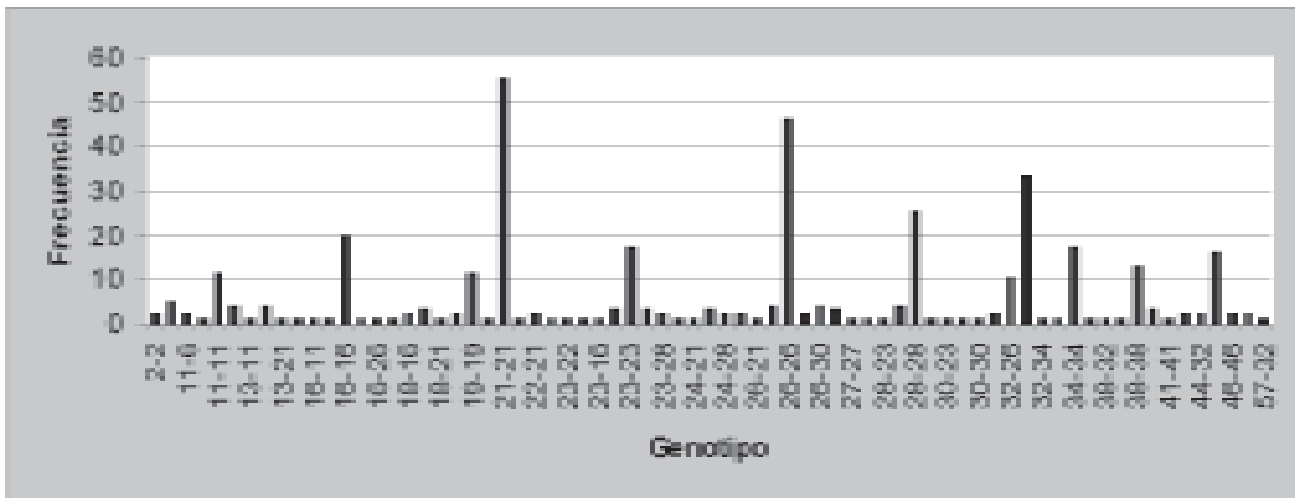


Figura 3. Distribución genotípica del gen FMR2 en mujeres

El 78.5% de las mujeres fueron homocigóticas. El genotipo más frecuente fue de 21-21 con 55 casos y 26-26 con 46 casos (figura 3).

Tabla 1. Distribución de los alelos normales intermedios y premutados del gen FMR2 en 842 individuos normales del Departamento de Risaralda

Categorías	Hombres	Mujeres	Total
Normal 2-30	331 71,3%	549 72,6%	880
Intermedios 31-60	133 28,7%	207 27,4%	340
Premutados 61-200	0 0,0%	0 0,0%	0
Total	464	756	1220

El resultado en mujeres y hombres fue similar y no hubo diferencias significativas de los datos discriminados por sexo y el total de la población. El número de alelos normales e intermedios aparecen en la tabla 1.

Discusión y conclusiones

La caracterización de los alelos del gen FMR2 se ha realizado en varias poblaciones de varones con retardo mental no sindrómico e individuos con

dificultades en el aprendizaje, que acuden a centros de educación especial. En dos de ellos (1,6) se ha podido comprobar que la mutación FRAXE es muy rara. Crawford et al (6) encontró 1 entre 3731 varones con dificultad en el aprendizaje. En este estudio se estimó la prevalencia en 1/23.500. Otros estudios han sido reportados (10, 11, 14, 21) los cuales han permitido calcular la prevalencia en un rango de 1/50.000–1/23.500. Un exceso de alelos intermedios y premutados entre individuos con alteraciones cognitivas son reportados en estos estudios.

En el estudio de Crawford et al (6) donde reunió individuos con alteraciones cognitivas de diferentes grupos étnicos, el alelo normal fue dividido en 3 categorías (de 3-11 repeticiones, 12-20 repeticiones y mayor de 20 repeticiones) y se observó una diferencia entre los blancos americanos y los afroamericanos estadísticamente significativa. Esta diferencia se debe a la frecuencia elevada de alelos pequeños en la población afroamericana comparada con los blancos americanos. La distribución de los blancos americanos fue entre 7-54 repeticiones y presentaron 34 alelos diferentes, mientras que la distribución de los afroamericanos tuvo una distribución similar y solamente 27 alelos diferentes. En nuestro estudio de una población sin alteraciones cognitivas y mestiza encontramos una gran variabilidad en la

distribución alélica del gen FMR2 en el rango del alelo normal (3-30 repeticiones CCG) con 19 alelos diferentes (figura 1).

En el rango del alelo intermedio (31-60 repeticiones) reportado para individuos con alteraciones cognoscitivas se encontró una gran cantidad de alelos intermedios (1, 6, 10). En nuestro estudio 340 alelos se ubican en este rango y el número de alelos diferentes fue de 12. En conclusión, estos hallazgos son concordantes con estudios similares realizados

en otras poblaciones con retardo mental y alteraciones cognoscitivas. Los estudios anteriores, al igual que el nuestro, permiten asegurar que el gen FMR2 es muy polimórfico. La frecuencia de la mutación completa en este estudio fue de 1/23.423 en hombres. Ningún alelo premutado (con más de 57 repeticiones CCG) fue encontrado. La prevalencia de alelo intermedio es entonces de 1/2.194 individuos en ésta población.

Referencias bibliográficas

1. Younigs SA, Murray A, Dennis N, Ennis S, Lewis C, et al. FRAXA and FRAXE: results of a five year survey. *J Med Genet* 2000; 37: 415-421.
2. Gecz J. The FMR2 gene, FRAXE and non-specific X-linked mental retardation: clinical and molecular aspects. *Ann Hum Genet* 2000; 64: 95-106.
3. Sutherland GR, Baker E. Characterization of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum Mol Genet* 1992; 1:111-113.
4. Dennis NR, Curtis G, Macpherson JN, Jacobs PA. Two families with Xq27.3 fragility, no detectable insert in the FMR-1 gene, mild mental impairment, and absence of Martin-Bell phenotype. *Am J Med Genet* 1992; 43:232-236.
5. Flynn GA, Hirst MC, Knight SJL, Macpherson JN, Barber JCK, Flannery AV, Davies KE, et al. Identification of the FRAXE fragile site in two families ascertained for X linked mental retardation. *J Med Genet* 1993; 30:97-100.
6. Crawford DC, Meadows KL, Neuman L, et al. Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large ethnically diverse, special education-needs population. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 495-507.
7. Hamel BJ, Smits AT, de Graaff E, Smeets DFCM, Eussen BHJ, Knight SJL, Davies KE, et al. Segregation of FRAXE in a large family: clinical, psychometric, cytogenetic and molecular data. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 923-931.
8. Gecz J, Oostra BA, Hockey A, Carbonell P, Turner G, Haan EA, Sutherland GR, et al. FMR2 expression in families with FRAXE mental retardation. *Hum Mol Genet* 1997; 6:435-441.
9. Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene FMR2 associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 1996; 13:105-108.
10. Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Linehan P, McKechnie N, Macpherson J, et al. Population screening and FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 1996; 5:727-735.
11. Knight SJL, Ritchie RJ, Chakrabarti L, Cross G, Taylor GR, Mueller RF, Hurst J, et al. A study of FRAXE in mentally retarded individuals referred for fragile X syndrome (FRAXA) testing in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 906-913.
12. Brown WT. The FRAXE syndrome: is it time for routine screening? *Am J Hum Genet* 1996; 58:903-905.
13. Knight SJL, Flannery AV, Hirst MC, Campbell L, Chistodoulou Z, Phelps SR, Pointo J, et al. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CPC island in FRAXE mental retardation. *Cell* 1993; 74: 127-132.
14. Zhong N, Yang W, Dobkin C, Brown WT. Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am J Hum Genet* 1996b; 57: 351-361.
15. Mulley JC, Yu S, Loesch DZ, Hay DA, Donnelly A,

Gedeon AK, Carbonell P, et al. FRAXE and mental retardation. *J Med Genet* 1995; 32: 162-169.

16. Nolin S, Lewis SA, YE, LL, Houck GE, et al. Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1252-1261.

17. Teague JW, Morton NE, Dennis NR, Curtis G, McKechnie N, Macpherson JN, et al. FRAXA and FRAXE: evidence against segregation distortion and for an effect of intermediate alleles on learning disability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 719-724.

18. Barros-Santos C and Gonçalves-pimentel MM. The influence of expanded unmethylated alleles for FRAXA/FRAXE loci in the intellectual performance among Brazilian mentally impaired males. *Int J of Mol Med*

2003; 12: 385-389.

19. Gécz J. FMR3 is a novel gene associated with FRAXE CpG island and transcriptionally silent in FRAXE full mutations. (Short report) *J Med Genet* 2000; 37: 782-784.

20. Rengifo L, Alegría AH, Aguilar E. Análisis de las mutaciones FRAXA y FRAXE por métodos citogenéticos y moleculares en una población con retardo mental y otras alteraciones de la conducta. *Rev Esp Ped* 1999; 55(5): 434-440.

21. Holden JJA, JulienInalsing C, Chalifoux M, et al. Trinucleotide repeat expansion in the FRAXE locus is non-common among institutionalized individuals with non-specific developmental disabilities. *Am J Med Genet* 1996; 64: 420-424.

