

Comparación de las distribuciones de los alelos del gen FMR1 en una población normal y una población con alteraciones cognitivas.

*ALVARO H. ALEGRIAS.

Médico, PhD Biología Molecular. Director Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira.

*LUCERO RENGIFO R.

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

*HERMAN SERRANO

PhD en Matemáticas. Docente Universidad Tecnológica de Pereira

*JORGE RODRIGUEZ RUEDA

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

*ENRIQUE AGUILAR

Biólogo. Docente Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira.

*DUVERNEY GAVIRIA

Biólogo. Asistente de Investigación, Laboratorio Cenbiotep.

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

Resumen

*El síndrome X-frágil es una de las causas más frecuentes de retardo mental en humanos y está asociado con un sitio cromosómico frágil en Xq27.3. Esta fragilidad se debe a la expansión de una repetición 5'-(CGG)*n*-3' que ocurre naturalmente en la región no traducida 5' del gen FMR1. Se analizó la distribución de los alelos normales, intermedios y premutados para pacientes con desórdenes cognitivos y de comportamiento y para individuos normales en el Departamento de Risaralda usando técnicas de PCR y Southern blot. La población con desórdenes cognitivos y del comportamiento corresponde a casos de autismo, conductas autistas, retardo mental excluyendo el síndrome X-frágil, desórdenes del aprendizaje y desórdenes de la atención. Comparamos los resultados en las dos poblaciones utilizando análisis estadístico. Para la población normal se estudiaron 1171 alelos correspondientes a 364 mujeres y 463 hombres y para la población con desórdenes cognitivos y del comportamiento la muestra correspondía a 284 alelos de 80 mujeres y 124 hombres. Las proporciones de individuos normales, intermedios y premutados en la muestra de la población normal fueron 97.8%, 1.9% y 0.3% respectivamente. En la población con desórdenes cognitivos y del comportamiento los porcentajes de alelos normales, intermedios y premutados fueron 97.5%, 1.4% y 0.4% respectivamente. El caso más frecuente fue de 30 repeticiones CGG en ambos grupos, con 79.6% en la población normal y 72.4% de los casos con desórdenes cognitivos y del comportamiento. Se hizo una prueba de diferencia de varianzas y se encontró que la*

diferencia no era estadísticamente significativa. Dada varianzas iguales, los promedios se compararon y de nuevo se encontró que no había diferencia significativa. Finalmente se compararon las proporciones de individuos normales, intermedios y premutados, en ambas poblaciones y se encontró que eran estadísticamente iguales.

PALABRAS CLAVES: Síndrome X frágil; Gen FMR1; alelos normales, intermedios, premutados; retardo mental; alteraciones del comportamiento.

Recibido para publicación: 05-04-2002

Aceptado para publicación: 09-08-2002

Introducción

El síndrome X- frágil A (FRAXA) constituye una de las causas genéticas más frecuentes de retardo mental en humanos. Su frecuencia se calcula en 1 de 1400-4000 varones y de 1 por cada 2500-8000 mujeres (1). Se encuentra asociado con un sitio folato sensitivo en el cromosoma X en la región Xq27.3. Esta fragilidad es debida a la expansión anormal de una repetición 5'-(CGG)_n-3' que ocurre naturalmente en el promotor y la región 5' no traducida (5'UTR) del gen FMR1 (Fragile Mental Retardation)(2) que codifica para la proteína FMRP. Los individuos afectados tienen una expansión de la tripleta CGG entre 200 y 2000 repeticiones CGG localizada en la región 5' del exon 1 del gen y un patrón de metilación anormal en la isla CpG situada en una región proximal al gen (3,4). Esto ocasiona una ausencia de la proteína que es la causa del síndrome FRAXA. El gen FMR1 se expresa en diferentes tejidos humanos y murinos como cerebro, linfocitos, pulmón, riñón y placenta (5).

El alelo normal es polimórfico, tiene entre 0 y 40 repeticiones CGG y es heredado de una manera estable (6). Esta repetición es críptica cuando está interespaciada por repeticiones AGG encontradas con frecuencia entre las repeticiones CGG 10 y 20 (3) y cada 8-12 repeticiones CGG en muchos alelos normales (6). La variación en longitud de la tripleta CGG se encuentra en el extremo 3' de la repetición y parece que las tripletas AGG juegan un papel crucial para mantener la estabilidad de las repeticiones CGG (7).

El fenotipo de los afectados depende del número de repeticiones CGG, del grado de metilación y del sexo. En varones se presenta talla baja, macrocefalia, pabellones auriculares prominentes, hiperlaxidad articular, macroorquidismo, retardo mental de grado variable (de severo a moderado) y otras alteraciones de la conducta como hiperactividad y conductas autistas. Las mujeres con mutación completa tienen un fenotipo menos severo que el masculino: presentan talla baja, arcada dentaria mayor y retardo mental de moderado a leve y otras alteraciones de la conducta (8,9).

El estado de premutación se presenta cuando el número de repeticiones de la tripleta CGG se encuentra entre 61 y 199 y generalmente no está asociado con metilación anormal en la isla CpG (10,11). Los individuos con la premutación presentan algunos rasgos menores del síndrome y alteraciones del comportamiento (12,13). Estos varones transmiten la premutación a sus hijas las cuales pueden ser normales o presentar alteraciones cognitivas y de la conducta (14,15). También presentan falla ovárica prematura (16). Los hijos de estas portadoras pueden adquirir la mutación completa con una probabilidad del 80% (15).

Los individuos con alelos intermedios, presentan dificultades en el aprendizaje y alteraciones del comportamiento semejantes a las manifestadas por los portadores (17,18).

En familias con X Frágil la prevalencia de premutaciones es más alta que la prevalencia de la mutación completa (8). Algunos autores (19) han propuesto que la prevalencia de mujeres portadoras de premutación o mutación completa puede ser tan alta como 1/250. Sin embargo hay una variación significativa en el estimado de la prevalencia de portadores de premutaciones del X-Frágil: 1/163 -1/1538 (19-22).

Debido a que el síndrome FRAXA tiene una incidencia alta y es la mayor causa de retardo mental hereditario, algunos autores han considerado la posibilidad de tamizar el carácter portador o el estado de premutación para la población en general o para mujeres en edad de concebir (19). Sin embargo muchos autores opinan que se requieren estimativos precisos de la prevalencia de las mutaciones FRAXA antes de la implementación de estos programas (19).

Muchos alelos con la premutación no tienen la interrupción AGG o sólo una copia de ella en el extremo 5' de la repetición CGG (23). Aproximadamente 2/3 de los varones con la premutación no tienen una AGG y aproximadamente 1/3 de los varones tienen AGG en el extremo 5' de la repetición (6,23). La pérdida

de estas interrupciones permiten que alelos con tramos de la tripleta CGG mayores de 30 sin interrupciones sean más susceptibles a expandirse dentro de la premutación. En contraste con el alelo normal, la premutación es inestable y tiende a expandirse a mutación completa (10).

La zona límite o zona gris, llamada así porque se superpone con los rangos del tamaño de la repetición CGG del alelo normal y de la premutación, se ha calculado entre 41 y 60 repeticiones CGG y puede o no heredarse en una forma inestable (24). Esta región se considera de mayor riesgo para cambiar al estado de premutación en la siguiente generación (25). En las mujeres que portan un alelo intermedio es difícil estimar el riesgo genético de tener transmisiones inestables si solamente se considera la longitud total del tamaño de repetición CGG (24). Estudiando familias con alelos en la zona gris, sin previa historia de variación en la estabilidad del alelo FRAXA, no se encontró en ninguna de ellas expansión a mutación completa en una generación. La inestabilidad de la transmisión de los alelos en la zona gris fué observada en el 25% de los alelos con 50-60 CGGs, pero menor a 8% de aquellos con 40-49 CGG. El examen de la organización de los alelos en la zona gris reveló que largos tramos de repeticiones CGGs (mayores a 34) no son siempre transmitidas inestablemente. Estos resultados crean nuevas preguntas relacionadas con los factores familiares que pueden determinar la transmisión de la expansión (26, 27).

Un estudio reciente con población afroamericana mostró un nuevo factor responsable de la inestabilidad de la repetición CGG (28). Los alelos intermedios en la población caucásica se encuentran entre 41 y 60 repeticiones. En la población afroamericana el alelo intermedio se encuentra entre 35 y 60 repeticiones y es mejor definido por tener tramos puros de la repetición CGG o la presencia de una sola interrupción AGG. Esto demuestra la existencia de diferentes alelos susceptibles entre la población mundial y puede explicar la prevalencia similar del síndrome FRAXA comparada con la población caucásica,

además de la baja frecuencia de alelos intermedios en la población afroamericana. Se propone que la carencia de una interrupción más proximal es un factor nuevo involucrado en la inestabilidad de la repetición CGG (28).

Nosotros estudiamos la distribución de estos alelos en dos poblaciones, una de individuos normales del Departamento de Risaralda y la otra de individuos con alteraciones cognoscitivas. Este trabajo compara las dos poblaciones usando técnicas estadísticas. Contrariamente a lo que se esperaba, se encontró que no hay diferencia significativa entre las distribuciones de estados premutados y estados asociados con la enfermedad FRAXA en las dos poblaciones.

Materiales y Métodos

Se realizó el análisis molecular del sitio FRAXA en 807 individuos normales, 443 hombres (54.89%) y 364 mujeres (45.11%) en edades comprendidas entre 15 y 68 años quienes participaron voluntariamente previo consentimiento informado y que procedían de 11 municipios del Departamento de Risaralda (Pereira, Dosquebradas, Santa Rosa, La Virginia, Apía, Quinchia, Guática, Pueblo Rico, Santuario, Balboa y Belén de Umbría); y en 204 pacientes, 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 colombianas de Pereira y Armenia, los cuales fueron clasificados de acuerdo a sus alteraciones cognitivas con retardo mental severo, moderado o leve, autismo, conductas autistas, hiperactividad - déficit de atención y dificultad en el aprendizaje (tabla1).

Para el análisis molecular se aisló el DNA de 5ml de sangre recolectada en tubos con EDTA, utilizando el PUREGENE DNA Isolation Kit de Gentra Systems (Minneapolis, USA). Se realizó la detección del sitio FRAXA por el método de amplificación por PCR con los iniciadores FMR392 y FMR503 de acuerdo con los métodos de Brown y cols (29). Se determinó la presencia de esta amplificación y el nivel de metilación del mismo sitio por Southern blot, realizando digestión genómica con las enzimas sensibles a la metilación EcoR1 y Eag1 e hibridización con la sonda StB12.3 de acuerdo con las técnicas descritas por Rousseau y cols (12).

Para el análisis de estos datos se consideraron cuatro poblaciones. Primero se dividieron los estados heterocigóticos de las mujeres para consolidar una población de alelos a los que se le añadieron los alelos de los hombres en quienes se realizó un análisis descriptivo. Más tarde se analizó la población de

Diagnóstico	CINDES ¹		INPE ²		IQEE ³		Total	%	Casos con Historia Familiar ⁴
	H	M	H	M	H	M			
Retardo mental severo	8	2	4	2	6	8	30	14,85%	5
Retardo mental moderado	15	6	15	11	19	4	70	34,65%	7
Retardo mental leve	9	4	6	2	9	4	34	16,83%	3
Autismo	5	3	2	1	0	2	13	6,44%	0
Conductas autistas	2	2	0	2	2	0	8	3,96%	0
Dificultad en el aprendizaje	7	6	7	5	3	3	31	15,35%	8
Hiperactividad déficit de atención	1	4	2	6	1	2	16	7,92%	3
Subtotal	47	27	36	29	40	23			26
TOTAL		74		38		42	202		

Tabla 1. Distribución de pacientes estudiados para las mutaciones FRAXA y FRAXE según manifestaciones clínicas, género e historia familiar (Pereira-Armenia 1998)

H: Hombres **M:** Mujeres, **CINDES:** Centro integral de educación especial. **INPE:** Instituto pedagógico de educación especial. **IQEE:** Instituto Quindiano de educación especial.

alelos de los hombres y finalmente se estudió la de las mujeres de dos maneras: primero se consideraron alelos en estados homocigóticos y heterocigóticos, y luego se analizó la población de mujeres.

Para obtener los resultados estadísticos se realizó una prueba de igualdad de varianzas, seguida de una prueba de hipótesis de comparación de medias, con un nivel de error de 5% y una confiabilidad del 95%. Finalmente, se hizo una comparación de las proporciones de población en los estados normal, intermedio y premutado.

Resultados

Para la población normal se consideraron 1171 alelos, correspondientes a 364 mujeres (dos por cada

una) y 443 hombres. Los individuos provinieron de once municipios del departamento de Risaralda. Para la población con alteraciones cognitivas, se tomaron 281 alelos correspondientes a 80 mujeres (dos por cada una) y 124 hombres. Las distribuciones de los alelos se describen en la tabla 2.

El dato más frecuente en ambas poblaciones fue el de 30 repeticiones que se presentó en el 77.49% de los casos entre los sujetos normales y en el 72.95% de los casos entre los sujetos con alteraciones cognitivas. Usando estos valores, se realizó una prueba de igualdad de varianzas y se obtuvo que su diferencia era estadísticamente significativa. Debido a este hallazgo, se realizó una comparación de medias y se encontró que estas eran iguales; por lo tanto se concluyó que no hay diferencias significativas entre las medias de las dos poblaciones.

Población con desórdenes cognitivos y del comportamiento			Población normal		
Repeticiones	Frecuencia	Porcentaje	Repeticiones	Frecuencia	Porcentaje
18	1	0,36%	10	3	0,30%
20	4	1,42%	15	3	0,30%
22	2	0,71%	18	12	1,18%
25	9	3,20%	20	54	5,31%
26	6	2,14%	22	1	0,10%
28	20	7,12%	23	6	0,59%
29	4	1,42%	25	34	3,35%
30	205	72,95%	27	1	0,10%
31	2	0,71%	28	39	3,84%
32	14	4,98%	30	942	77,49%
33	1	0,36%	32	15	1,48%
34	1	0,36%	33	8	0,79%
35	1	0,36%	34	2	0,20%
37	2	0,71%	37	14	1,38%
38	1	0,36%	38	4	0,39%
39	2	0,71%	39	9	0,89%
40	1	0,36%	43	9	0,89%
43	2	0,71%	45	4	0,39%
52	2	0,71%	47	4	0,39%
82	1	0,36%	49	1	0,10%
			59	1	0,10%
			60	1	0,10%
			70	1	0,10%
			72	1	0,10%
			114	1	0,10%
			155	1	0,10%

Tabla 2. Distribución de los alelos FMR1 en una población con desórdenes cognitivos y del comportamiento y en una población normal del Departamento de Risaralda

Finalmente se compararon las proporciones de población normal, intermedia y premutada, y se obtuvo que las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Discusión y conclusiones.

La presente investigación permitió concluir que la única diferencia que fue significativa es la varianzas entre las dos poblaciones. En particular, no hubo diferencias significativas entre las distribuciones de alelos en poblaciones normales y en poblaciones con alteraciones cognitivas. Esto parece contradecir la creencia de que el síndrome X frágil no es tan importante en la proporción de alteraciones de la conducta. Sin embargo, la estimación determinó que en la población con alteraciones, la prevalencia fue de $4/204=1/51$ en lugar de $2/1011=1/506$ en la población normal; de modo que entre los individuos con alteraciones cognitivas, la prevalencia es diez veces más que entre los individuos normales. Estos datos indican que el

síndrome, que es de difícil detección en una población normal por su poca ocurrencia, se concentra en la población con alteraciones cognitivas aunque sigue siendo responsable solo de un porcentaje menor al 2% de los casos.

Vale la pena mencionar que dos de los cuatro alelos mutados corresponden a mujeres. Esta mutación se detectó con la técnica de Southern Blot. La razón por la cual es importante determinar la proporción de casos premutados es que los varones con premutación se consideran transmisores, tienen inteligencia normal y transmiten la premutación a sus hijas. Entre ellas la probabilidad de que aparezcan síntomas del síndrome es del 50% y estos son menores y se les considera portadores, ya que los hijos de estas portadoras pueden adquirir la mutación completa con una probabilidad del 80%, así que es importante como indicador de salud pública determinar la proporción de premutados y medir la posible incidencia del síndrome en futuras generaciones.

Referencias Bibliográficas.

-
1. Weisman-Shomer P, Cohen E, Fry M. Interruption of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)n by interspersed d(AGG) trinucleotides diminishes the formation and stability of d(CGG)n tetrahelical structures. *Nucleic Acid Res* 2000; 28 (7): 1535-1541.
 2. GenV B, Müller-Hartmann H, Zeschngk M, Deissler H, Schmitz B, Majewski F, et al. Methylation mosaicism of 5'-(CGG)n-3' repeats in fragile X, premutation and normal individuals. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(10): 2141-2152.
 3. Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL. Inheritance of fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant to full mutation. *J Med Genet* 1992; 29:794-801.
 4. Verkerk AH, Pleretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, et al. Identification of the gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a break point cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65:905-914.
 5. Hinds DL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence of a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet* 1993; 3: 36-46.
 6. Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome (Review). *Hum Mol Genet* 2000; 9: 901-908.
 7. Eichler EE, Holden JJA, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 1994; 8:88-94.
 8. Laxova R. Fragile X syndrome. *Adv Pediatr* 1994; 41:305-421.
 9. Kerby DS, Daws BL. Autistic features, personality and adaptive behavior in males with fragile X syndrome and no autism. *Am J Ment Retard* 1994; 98(4): 455-62.
 10. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550 base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252:1097-1102.
 11. Oudet C, Monet E, Serre JL, Thomas F, Lentès-Zengerling S, Kretz C, et al. Linkage CA repeats suggests that X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 297-304.
 12. Dorn M.B, Mazzocco M.M, Hagerman R.J. Behavioral and psychiatric disorders in adult male carriers of fragile X. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1993; 33: 256-264.
 13. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Eng J Med* 1991; 325(24).
 14. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 71:184-86.
 15. Andrew S. Expanding beyond trinucleotides: expansion of 12- and 42-base pair repeats. *Clin Genet* 1998; 54:459- 463.
 16. Murray A, Weeb J, MacSwiney F, Shipley EL, Morton NE, Conway GS. Serum concentrations of follicle stimulating hormone may predict premature ovarian failure in FRAXA premutation women. *Hum Reprod* 1999; 14(5):1217-1218.
 17. Uzielli M.L, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G, et al. Premature ovarian failure (POF) and fragile X premutation females: from POF to fragile X carrier identification, from fragile X carrier diagnosis to POF

- association data. *Am J Med Genet* 1999; 84: 300-303.
18. Murray A, Youings S, MacPherson J.N, Pound M.C, Sharrochk A, Youings S.A, et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum Mol Genet* 1997; 6(2): 173-184.
 19. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, MacPherson J, Malgren H, Dahl N, et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. *Am J Hum Genet* 1994; 55(2): 225-37.
 20. Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Of the CGG repeat at the fragile X site results in genetics instability: resolution of the Sherman Paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-1058.
 21. Reiss AL, Chazzan HH, Krebs CM, Mangham A, Boehm CD, Abrams MT, Nelson D. Frequency and stability of the fragile X premutation. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 393-398.
 22. Rousseau F, Morgan K, Rouillard P, Khandjian EW. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; 57:1006-1018.
 23. Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 1994; 77:853-861.
 24. Zhong N, Ye L, Ju W, Nolin S, Brown WT. Molecular analysis of interruptions within FMR1 CGG repeats in females may predict genetic risks. *Memorias 9th. International Workshop on Fragile X Syndrome and X Linked Mental Retardation.* August, 1999.
 25. Tarleton JC, Saul RA. Molecular genetic advances in fragile X Syndrome. *J Ped* 1993; 122:161-184.
 26. Rousseau F, Levesque S, Dombrowski C, Morel M. Transmission of normal, gray zone and premutation-size FMR1 alleles in the general population: Effects of size, array structure and sex of offspring. *Annals 9th International Workshop on Fragile X Syndrome and X Linked Mental Retardation.* August, 1999.
 27. Nolin S, Lewis SA, Ye LL, Houck GE, Glicksman AE, Pornprot L, et al. Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1252-1261.
 28. Crawford D.D.C, Zhang F, Wilson B, Sarren S.T, Sherman S.L. Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeats instability. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1759-1769.
 29. Brown WT, Houck, GE Jr., Jeziorowska, A, Levinson FN, Xiaohau D, Dobkin C, et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a non radioactive PCR Test. *JAMA* 1993; 270 (13): 1569-1575.

