

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TAMIZAJE DEL SÍNDROME DEL CROMOSOMA X  
FRÁGIL EN POBLACIONES SELECCIONADAS**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar por el grado de *Magister Scientiae* en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

Rebeca Vindas Smith

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2008

**Descriptores:** retardo mental hereditario, síndrome del cromosoma X frágil, *FMRI*, *FMRP*, tamizaje, Costa Rica.

## **Estado actual del conocimiento**

### **1. Antecedentes del síndrome del cromosoma X frágil**

El síndrome del cromosoma X frágil (SXF) o FRAXA constituye la causa más común de retardo mental hereditario y la segunda causa genética después del síndrome de Down (Turner *et al.* 1996). La prevalencia de la enfermedad se estima en 1/ 4000 varones y 1/ 6000- 8000 mujeres. La frecuencia de los individuos portadores es de 1/ 259 mujeres y 1/ 813 varones; sin embargo, puede variar entre las poblaciones (Turner *et al.* 1996; Crawford *et al.* 2001).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1943 por Martin y Bell, quienes analizaron la genealogía de una familia donde predominaban los varones afectados. De ahí que la enfermedad también se conozca con el nombre del síndrome de Martin- Bell (OMIM: 309550).

En 1969, Lubs observó un marcador en el cromosoma X de individuos con retardo mental pertenecientes a una misma familia. Este marcador consiste en una laguna localizada en el extremo distal del brazo largo del cromosoma X (Lubs 1969). Sin embargo, las observaciones de Lubs no fueron reproducibles por otros investigadores, hasta que Sutherland (1977) especificó la necesidad de un medio deficiente en folatos para expresar el sitio frágil. Este hallazgo permitió el diagnóstico citogenético de la enfermedad, y la aparición de un gran número de investigaciones en las familias con individuos afectados por el retardo mental.

En 1985, Sherman y sus colaboradores realizaron un análisis de segregación en las familias afectadas y observaron algunas características que no se ajustaban a las

alteraciones ligadas al X. Estas observaciones se conocieron como la paradoja de Sherman, y se referían principalmente a que los casos esporádicos eran prácticamente nulos; los descendientes afectados recibían la mutación de su madre, y los varones transmisores normales tenían una mayor posibilidad de tener nietos afectados, que hermanos con la enfermedad (Sherman *et al.* 1985). La paradoja de Sherman logró explicarse hasta la década de los 90, cuando se identificó al gen *FMRI* (Fragile X Mental Retardation 1) como el único responsable de la enfermedad, en el locus Xq27.3. La identificación del gen permitió dos avances importantes: el primero tiene que ver con el desarrollo de métodos de diagnóstico más precisos, gracias a la contribución de la tecnología del ADN y el segundo se refiere al descubrimiento de un nuevo tipo de mutación basado en la expansión inestable de nucleótidos repetidos (Fu *et al.* 1991; Imbert *et al.* 1998; Richards 2001).

## **2. Patrón de Herencia**

El SXF se describía anteriormente como dominante ligado al X; sin embargo, las familias no encajaban en el patrón de herencia mendeliano. La enfermedad presenta penetrancia incompleta y expresión variable. El 80% de los varones y el 35- 50% de las mujeres con la mutación manifiestan el retardo mental. Las diferencias en la penetrancia se deben, en el caso de las mujeres, al mecanismo de inactivación del cromosoma X; y en el caso de los varones al mosaicismo de las repeticiones y la metilación (Crawford *et al.* 2001; Oostra & Chiurazzi 2001; Castro & Cuenca 2005).

La enfermedad se caracteriza por el fenómeno de anticipación genética, lo cual explica la paradoja de Sherman. La penetrancia es creciente, es decir, que conforme segrega la mutación a través de las generaciones, el número de descendientes afectados aumenta. Por otra parte, el riesgo de tener descendencia afectada aumenta cuando la madre

es portadora de la mutación. De este modo, la mutación debe pasar por una meiosis femenina para producir la enfermedad. Los varones se consideran transmisores normales de la enfermedad y su descendencia directa suele no estar afectada; sin embargo, todas sus hijas serán portadoras con el subsecuente riesgo asociado a esta condición (O' Donnell & Warren 2002).

### **3. Fenotipo característico del SXF**

En los primeros años de vida, los rasgos físicos característicos son poco notorios pero conforme transcurren los años se hacen más evidentes.

La característica más significativa es el retardo mental que puede ser moderado en niños y moderado o profundo en los varones adultos. El coeficiente intelectual (CI) puede variar de 20 a 70 (Penagarikano *et al.* 2007). El CI promedio en varones adultos con la mutación completa es aproximadamente de 40 (Garber *et al.* 2008). El coeficiente intelectual en las mujeres varía de normal a retardo leve o severo. A edades tempranas es notorio el retardo en el desarrollo cognitivo que se manifiesta con trastornos en la aparición del lenguaje y déficit atencional. El déficit atencional está muy relacionado con su hiperactividad; debido a que además son muy impulsivos, tienen problemas para desarrollar tareas que siguen una secuencia, o para cambiar de actividad. Los problemas de lenguaje se caracterizan por una dificultad para expresarse y una alta tendencia de repetir constantemente una misma palabra. (Hagerman 1996).

Los varones adultos presentan cara alargada, mentón prominente, orejas grandes y salientes (generalmente son suaves y flexibles). Estas características son menos evidentes en los niños, pero también se han informado en algunos de ellos. El macroorquidismo (agrandamiento de los testículos) ocurre en el 80- 95% de los adolescentes o adultos y es

notorio en el 10- 20% de los niños. Los testículos pueden aumentar de 2- 3 veces con respecto al tamaño normal y posiblemente se debe a una disfunción hipotalámica que aumenta la producción de gonadotrofinas (Hagerman 1996).

La mayoría de los pacientes desarrollan otras anomalías del tejido conectivo, como el tono muscular disminuido con articulaciones hiperextensibles. Los pies pueden ser planos, la piel es fina, suave, con textura aterciopelada y con arrugas en la palma de las manos. Los problemas cardíacos, como el prolapso de la válvula mitral, es un rasgo común que hace necesaria la evaluación mediante un electrocardiograma (Hagerman 1998; Garber *et al.* 2008).

En la niñez es frecuente la otitis recurrente (infección de los oídos) asociada a la pérdida auditiva, con la subsecuente deficiencia en el lenguaje y la inapropiada articulación. Además, manifiestan problemas oftalmológicos que incluyen estrabismo, caída de los párpados y miopía, entre otros (Hagerman 1996). También muestran disfunción de la integración sensorial, pues se les hace difícil tolerar sonidos fuertes, luces brillantes, los olores y sabores los perciben exageradamente, creándoles cierta incomodidad. El 20% de los pacientes tienen convulsiones y se ha demostrado que tienen dilatación de los ventrículos cerebrales o una disminución del tamaño del vérmix del cerebelo (Hagerman 1996; 1998).

Las personas afectadas con el SXF muestran problemas conductuales. Algunos desarrollan un comportamiento similar al autista, caracterizado por un contacto ocular escaso, defensa táctil, aleteo o mordedura de las manos (Hagerman 1996; 2001). Sin embargo, a diferencia de los autistas, estos niños tienen interés por interactuar con otros individuos. Los niños son tímidos, especialmente con las personas fuera de su entorno familiar; presentan ansiedad, cambios de humor y baja tolerancia a la frustración

(Hagerman 1996; Kau *et al.* 2002). El fenotipo relacionado con la enfermedad es más leve en las mujeres que en los varones y la aparición de los signos es variable entre los individuos (Ferrando- Lucas *et al.* 2004).

El tratamiento de la enfermedad es sintomático debido a que no existe cura hasta el momento. Algunos medicamentos utilizados son la carbamacepina o el valproato sódico para controlar las convulsiones, el metilfenidato para la hiperactividad y el déficit atencional, y la risperidona que ayuda a tratar el comportamiento psicótico y agresivo (Ramos & González 1999). El abordaje multidisciplinario de la enfermedad es el más adecuado e incluye a pediatras, neurólogos, terapeutas del lenguaje, psicólogos y la participación del asesor genético.

#### **4. El gen *FMRI* y la causa molecular del SXF**

El mapeo del gen en 1991 permitió descifrar el origen molecular de la enfermedad. El SXF es causado por una expansión anormal de la tripleta repetida CGG (citosina, guanina, guanina), en la región 5'- UTR del exón 1 del gen *FMRI* y que incluye un sitio de regulación de la expresión génica conocido como isla CpG. El gen *FMRI* codifica para la proteína FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) de aproximadamente 69kDa y responsable del fenotipo. La mayoría de los casos del SXF (>99%) se deben a la expansión de la tripleta. No obstante, también se han descrito otras alteraciones relacionadas con el locus *FMRI*, como las deleciones y las mutaciones puntuales no sinónimas con un fenotipo más severo. Lo anterior sugiere que la enfermedad es causada principalmente por la pérdida de actividad del producto génico (Imbert *et al.* 1998; O' & Warren 2002).

El gen *FMRI* contiene 17 exones, tiene un tamaño de 38Kb y codifica para un transcrito de 4.4Kb aproximadamente. El ARNm que codifica el gen incluye las

repeticiones y puede sufrir corte y empalme alternativo, del que se pueden obtener cuatro isoformas funcionales de FMRP de 69-80KDa. *FMRI* se transcribe ubicuamente durante la embriogénesis del ratón y los humanos con niveles altos de expresión en las neuronas diferenciadas del hipocampo y en los ganglios basales. Esto demuestra su importancia durante el desarrollo. En la edad adulta *FMRI* se expresa principalmente en las neuronas del hipocampo y el cerebelo, y en las espermatogonias. También se expresa en el pulmón, corazón, riñón, amniocitos, vellosidades coriónicas y linfocitos. El hecho de que se exprese en estos tres últimos tejidos hace posible el uso de técnicas diagnósticas en los individuos. En la edad adulta su expresión es alta en las neuronas y en las espermatogonias (Bardoni *et al.* 2000).

*FMRI* cuenta con dos genes parálogos autosómicos *FXR1* y *FXR2* (Fragile X Related 1 y 2) localizados en 3q28 y 17p13.1, respectivamente. Juntos conforman una familia de genes que se expresan en distintos organismos y que poseen dominios funcionales similares (O'Donnell & Warren 2002; Oostra 2002; Todd & Malter 2002). La secuencia codificante del gen es altamente conservada y presenta homología con una variedad de organismos como el ratón, *Xenopus* y *Drosophila* (Wan *et al.* 2000). La identidad nucleotídica entre el humano y el ratón es del 95% y la identidad en la secuencia de aminoácidos es del 97%. Además, cuenta con otros genes ortólogos en el pollo, en *Xenopus* y en *Drosophila*, en este último solo se ha identificado un gen homólogo denominado *dFMRI* o *dFXR* de manera que se cree que en la mosca de la fruta un único gen realiza las funciones vinculadas con esta familia de genes (Eichler *et al.* 1995). La repetición localizada en el 5'-UTR del gen se halla también conservada entre las especies de vertebrados, aunque la longitud de la repetición CGG es más pequeña comparada con la repetición en los humanos. Se cree que la homología observada entre las especies en los

extremos 5'-UTR y 3'-UTR podrían indicar la presencia de funciones regulatorias (Kumari & Usdin 2001).

El tamaño de la repetición CGG es polimórfico en la población general. En los individuos no afectados, la repetición varía de 5-54 repeticiones con una moda de 29 ó 30 repeticiones. Generalmente, en estos alelos la región CGG se encuentra interrumpida por una tripleta AGG (adenina, guanina, guanina) cada 9 ó 10 trinucleótidos repetidos de CGG que le confieren estabilidad a esta región (Mazzocco 2000; Penagarikano 2007).

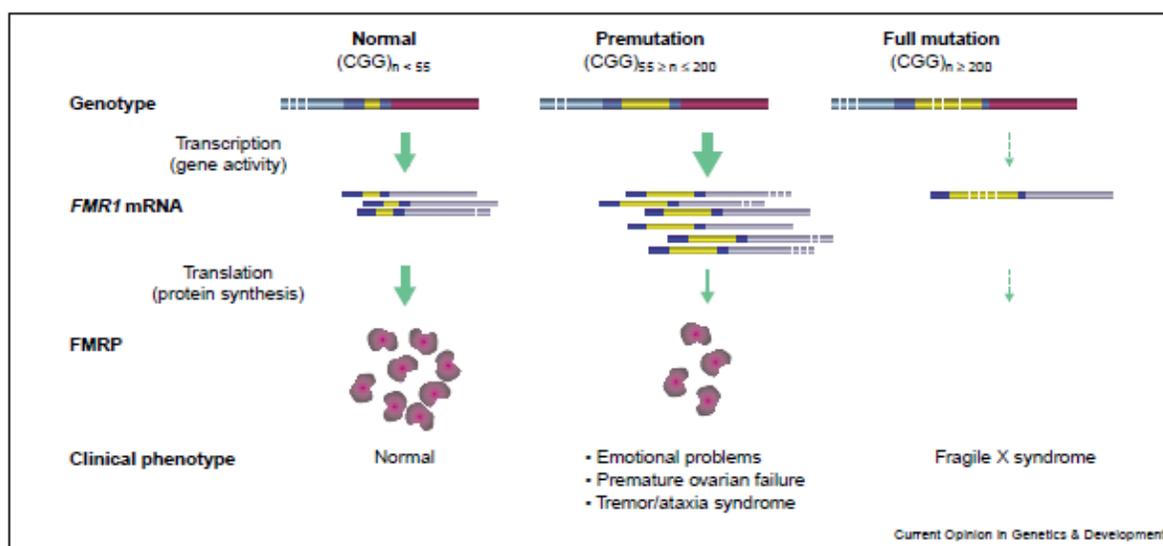
En las familias donde segrega la enfermedad, se observan dos categorías relacionadas con el tamaño de la repetición. Los individuos con la premutación presentan de 55 a 200 tripletas y los que portan la mutación completa poseen 201 o más, incluso pueden alcanzar más de 1000 repeticiones. Los alelos con la premutación son inestables y tienen una o ninguna AGG. En el caso de la mutación completa se da inestabilidad somática y germinal, además de que las AGG se han perdido. También, se ha descrito una “zona gris” que incluye alelos intermedios de 41-60 repeticiones, que traslapa con los alelos normales y premutados. Se pueden transmitir de forma estable a la siguiente generación pero también se han observado expansiones a premutaciones pequeñas. Esta categoría genera alelos de riesgo en una determinada población. (Fu *et al.* 1991; Nolin *et al.* 2003).

### Problemas para el asesoramiento genético

Los portadores de la premutación no presentan manifestación clínica aparente de la enfermedad, pero se han descrito individuos con déficit cognitivo leve, trastornos emocionales, ansiedad y algunos de los rasgos físicos clásicos (Hagerman & Hagerman 2001). Además, presentan un fenotipo único que no se da en personas con la mutación completa, por ejemplo, el 20- 30% de los varones desarrollan el síndrome de temblor y ataxia asociado a frágil X (STAFX) y alrededor del 20% de las mujeres manifiestan fallo

ovárico prematuro antes de los 40 años. El STAFX se da a en individuos mayores de 50 años y es caracterizado por temblores, ataxia y otros signos degenerativos (Hagerman & Hagerman 2002; McConkie-Rosell *et al.* 2007).

Los individuos con la premutación producen un exceso de ARNm del gen *FMRI* en comparación con los individuos no afectados pero sus niveles de proteína son normales o más bajos, lo que indica deficiencias en el proceso de traducción de los ARNm. Esto podría estar influyendo en la aparición de este fenotipo (Figura 1) (Tassone *et al.* 2000). Por lo tanto, la reducción de la proteína FMRP se debe a alteraciones en la traducción de los ARNm con la premutación.



**Figura 1. Patrón de expresión del gen *FMRI* en individuos no afectados, con la premutación y con la mutación completa.** (Tomado de Hagerman & Hagerman 2002)

En el caso de los varones con el STAFX se han observado inclusiones intranucleares en las neuronas. Se ha propuesto un modelo de ganancia de función del ARN para esta patología, el cual supone que los transcritos de *FMRI* con repeticiones CGG expandidas adquieren estructuras secundarias estables que impiden el ensamblaje apropiado con la subunidad ribosomal 40S, afectando la traducción. La transcripción del gen se

incrementa debido a los niveles deficientes de la proteína, lo que conduce a un aumento en la cantidad de ARNm. Estos transcritos podrían secuestrar proteínas de unión a CGG retroalimentando la intensidad en la actividad transcripcional. Las células nerviosas utilizarían las chaperonas moleculares y componentes del proteosoma para eliminar el exceso de ARNm. El secuestro de las chaperonas por parte de los ARNm con repeticiones expandidas, aumentaría el inadecuado plegamiento de proteínas importantes formándose inclusiones que estimulan la activación de vías neurotóxicas (Oostra & Willemsen 2003; Hagerman 2006; Van 2006)

El riesgo de que la premutación se expanda a mutación completa ocurre cuando es transmitida por vía materna. Este riesgo depende del tamaño de la repetición en la madre, si éste es de 100 repeticiones el riesgo es de 95- 100%. El tamaño de las premutaciones se incrementa a través de las generaciones. Esto aumenta la posibilidad de expansión a una mutación completa y por ende, a la manifestación de la enfermedad. La transmisión paterna no implica un riesgo de expansión, aún más, se han observado contracciones del alelo premutado o con la mutación completa. Esto se explica por la acción de un mecanismo desconocido que tiende a seleccionar negativamente los espermatozoides que portan alelos con repeticiones de gran tamaño, lo cual no ocurre en las mujeres (Ashley-Koch *et al.* 1998).

La mutación completa coincide con la hipermetilación y deacetilación de las histonas que llevan a la condensación de la cromatina. La hipermetilación se extiende desde la zona de la repetición hasta la región corriente arriba del gen *FMRI*. La metilación del promotor bloquea la transcripción del gen, lo que resulta en la ausencia de la FMRP, causante del fenotipo del SXF (Figura 1). Se cree que esta hipermetilación es un mecanismo protector que evita el progreso de la expansión, pero en realidad aún falta

mucho por investigar en esta área. Las mujeres se ven clínicamente menos afectadas que los varones, según sea el patrón de inactivación del cromosoma X en las células donde se expresa la proteína. La expresión de FMRP puede llegar hasta un 80%, manifestándose en un fenotipo normal o casi normal si se inactiva preferentemente el X con la mutación (Bardoni *et al.* 2000).

Debido a la inestabilidad somática y germinal que caracteriza este tipo de alelos, la mayoría de los afectados son mosaicos. El mosaicismo puede darse dentro o entre los tejidos. Las células o los tejidos que presenten la premutación podrán sintetizar la proteína. Se han reportado varones con la mutación completa que son mosaicos para la metilación y que manifiestan un fenotipo menos severo. También se ha observado la ausencia de metilación en un varón portador de la mutación completa y con coeficiente intelectual normal (Imbert *et al.* 1998; Bardoni *et al.* 2000). Estos hallazgos confirmaron la importancia de la proteína en la manifestación clínica de la enfermedad.

## **5. Mecanismo de expansión y metilación del gen *FMRI***

Se desconoce el mecanismo exacto que lleva a la expansión del gen *FMRI* y al silenciamiento del gen por remodelación de la cromatina mediante metilación. Sin embargo, se han propuesto algunas ideas sobre las posibles causas en la expansión de nucleótidos repetidos.

La presencia de interrupciones crípticas AGG dentro de la repetición CGG le confieren estabilidad a la misma, de manera que la pérdida de estas tripletas por conversión génica pueden desencadenar el proceso de inestabilidad (O'Donnell & Warren 2002). La pérdida de AGGs ocurre en el extremo 3' del tracto repetido. El tracto puro más largo encontrado dentro de una premutación o mutación completa se localiza siempre en el

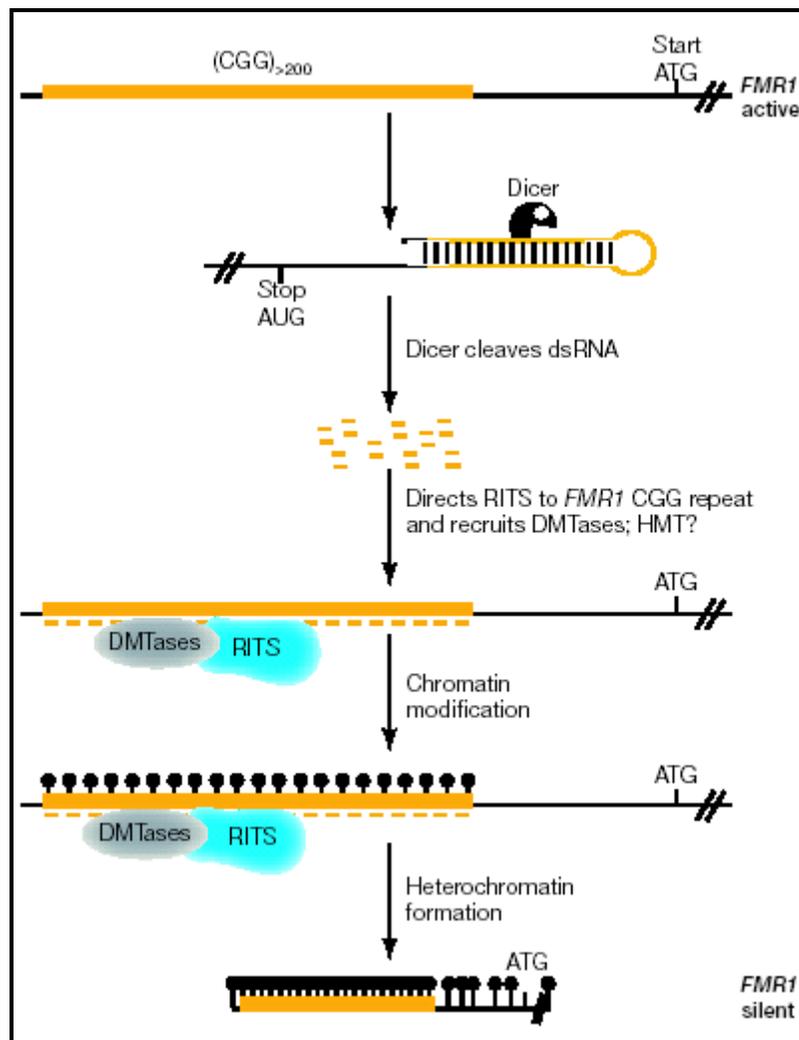
extremo 3', se cree que un tracto puro de 38 repeticiones en 3' es suficiente para causar la inestabilidad (Eichler *et al.* 1994).

Otros determinantes en el inicio de la inestabilidad del gen son la dirección de la replicación, el bagaje genético (sistemas de reparación) y las condiciones de crecimiento. Se cree que las repeticiones CGG pueden formar estructuras secundarias en el ADN como horquillas y tetrahélices. Durante el proceso de replicación el deslizamiento y pausa de la ADN polimerasa en las repeticiones CGG puede formar estas estructuras (Oostra & Willemsen 2002). Si estas horquillas se forman en los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada, la reunión puede darse en una posición distinta dentro de la repetición. Esto deja un hueco (gap) que debe ser reparado dando lugar a un incremento en la longitud de la repetición. Por el contrario, si la horquilla ocurre en la hebra líder y se elimina por reparación ocurre una contracción de la repetición (Pearson *et al.* 1998). Elementos en *trans* como los mecanismos de reparación también ha sido estudiados, en particular la remoción del primer de ARN por la endonucleasa FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1) y el sistema de reparación por apareamiento erróneo. Si el fragmento de Okazaki inicia en la repetición la formación de una horquilla reduce la eficiencia de FEN1 para actuar sobre la estructura secundaria. En mutantes de RAD27 (la proteína homóloga de FEN1 en levaduras) se han observado incrementos significativos en la expansión de la repetición (White *et al.* 1999; Penagarikano 2007). En mutantes del sistema de reparación por apareamiento erróneo no se han detectado incrementos significativos en la inestabilidad, más bien se sugiere que estas enzimas se unen a las horquillas pero son incapaces de repararlas llevando a la estabilidad de las mismas (Mirkin 2007). El mecanismo de expansión más aceptado para el SXF es la pausa y el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación, y la pérdida de las tripletas crípticas AGG.

La presencia de la mutación completa en sujetos con el SXF usualmente correlaciona con la metilación de las CGGs y de la región del promotor de *FMRI*. La metilación del promotor correlaciona con la expresión de la proteína, estando FMRP ausente en aquellas células en que ocurre la metilación por silenciamiento de la transcripción. El efecto directo de la metilación consiste en evitar la unión de los factores de transcripción. Se sospecha que las estructuras anormales formadas por la mutación completa o algunas proteínas de unión a trinucleótidos repetidos podrían atraer a las metiltransferasas, las cuales metilarían la isla CpG como un mecanismo para detener la expansión del gen (Oostra & Willemsen 2002; Mirkin 2007). Jin *et al.* 2004, especularon que la metilación del gen se desencadenaba a raíz de un proceso en el que interviene la vía de ARN de interferencia (ARNi), recientemente Lin *et al.* 2006 encontraron evidencia *in vivo* para la hipótesis propuesta, en el organismo modelo *Danio rerio*.

La participación del ARNi en este proceso es apoyado por los hallazgos de que pequeños ARNs, que corresponden a elementos repetidos y transposones, están asociados con regiones heterocromáticas, y que estos ARNs pueden derivarse de ARNs de doble banda más largos generados por transcripción bidireccional de las secuencias repetidas de promotores adyacentes. Esto llevó a la hipótesis de que un complejo denominado RITS (del inglés RNA- induced initiator of transcriptional gene silencing) junto con la proteína AGO (Argonaute) se une a los ARNs pequeños de interferencia (ARNsi) y promueve su apareamiento con las secuencias homólogas en las repeticiones CGG (Jin *et al.* 2004). Handa *et al.* 2003, observaron la formación de horquillas en el extremo 3' de un tracto largo de repeticiones pura de una premutación. Estas repeticiones CGGr pueden ser cortadas por la endonucleasa Dicer para producir ARNsi. De acuerdo a esto nace la hipótesis de Jin *et al.* 2004. En el desarrollo temprano, los alelos con la mutación completa

no han sufrido metilación y pueden ser transcritos para producir ARNsm con las repeticiones CGG. Los CGGr expandidos forman estructuras en horquilla que son cortados por Dicer para formar ARNs pequeños, estos ARNs similares a los ARNsi se unen al complejo RITS y lo guían hacia las secuencias homólogas en un proceso que involucra el apareamiento de los ARNsi a los transcritos recién producidos o al ADN directamente. RITS media el reclutamiento de las metiltransferasas y de las deacetilasas de histonas, lo que desencadena la metilación del promotor y la represión de la transcripción en el locus *FMR1* (Figura 2).

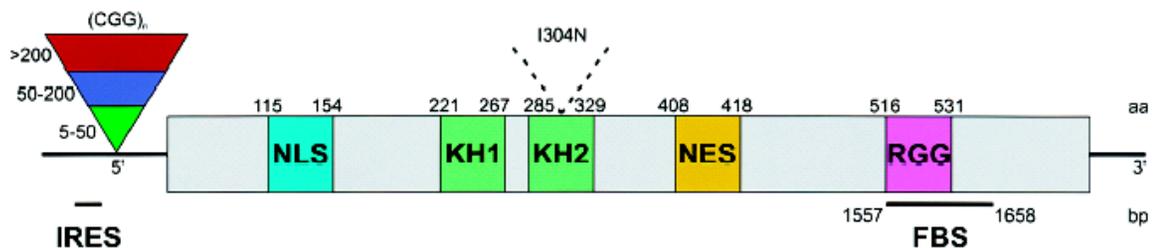


**Figura 2. Modelo de metilación de las repeticiones CGG mediada por ARNi en individuos con SFX.** (Tomado de Jin *et al.* 2004)

Debido a que el SFX es provocado por la pérdida de una única proteína que lleva a la manifestación de una variedad de signos y síntomas, la determinación de la función de FMRP en las células normales es trascendental para entender la patogénesis de la enfermedad.

## 6. FMRP: características y funciones

La proteína FMRP pertenece a la superfamilia de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) involucradas en el metabolismo de los ARNsm. Se localiza principalmente en el citoplasma de las células pero alrededor de un 5% del total de la proteína se halla en el núcleo. Debido a que existe suficiente evidencia de que FMRP está presente en el citoplasma y que se asocia a ARNsm como parte de un complejo ribonucleoproteico (mRNP) junto con los polirribosomas se le involucra en el control postranscripcional de la expresión génica (Schaeffer *et al.* 2003). Por tanto, FMRP podría controlar la localización y/o la traducción de ARNs específicos en las neuronas. FMRP realiza su función a través de la unión a ARNs por lo que es importante determinar sus dominios funcionales y sus ARNs blanco. Además, la caracterización de los complejos mRNP que incluyen a FMRP y otras proteínas es de gran relevancia para entender su función. En la siguiente figura se pueden observar los dominios de la proteína especificados en la secuencia del gen.



**Figura 3. Representación esquemática del gen *FMRI* en el que se muestran algunos de los dominios hasta ahora descritos.** (Tomado de Oostra & Chiurazzi 2001)

### **Dominios de FMRP**

**a. IRES:** Se ha descrito un sitio de entrada para el ribosoma corriente arriba de la repetición CGG. Los elementos IRES han sido identificados en las regiones 5'-UTR de algunas proteínas regulatorias y se cree que este elemento contribuye a promover la traducción en las dendritas. También se ha observado que FMRP interactúa con la subunidad ribosomal 60S mediante el motivo "coiled-coil" localizado en su exón 7. Se desconoce exactamente el mecanismo de interacción de FMRP con los polirribosomas (Oostra & Chiurazzi 2001).

**b. NLS y NES:** Al tener una señal de localización nuclear y una señal de exportación nuclear se sugiere que FMRP transita entre estos dos compartimentos. Se desconoce el mecanismo para la entrada al núcleo pero la exportina I está relacionada con su salida al citoplasma. De manera que podría estar participando en el transporte y localización de mensajes celulares del núcleo al citoplasma dentro de los complejos RNPs (Kooy *et al.* 2000; Oostra & Willemsen 2003).

**c. Caja RGG:** Esta caja es la responsable de la unión de FMRP a la mayoría de los ARNs que interactúan con la proteína. Es una región rica en arginina- glicina- glicina y reconoce una estructura en cuarteto G presente en el 70% de los ARNs que co- inmunoprecipitan con FMRP (Gantois & Kooy 2002)

**d. KH1 y KH2 :** La idea de que FMRP puede unirse a los ARNm nace de la descripción de estos dominios que muestran homología con los descritos en la proteína K hnRNP. Sin embargo, en el caso de FMRP parece que estos dominios no participan en la unión de los ARNs que se asocian con ella. La mutación puntual I304N en el dominio KH2

que causa un fenotipo severo de la enfermedad, no impide la unión a los ARNs pero la proteína no puede asociarse con los ribosomas de modo que también se observa una desregulación en la traducción de mensajes celulares. FMRP actúa en las células como un homodímero y la mutación I304N disminuye su capacidad de oligomerización consigo misma, con otras proteínas y con los polirribosomas (Pozdnyakova & Regan 2005). Darnell *et al.* 2005 describieron un motivo de ARN conocido como complejo “Kissing” que es reconocido por KH2. Este motivo podría estar presente en los ARNsm que se han visto asociados con FMRP pero que no tiene una estructura de cuarteto G, como algunos ARNs no codificantes que podrían ser parte de la vía de ARNi.

e. **FBS:** El sitio de unión a FMRP abarca una parte de la región que codifica para la caja RGG. Este sitio determina la formación de la estructura cuarteto G que es reconocida por RGG. Por tanto, FMRP tiene la capacidad para interactuar y regular su propio ARNm. Las estructuras cuarteto G están formadas por arreglos planares de residuos de guanina, enlazadas por puentes de hidrógeno y estabilizadas por iones  $K^+$  (Darnell *et al.* 2004).

### **ARNms y proteínas asociados a FMRP**

La identificación de los ARNms que se asocian a FMRP es importante para entender su función y las consecuencias clínicas de su ausencia, el hecho de que FMRP se asocia con al menos el 4% de los ARNms del cerebro explica la diversidad de las características clínicas. Brown *et al.* 2001 utilizó microarreglos para identificar los blancos *in vivo* de FMRP, algunos de los mensajes celulares identificados están involucrados en funciones sinápticas como MAP1B (proteína asociada a los microtúbulos), NAP22 (proteína neuronal axonal), el canal de potasio y su propio ARNm. FMRP se une a estos ARNs mediante el reconocimiento de una estructura (cuarteto G) más que a una secuencia.

Sin embargo, en esta unión podrían estar interviniendo sus dominios KH y otros sitios de unión no específicos en los ARNsm como regiones ricas en uracilo (poly-U).

Jin & Warren 2003 y muchos otros estudios, han demostrado que en la ausencia de la proteína los ARNms identificados muestran un perfil polirribosómico anormal pero su abundancia citoplasmática no está alterada. En los individuos con el SXF muchos de estos ARNsm están sobreexpresados, en *Drosophila* la ausencia de *dFXR* está relacionada con una sobreexpresión de *fustch* (homólogo de MAP1B) . Lo anterior, indica que FMRP juega un papel importante en la regulación de la traducción como represor de una gran variedad de mensajes celulares. Los efectos causados son visibles principalmente, en las dendritas y en los compartimentos sinápticos. FMRP también se ha visto asociada con el ARN no codificante *BCI*, un transcrito que es abundante en las neuronas y que podría estar involucrado en la represión de los ARNms que se unen a FMRP. Por ejemplo, el ARNm de MAP1B posee una estructura en cuarteto G y una secuencia con mucha homología a *BCI* (Menon & Pastore 2003; Zalfa *et al.* 2003). Además, FMRP puede formar complejos ribonucleoproteicos con RISC (del inglés RNA- induced silencing complex) por lo que en el control postranscripcional de los ARNsm podría participar la vía de ARN de interferencia (Schaeffer *et al.* 2003).

Las proteínas que forman parte del complejo ribonucleoproteico junto con FMRP también han sido caracterizadas. FMRP interactúa con sus homólogos FXR1 y FXR2, estas dos proteínas tiene funciones similares a FMRP. Sin embargo, en el SXF o en el *KO* (Knockout) de ratón la presencia de los homólogos no compensan la pérdida de FMRP, más bien se cree que tienen un efecto sinérgico en la función de FMRP. NUFIP1 es una proteína de localización nuclear pero que puede salir al citoplasma para interactuar con los ribosomas y con FMRP. CYFP1 y 2 también interactúan con FMRP se desconoce su

función pero se ha visto que podrían actuar con la proteína Rac1, relacionada con la maduración de las espinas dendríticas. Otras proteínas descritas hasta el momento son una proteína de unión a ARN de localización nucleolar y citoplasmática (nucleolin), YB1 asociada a la localización, traducción y estabilidad de ARNs. FMRP también se asocia con proteínas de la vía de ARN de interferencia como Dicer y AGO (Bardoni & Mandel 2002).

Todas estas evidencias sugieren que FMRP actúa como parte de un complejo ribonucleoproteico mensajero que se asocia a los polirribosomas. Se desconoce todavía si la interacción con el ribosoma es directa. Estos complejos junto con la maquinaria de la traducción forman gránulos que se mueven por medio de componentes del citoesqueleto (microtúbulos y kinesina)

### **Función de FMRP**

Los individuos que manifiestan el SXF y los ratones *KO* poseen espinas dendríticas más largas, abundantes y con formas inmaduras que han sido asociadas con el retardo mental. Las espinas de las dendritas son protuberancias postsinápticas donde ocurren la mayoría de las sinapsis excitatorias, son sensibles a su ambiente celular y modifican su densidad y morfología en forma dependiente de algunos estímulos celulares (Dong & Greenough 2004). En el SXF los procesos de selección, maduración y poda de las espinas se encuentran alterados, afectando los mecanismos de plasticidad sináptica de las neuronas (Irwin *et al.* 2000). La plasticidad sináptica es un cambio a largo plazo en la fuerza sináptica después de un estímulo y constituye un mecanismo de almacenamiento de la información durante el aprendizaje y la memoria (O'Donnell & Warren 2002).

La estructura de las espinas dendríticas está determinada por la modulación del citoesqueleto, en particular con el control de la polimerización de los elementos de actina. Se ha visto que FMRP puede interferir con la vía de Rac1 que controla la dinámica del

citoesqueleto. La activación de Rac desencadena la fosforilación de la cofilina lo que inhibe su capacidad para unirse a los elementos de actina y disminuye la depolimerización de los filamentos permitiendo la formación de espinas con cabezas más grandes. La desfosforilación de la cofilina por la fosfatasa P- cofilina elimina esta inhibición. Estos ciclos de ensamblaje y desensamblaje de los elementos del citoesqueleto son controlados por fosforilación. FMRP se une al ARNm de la fosfatasa P- cofilina y regula negativamente su traducción, por lo que en su ausencia se da un incremento de esta proteína que altera la dinámica de los filamentos de actina (Carlisle & Kennedy 2005 y Castets *et al.* 2005).

La localización de los gránulos de ARNms que contienen FMRP requiere de la acción de los microtúbulos para el transporte dependiente de actividad. La dinámica del microtúbulo necesaria para el transporte de los complejos ribonucleoproteicos también es controlado por FMRP. FMRP regula la traducción de la MAP1B, la cual se encuentra aumentada en células que no expresan la proteína. La sobreexpresión de MAP1B lleva a un incremento anormal de la estabilidad de los microtúbulos que podría afectar la morfología de las espinas dendríticas (Antar *et al.* 2005).

FMRP puede ser detectada en los polirribomas de los sinaptoneurosomas. Estas preparaciones sinápticas responden a la activación por los receptores de glutamato. La síntesis de FMRP aumenta después de esta activación, así como la traducción de otros ARNms que se encuentran en los complejos ribonucleoproteicos que contienen FMRP. Una de las consecuencias funcionales de la activación de los receptores de glutamato (mGluR) es el mecanismo de plasticidad sináptica de depresión a largo plazo (LTD) que se encuentra aumentado en los individuos con el SXF y que está relacionado con la poda y selección de las espinas dendríticas ( O'Donell & Warren 2002).

El mecanismo de LTD requiere una rápida y pasajera síntesis de proteínas, que puede ser desencadenada por los mGluRs. Se ha propuesto el siguiente modelo para la función de FMRP (Figura 4) (Bear *et al.* 2004):

a. Bajo condiciones basales FMRP se encuentra en las dendritas como parte de gránulos ribonucleoproteicos que contienen su propio ARNm o ARNs importantes para la función cerebral, proteínas y ribosomas.

b. En ausencia de actividad, FMRP actúa como un regulador negativo de la traducción de esos ARNs. La inhibición de la traducción requiere la formación de un homodímero de FMRP.

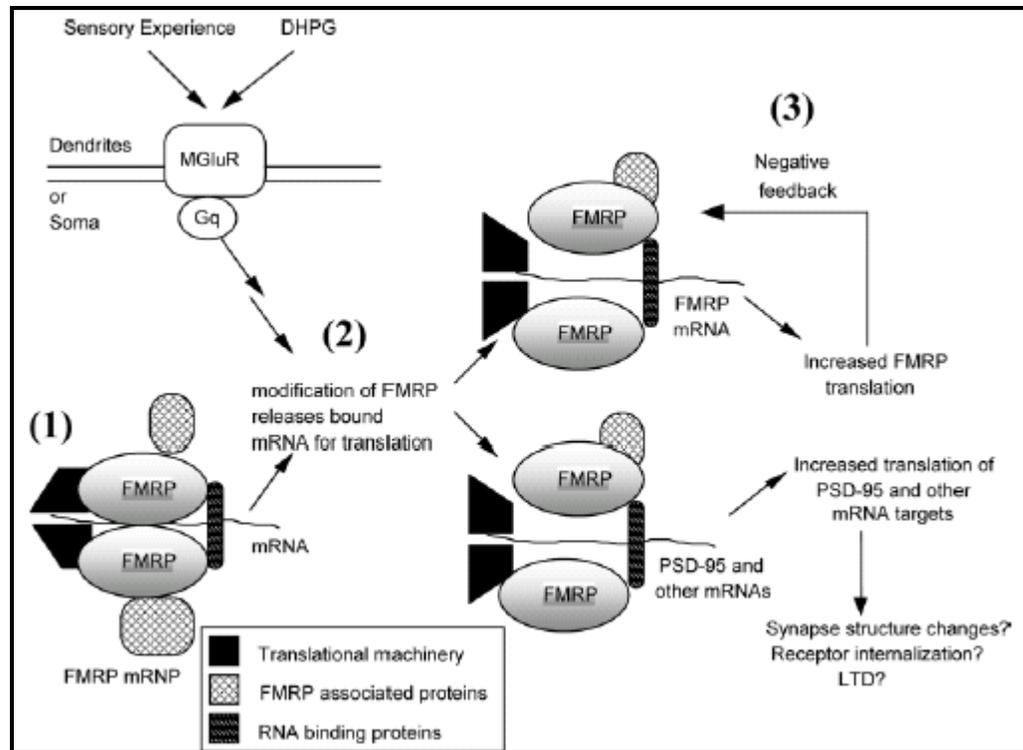
c. La activación de los mGluRs desencadena la internalización de los receptores AMPA y NMDA, y un rápido movimiento y utilización de los gránulos. La activación de los receptores provoca la pérdida de homodimerización de FMRP (probablemente por fosforilación) liberando la inhibición de la traducción y promoviendo la síntesis rápida de proteínas en el momento y lugar requerido.

d. Este aumento en la síntesis de proteínas es pasajero y se cree que es nuevamente inhibido por las FMRPs recién sintetizadas. Por tanto, FMRP actúa como un freno para el mecanismo de plasticidad LTD, lo cual no sucede en el SXF.

Los receptores de glutamato participan en otras funciones que también podrían relacionarse con otras características del fenotipo del SXF, pero que aun no han sido confirmadas como su acción en las células epileptiformes asociada a ataques epilépticos.

El control postranscripcional de los ARNs que regula FMRP puede estar modulado por la acción de ARNs pequeños no codificantes. FMRP se asocia a *BCI* y podría regular la traducción de MAP1B, la calmodulina y otros ARNs por homología de

secuencia. También, los complejos ribonucleoproteicos que contienen FMRP presentan componentes del complejo RISC (Bagni & Greenough 2005)

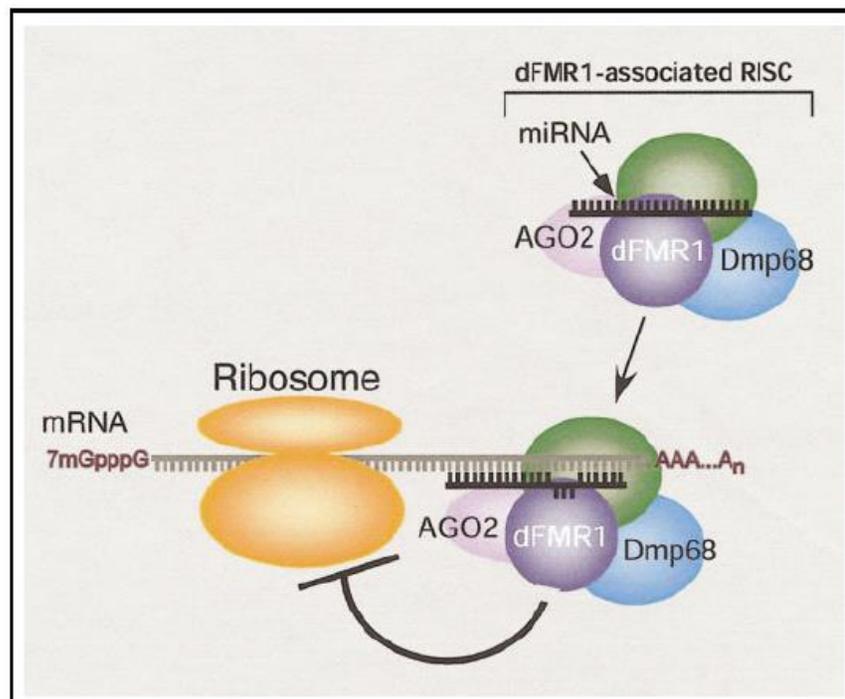


**Figura 4. Modelo propuesto para la función de FMRP en el sistema nervioso.** (Tomado de Todd & Malter 2002)

### FMRP y la regulación de la traducción de ARNs mensajeros del cerebro

La vía de ARN de interferencia podría ser el principal mecanismo molecular por el cual FMRP regula la traducción de mensajes celulares del cerebro. Las principales evidencias provienen de la asociación de Dfmr1 en *Drosophila* con RISC y AGO2. La vía de ARNi es un mecanismo conservado que promueve el silenciamiento génico en respuesta a ARNs doble banda (dsARN). Estos dsARNs son procesados en ARNsi por la acción de una ARNasa III conocida como Dicer. Los ARNsi son incorporados en el complejo RISC para ser usados como una guía para seleccionar ARNsm complementarios. La unión de los ARNsi a los ARNsm blanco provoca su degradación o la inhibición de la

traducción. En las células de organismos vertebrados se han encontrado microARNs endógenos que son ARNs simple banda, de aproximadamente 70 nucleótidos, que se pliegan sobre sí mismos formando una estructura en horquilla. Los microARNs maduros son ARNs de simple banda de unos 20- 25 nucleótidos que son procesados por Dicer a partir de la horquilla de 70 nucleótidos (Jin *et al* 2004).



**Figura 5. Modelo para el papel de dFMR en RISC.** (Tomado de Siomi *et al.* 2004)

La hipótesis propuesta para la regulación de la traducción mediante microARNs sugiere que una vez que Dfmr1 (proteína homóloga de FMRP en *Drosophila*) se une a sus ARNs específicos, ésta recluta a RISC junto con los microARNs e inhibe la traducción por reconocimiento entre los microARNs y sus ARNs blancos, o más bien, Dfmr1 podría ensamblarse primero con RISC y los microARNs para posteriormente localizar por apareamiento sus ARNs blancos, estabilizando la unión mediante la estructura cuarteto G o el complejo “Kissing”. Debido a que Dfmr1 tiene capacidad para discriminar entre diferentes ARNs, es posible que la proteína pueda actuar como una chaperona para el

reclutamiento de microARNs específicos dentro del RISC. Los microARNs controlan la traducción por complementariedad parcial en el extremo 3'-UTR de los ARNm. Esta interacción no afecta la estabilidad del ARN blanco. El perfil polirribosómico de estos ARNs no cambia lo que sugiere una inhibición después de la iniciación de la traducción, ya sea en la elongación o en la terminación (Figura 5). Este mecanismo puede ser reversible, lo que constituye un requisito para la plasticidad sináptica dependiente de la síntesis de proteínas como el mecanismo LTD (Siomi *et al.* 2004).

Plante *et al.* 2006, demostraron que la proteína FMRP de humanos puede actuar como un aceptor de microARNs producidos por Dicer formando un complejo de miRNP (complejo ribonucleoproteico con microARNs), facilitando el ensamblaje de los microARNs en las secuencias de los ARNs blancos. La propiedad de ensamblar estos microARNs es eliminada por delección del dominio KH2. El estudio confirmó el requerimiento de FMRP para la eficiencia de la vía de ARN de interferencia *in vivo*. Basados en estas observaciones y en las evidencias de que los pre- microARNs (precursores de los microARNs) una vez en el citoplasma son cortados por Dicer en duplex de miARN: miARN\* y que el miARN maduro es incorporado a RISC mientras que la banda opuesta miARN\* se encuentra menos frecuentemente en RISC y es, posiblemente, degradada (Lee *et al.* 2003).

A partir de estas observaciones Plante & Provost 2006, sugirieron que FMRP ensambla preferencialmente los duplex de microARN: ARNm imperfectamente apareados, lo que constituye el evento más comúnmente encontrado en mamíferos. Un enigma por resolver en este ensamblaje es la acción de los dsARN sobre ARNs de banda sencilla. En este sentido, la formación de un complejo específico de transición de microARN: ARNm a partir de un duplex de microARN: microARN\* y de su ARN blanco parece un

requerimiento obligatorio. FMRP puede aceptar y utilizar los duplex de microARN: microARN\*, generados a partir de Dicer para favorecer la formación del complejo miARN: ARNm a través de una reacción de intercambio de cadenas de miARN\*/ ARNm, proceso favorecido por la misma FMRP. Por tanto, en el SXF la ausencia de FMRP resulta en un ensamblaje subóptimo de los microARNs con sus ARNs blancos provocando un aumento anormal en la expresión de los mismos. Aún queda por dilucidar los elementos que podrían coparticipar en el cumplimiento de la hipótesis propuesta y la función *in vivo* de FMRP antes descrita.

La determinación de la función exacta de FMRP en la regulación génica guiada por microARNs es esencial para determinar la base molecular del síndrome del cromosoma X frágil.

## **7. Diagnóstico del SXF**

El análisis citogenético de la enfermedad, basado en la expresión del sitio frágil, era el único método diagnóstico del que se disponía en la década de los 80's. No obstante, la expresión del sitio frágil se lograba para determinados tamaños de repetición. El 20% de los varones y la mayoría de las mujeres no eran identificados. Por otra parte, la técnica no puede detectar individuos con la premutación (Oostra & Willemsen 2001).

En 1991, se mapeó el gen responsable de la enfermedad lo que permitió el análisis directo de la mutación en la secuencia de ADN. Esto hizo posible la identificación de individuos con la premutación y mutación completa, además de permitir el conocimiento del tamaño de la repetición en los sujetos.

El análisis por Southern Blot es la técnica diagnóstica por excelencia para la identificación de la mutación completa y de las premutaciones grandes. La ventaja de este método es que permite determinar el estado de metilación del promotor del gen, mediante

una doble digestión con una enzima sensible a la metilación y permite, además, la identificación de mosaicos. A pesar de esto, el Southern Blot es una prueba que consume mucho tiempo y demanda un mayor costo económico por el uso de una sonda marcada (Oostra & Willemsen 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es útil en los individuos con premutaciones pequeñas porque la polimerasa tiene problemas para amplificar fragmentos de 100 o más repeticiones. Esta es una prueba sencilla, barata y eficiente para detectar portadores (Brown *et al.* 1993, Oostra & Willemsen 2001)

En el Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica se realiza el estudio molecular de la enfermedad que permite comprobar la presencia de la mutación completa en individuos portadores del marcador citogenético o con sospecha clínica de padecer SFX; además de identificar a individuos portadores de la premutación en las familias de los probandos. El estudio directo de la mutación es indispensable para ofrecer el asesoramiento genético y es la prueba de diagnóstico definitiva (Cuenca *et al.* 2002)

Uno de los métodos desarrollados recientemente es la detección directa de la proteína FMRP por medio de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales que permite la identificación de las posibles personas afectadas (Willemsen *et al.* 1995). El procedimiento puede ser aplicado para el diagnóstico posnatal, en frotis de sangre y raíces de cabello y prenatal en muestras de vellosidades coriónicas (Willemsen *et al.* 1997, 1999, Lambiris *et al.* 1999). Los resultados se obtienen después de un día y contribuyen a determinar la relación entre la expresión de la proteína con el estado del retardo mental de los individuos, además del patrón de inactivación del cromosoma X en las mujeres. Estas características hacen que pueda aplicarse en programas de tamizaje (de Vries *et al.* 1998).

## **8. Tamizaje poblacional del SXF**

Las estrategias de tamizaje consisten en la aplicación sistemática de una prueba para identificar individuos, no diagnosticados, con el riesgo suficiente de padecer un trastorno específico que garantice investigaciones futuras o medidas de prevención específicas. El tamizaje de poblaciones ha sido desarrollado para la detección presintomática de enfermedades tratables o con cura. En el caso del SXF, la prevención es el principal objetivo de los programas de tamizaje pues se trata de una enfermedad hereditaria en la que no se ha logrado corregir la condición de portador (Pembrey *et al.* 2001).

El tamizaje de poblaciones que padecen de retardo mental permite identificar los individuos con sospecha suficiente de padecer FRAXA para así ofrecerles el diagnóstico definitivo, un mejor tratamiento y el adecuado asesoramiento genético para ellos y sus familiares (Song *et al.* 2003).

El tamizaje en cascada es la estrategia más eficiente en enfermedades como SXF; debido a que los beneficios que obtienen los individuos diagnosticados pueden magnificarse al extenderse a los demás miembros de la familia, quienes tienen un mayor riesgo de ser portadores de la enfermedad. Por tanto, los propósitos principales de esta estrategia son el diagnóstico de individuos afectados en una etapa temprana para que puedan recibir los máximos beneficios de las terapias educativas y de salud; y la identificación de mujeres con un riesgo alto de transmitir la mutación (Song *et al.* 2003).

Las prácticas de tamizaje se han llevado a cabo en diferentes países, ya sea en programas de tamizaje prenatal, preconcepción o en cascada. En Israel, Toledano- Alhadeef *et al.* 2001 encontraron una prevalencia de 1/69 mujeres portadoras de la premutación (>50 repeticiones) y 1/4778 afectadas con la mutación completa en 14334 mujeres embarazadas. En un estudio de tamizaje prenatal realizado a 1477 mujeres de Finlandia se detectaron 43

mujeres con 40- 50 repeticiones, 12 con 50- 60 repeticiones y 6 con más de 60 tripletas CGG. A todas las mujeres con más de 50 repeticiones (18 en total) se les brindó el diagnóstico prenatal invasivo con el que se logró identificar dos fetos portadores de la premutación, uno con la mutación completa y uno en mosaico (Jallinoja 2001). El tamizaje antenatal permite detectar individuos portadores e implementar las técnicas prenatales para un diagnóstico oportuno de los afectados.

En 1990 se desarrolló un programa de tamizaje en cascada en Australia. Se incluyeron en el programa 6490 individuos de instituciones de enseñanza especial y se encontraron 253 probandos positivos, de los cuales el 70% no habían sido correctamente diagnosticados. Además, se le brindó consejo genético a 818 mujeres parientes de los probandos con un 25- 50% de riesgo de ser portadoras. El diagnóstico de la enfermedad y el asesoramiento genético disminuyeron la tasa de nacimientos en un 20% en las familias donde segregaba la mutación. El 78% de las mujeres embarazadas se sometieron a pruebas prenatales. Todos los embarazos de fetos masculinos y el 60% de los femeninos con la mutación completa fueron interrumpidos (Turner *et al.* 1997).

En Holanda, van Rijn *et al.* 1997 identificaron 19 familias con el SXF entre 1991 y 1995. En 70 mujeres de las 19 familias se diagnosticó un 47% de portadoras de la premutación y un 16% de la mutación completa.

En 1987 se realizó en Costa Rica un tamizaje basado en la detección del marcador citogenético en alumnos de la Escuela de Enseñanza Especial Fernando Centeno Güell. Este estudio permitió diagnosticar a 4 niños y 2 niñas afectados con el síndrome por primera vez en nuestro país (Castro y Cuenca 1987, 1996). Actualmente se lleva a cabo un estudio de tamizaje neonatal basado en la tecnología del ADN (Sequeira *et al.* en prep).

Los programas de tamizaje constituyen una valiosa herramienta para detectar portadores del síndrome, quienes valiéndose de la adecuada asesoría y el conocimiento adquirido podrían tomar las medidas apropiadas para mejorar su calidad de vida y contribuir a disminuir la incidencia de la enfermedad.

El SXF es un padecimiento con una sintomatología compleja, carente hasta el momento, de un tratamiento que cure la condición de enfermo en los individuos afectados. De esta manera, la prevención basada en el asesoramiento genético resulta ser la mejor forma de disminuir la incidencia de la enfermedad, con la ayuda de técnicas diagnósticas adecuadas que permitan la identificación de los individuos afectados y portadores de la premutación.

## Justificación

La frecuencia de alteraciones en el desarrollo cognoscitivo es de aproximadamente un 3% en la población humana. Se han identificado al menos 300 trastornos genéticos que involucran retardo mental. La incidencia de varones afectados es tres veces más alta que la de las mujeres, lo que ha sugerido la acción de mutaciones ligadas al cromosoma X. El síndrome del cromosoma X frágil explica el 40- 50% de los casos con este tipo de herencia (Bardoni y Mandel 2002).

Las alteraciones genéticas son responsables del 45- 55% del retardo mental en los países desarrollados (Shah 1991). En Costa Rica, la incidencia de anomalías genéticas no se aleja mucho del perfil que ocurre en estos países por lo que es posible que la contribución de los defectos cromosómicos o mutaciones ligadas al X y al retardo mental sea muy similar. En nuestro país el retardo mental representa la segunda causa de discapacidad después de las anomalías neuromusculares (CNAREE 1994).

El SXF es una enfermedad hereditaria por lo que comúnmente se observan varios individuos afectados pertenecientes a una misma familia. Esto a diferencia del síndrome de Down en el que la aparición de los casos es generalmente esporádica y el riesgo de recurrencia es muy bajo.

El estudio de poblaciones seleccionadas de deficientes mentales para determinar la contribución del SXF al retardo mental es una de las estrategias más utilizadas; debido a las limitaciones técnicas y económicas que existen para determinar la prevalencia e incidencia de la enfermedad en la población general. Asimismo, cuando se estudian poblaciones seleccionadas se reducen los costos y el esfuerzo que conlleva la realización de pruebas innecesarias.

La mayoría de los individuos que padecen el síndrome no han sido correctamente diagnosticados. Lo anterior se debe a que el fenotipo asociado al SXF generalmente resulta poco evidente para los profesionales que atienden a los afectados, los cuales suelen estar poco informados sobre la enfermedad. Por esta razón, a la mayoría de las personas se les atribuye un origen “oscuro” o desconocido a su retardo mental. También es común que los portadores de la mutación completa se encasillen como autistas o hiperactivos con déficit atencional por las características que comparten con estos dos trastornos.

El síndrome no tiene cura por lo que el tratamiento es sintomático. De este modo la prevención primaria, mediante el consejo genético, es la forma más apropiada para evitar que personas portadoras de la mutación hereden a sus hijos la enfermedad hasta que no se consiga tratar mediante terapia génica la condición de portador.

Debido a que en el SXF varios miembros de la misma familia están afectados, el tamizaje en cascada es uno de los métodos más utilizados en los países desarrollados para detectar portadores de la mutación completa o premutación en los familiares de los pacientes con FRAXA. Esta estrategia es de gran eficacia ya que los individuos pertenecientes a una familia donde segrega la mutación tienen un mayor riesgo de ser portadores (Pembrey *et al.* 2001, Song *et al.* 2003).

La realización de un tamizaje en cascada en nuestro país podría contribuir a disminuir el número de individuos no diagnosticados o portadores en la población. Además, el diagnóstico adecuado de los probandos afectados con la prueba del ADN vendrá a aliviar la carga que sufren los padres al no saber la causa del retardo mental que padecen sus hijos. Los niños que se identifiquen con el SXF se podrían beneficiar con un tratamiento y terapia de rehabilitación para la condición que los caracteriza. Esto porque se diferencian de otros niños con retardo mental de distinto origen; así que las terapias de

lenguaje y estimulación apropiadas podrían contribuir a mejorar su calidad de vida y su desempeño dentro de la sociedad.

Asimismo, como consecuencia del tamizaje, a mediano plazo se podría identificar las familias donde segrega la enfermedad. La detección de las personas portadoras de la premutación abre la posibilidad de disminuir su riesgo de procrear descendencia afectada a través del asesoramiento genético oportuno. La información que los portadores puedan adquirir mediante el consejo genético les permitirá tomar decisiones reproductivas según su percepción de riesgo, daño, valores, religión, condición económica y social, etc. Uno de los principales beneficios de la asesoría genética y la prevención primaria para el país sería la posible reducción en la incidencia de nacimientos de individuos con el síndrome. En Australia se redujo la prevalencia de varones afectados de 1/ 4000 a 1/ 10 000 gracias a la implementación del consejo genético y tamizaje en cascada desde 1985 (Turner 1997).

Por otra parte, con una disminución de la incidencia de la enfermedad mediante la prevención primaria es posible disminuir el costo que implica el abordaje y tratamiento de la enfermedad. Se calcula que el gasto en servicios médicos, educativos y sociales que necesitan las personas afectadas durante toda su vida es de aproximadamente US \$1 000 000 (Wildhagen *et al.* 1998). En nuestro país no se tienen datos de la inversión económica y social que implica la atención médica de estas personas; se sugiere que la inversión es alta debido a la necesidad de un enfoque multidisciplinario para el tratamiento que involucra pediatras, psicólogos, neurólogos, terapeutas del lenguaje, maestros de educación especial, terapeutas ocupacionales, entre otros.

Los pacientes con FRAXA tienen una esperanza de vida igual al de la población general, necesitando de atención durante toda su vida. Por esta y otras razones es que la prevención que pueda derivarse del proyecto por medio del asesoramiento genético

contribuirá a disminuir los efectos de la enfermedad en el ámbito económico y social si se logra disminuir su recurrencia en las familias donde segrega la mutación.

### **Objetivo General**

Determinar la presencia del síndrome del cromosoma X frágil en estudiantes de escuelas y centros de enseñanza especial con retardo mental idiopático o no diagnosticado, con el fin de prevenir a largo plazo la recurrencia de la enfermedad en las familias de los probandos afectados.

### **Objetivos Específicos**

1. Implementar la técnica de inmunohistoquímica como un método barato, simple y rápido para el tamizaje de una población seleccionada.
2. Identificar los probandos positivos por medio de la expresión de la proteína FMRP en frotis de sangre y bulbos pilosos.
3. Confirmar la presencia de la enfermedad en los individuos tamizaje positivo mediante el análisis directo de la mutación con la técnica de Southern Blot.
4. Determinar los individuos portadores de la premutación y mutación completa en los familiares directos (en primer grado) de los probandos positivos a los que se les confirme la enfermedad, con las técnicas de PCR y Southern Blot.

## **Materiales y Métodos**

### **Ubicación geográfica del proyecto**

El proyecto se llevará a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica, en Mercedes de Montes de Oca.

### **Población de Estudio**

Se incluirán en el estudio niños, niñas y adolescentes con retardo mental o comportamiento autista de origen desconocido o no determinado. Se seleccionarán los individuos que asisten a escuelas de enseñanza especial del Ministerio de Educación Pública o privadas.

Se realizará una pre- selección de los varones y las niñas con mayor probabilidad de resultar tamizaje positivo basado en los criterios descritos en el anexo 1. Según sea el tamaño de la población y si la disponibilidad de recursos y si el tiempo es suficiente, la pre-selección será omitida para abarcar un mayor número de individuos.

Se visitarán las escuelas previamente para coordinar reuniones con los maestros y los padres de familia para informarles sobre el SXF, explicarles el proyecto y las ventajas y desventajas de participar en el mismo.

Se usarán varias fórmulas de consentimiento informado dependiendo de las distintas etapas del estudio pues no todos los participantes iniciales continuarán durante todo el proceso de la investigación. Se usará la fórmula de consentimiento informado para ser sujeto de investigación 1 para todos aquellos niños y niñas cuyos padres o representantes legales acepten la participación de los mismos en la prueba de tamizaje. Los niños que resulten tamizaje positivo se les pedirá una muestra de sangre (fórmula de consentimiento informado para ser sujeto de investigación 2) para confirmar si padecen o no la

enfermedad. Además, los niños y niñas afectadas con el SXF se les hará un examen físico para determinar las manifestaciones fenotípicas que expresan para lo cual se solicitará consentimiento a sus representantes a través de la fórmula de consentimiento informado para ser sujeto de investigación 2.1. Por último, se solicitará una muestra de sangre a los familiares en primer grado de los niños y niñas que resulten positivos para la enfermedad (fórmula de consentimiento informado para ser sujeto de investigación 3)

### **Prueba de tamizaje**

La prueba de tamizaje se basará en la detección de la expresión de la proteína FMRP por el método de inmunohistoquímica, en frotis de sangre y cabellos de los sujetos. La recolección de ambas o de una u otra muestra dependerá de la disposición de los individuos. Se usarán los métodos de detección indirecta de la inmunoperoxidasa, para los frotis, y el de fosfatasa alcalina para los cabellos, ambos desarrollados por el Departamento de Genética Clínica de la Universidad de Erasmus en Holanda (Willensem *et al.* 1995, 1999) (Anexo 6). Se harán como mínimo 5 frotis por individuo, de los cuales se procesarán dos y los tres restantes se guardarán a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se analizarán en el microscopio de luz a 100X 100 linfocitos y los 20 cabellos para determinar el porcentaje de expresión de la proteína. La participación en la prueba de tamizaje es voluntaria (Anexo 2).

### **Prueba confirmatoria de los individuos tamizaje positivo**

Se hará la confirmación molecular de los probandos tamizaje positivo mediante el análisis directo de la mutación con el Southern Blot. La confirmación del resultado inmunohistoquímico es voluntaria (Anexo 3). Los niños o niñas a quienes se les confirme la mutación completa se someterán a un examen clínico voluntario para caracterizar su expresión fenotípica y para descartar que padecen de algunas de las patologías asociadas a FRAXA por parte de la médico del INISA Isabel Castro (Anexo 4).

Por otra parte, se le realizarán ambas técnicas moleculares (PCR y Southern Blot) a los familiares en primer grado de los probandos verdaderos positivos confirmados por el análisis directo de la mutación. Esto para determinar si otros miembros de la familia están afectados por o son portadores de la mutación. La participación de los familiares en el análisis molecular de la mutación es voluntaria (Anexo 5).

El método de Southern Blot está basado en el procedimiento implementado por Rousseau *et al.* 1991 con las modificaciones hechas por Cuenca *et al.* 2002. Se tomará una muestra de 7- 10 ml de sangre en tubos estériles con ACD para la extracción del ADN con el método de fenol- cloroformo (Anexo 7). Se realizará una doble digestión del ADN (6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) con 5 unidades de las enzimas EcoRI y SacII, buffer (1X), BSA (0.1X) para un volumen final de 60 $\mu\text{l}$  por reacción. Se incubará a 37°C durante toda la noche en el baño María. La calidad de la digestión se verificará en geles de agarosa pequeños al 1%. Los productos ya digeridos se correrán en geles de agarosa de 20X20 al 0.8%, en buffer TBE 1X a un pH de 7.7 y con un marcador de peso molecular. El gel se correrá a 50V por 21h, se tiñe con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se fotografía. Posteriormente, se hará el montaje del blot y la hibridación con la sonda StB12.3 (Anexo 8).

La técnica de PCR para el análisis de la mutación está basado en el procedimiento de Fu *et al.* 1991 con las modificaciones desarrolladas por Cuenca *et al.* 2002. Se tomará una muestra de sangre para la extracción de ADN de los sujetos. El tamaño de la repetición se determinará por PCR con los iniciadores A (5'- GTCAGGCGTTCAGCTCCGTTT- 3') y B (5'- CTCCATCTTCTCTTCAGCCCTGCT- 3'). El volumen final por cada reacción es de 25  $\mu\text{l}$  e incluyen 150 ng de ADN, 10  $\mu\text{M}$  de cada uno de los iniciadores, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, buffer + MgSO<sub>4</sub> 1X, DMSO al 10% y 1 unidad de pfu polimerasa. El perfil que se utilizará en la PCR es de 1 ciclo de 5min a 95°C, 30 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 59°C, 1

min a 72°C y 1 ciclo de 7min a 72°C. Los productos de la PCR se correrán a 3000V, 250mA, 80W por 4h en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (Anexo 9 y 10).

### **Análisis de los datos**

Se determinará la expresión de la proteína en los dos tipos de muestra en forma de porcentaje de raíces de cabello y linfocitos con proteína respecto al total de raíces y linfocitos examinados. Se determinará la sensibilidad y especificidad de la técnica de inmunohistoquímica tanto para el procedimiento en sangre como para el de raíces de cabellos. La sensibilidad corresponde a la proporción de individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo. La especificidad se refiere a la proporción de individuos sin la enfermedad que resultaron negativos en la prueba. Estas características de la técnica se calculan de la siguiente manera:

**Sensibilidad:**  $PV / PV + FN$

**PV:** positivos verdaderos, **FN:** falsos negativos

**Especificidad:**  $NV / NV + FP$

**NV:** negativos verdaderos, **FP:** falsos positivos

Se determinará el tamaño de la repetición de los individuos afectados y la de sus familiares directos.

## Bibliografia

- Antar, L.N. & G.J. Bassell. 2003. Sunrise at the synapse: the FMRP mRNP shaping the synaptic interface. *Neuron*. 37: 555- 558.
- Antar, L., Dichtenberg, J., Plociniak, M., Afroz, R. & G. J. Bassell. 2005. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes, Brain and Behavior* 4: 350-359.
- Ashley- Koch, A., H. Robinson, A. Glicksman, S. Nolin, C. Schwartz., W.T. Brown, G. Turner & S. Sherman. 1998. Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 776- 785.
- Bagni, G. & W. Greenough. 2005. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat. Rev. Neuros.* 6: 376-387.
- Bardoni, B., J.L. Mandel & G. Fisch. 2000. *FMR1* gene and fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 97: 153- 163.
- Bardoni, B. & J.L. Mandel. 2002. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 12: 284- 293.
- Brown, T., G. Houck, A. Jeziorowska, F. Levinsone, X. Ding, C. Dobkin, N. Zhong, J. Henderson, S. Sklower & E. Jenkins. 1993. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA.* 270 (13): 1569- 1575.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, et al. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107:477–87.

Carlisle, H. & M. Kennedy. 2005. Spine architecture and synaptic plasticity. *TRENDS in Neuroscience* 28 (4): 182-187.

Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A. *et al.* 2005. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. 14 (6): 835-844.

Castro, I. & P. Cuenca. 1987. Tamizaje de sitio frágil en el cromosoma X en una población de retardados mentales. *Rev. Méd. Hosp. Nal. Niños Costa Rica.* 1 (22): 1- 14.

Castro, I. & P. Cuenca. 1996. Frecuencia del síndrome del cromosoma X frágil en la Escuela de Enseñanza Especial "Fernando Centeno Güell". *Acta Pediátrica Costarricense.* 10: 99- 106.

Castro-Volio, I. & P. Cuenca- Berger. 2005. Trastornos del neurodesarrollo (síndrome X frágil) y neurodegenerativos (síndrome de temblor/ ataxia) asociados al crecimiento de un gen. *Rev. Neurol.* 40 (7): 431- 437.

Consejo Nacional de Rehabilitación y Educación Especial. Sección de Documentación, Información y Registros. Departamento de Apoyo Técnico. *Boletín Estadístico #23.* 1994. Costa Rica. p12- 18

Crawford, D.C., J.M. Acuna & S.L. Sherman. 2001. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet. Med.* 3: 359- 371.

Cuenca, P., F. Morales & I. Castro. 2002. Diagnóstico directo de la mutación que causa el síndrome del cromosoma X frágil. Experiencia en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense.* 44: 27- 33.

Darnell, J., Warren, S. & R. Darnell. 2004. The fragile X mental retardation protein, FMRP, recognizes G- quartets. *Mental Retardation and Develop. Disabilities Res. Rev.* 10: 49-52.

Darnell, J., Fraser, C., Mostovetsky, O., Stefanni, G., Jones, T., Eddy, S. & R. Darnell. 2005. Kissing complex RNA mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes & Develop.* 19: 903-918.

de Vries, B., S. Mohkamsing, A. van den Ouweland, D. Halley, M. Niermeijer, B.A. Oostra & R. Willemsen. 1998. Screening with the FMR1 protein test among mentally retarded males. *Hum. Genet.* 103: 520- 522.

Dong, W. & W. Greenough. 2004. Plasticity of non neuronal brain tissue: roles in developmental disorders. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Res. Rev.* 10: 85- 90.

Eichler, E. E., Holden J., Popovich B.W., Reiss, A.L., Thibodeau, S.N., Richards, C.S., Ward, P.A. & D.L. Nelson. 1994. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genet.* 8:88-94.

Feng, Y. 2002. Fragile X mental retardation: misregulation of the protein síntesis in the developing brain?. *Micros. Res. Tech.* 57: 145- 147.

Ferrando- Lucas, M., P. Banús- Gómez & G. López- Pérez. 2004. Aspectos cognitivos en niñas con síndrome X frágil. *Rev. Neurol.* 38 (1): S53- S57.

Fu, Y.H, D. Kuhl, A. Pizzuti, M. Pieretti, J. Sutcliffe, S. Richards, A. Verkerk, J. Holden, R. Fenwick, S. Warren, B. Oostra, D. Nelson & C. Caskey. 1991. Variation of the CGG

repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 67:1047- 1058.

Gantois, I. & R. F. Kooy. 2002. Targeting fragile X. *Genome Biol.* 3 (5): 1014.1-1014.5.

Hagerman, R.J. 1996. Physical and behavioral phenotype, pp. 3- 87. *In* R.J. Hagerman & A. Cronister (2ed). *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment and research*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA.

Garber, K., J. Visootsak & S.T. Warren. Fragile X syndrome. *Europ. Jour. Hum. Genet.* 16: 666-672.

Hagerman, R. 1998. Clinical and diagnostic aspects of fragile X syndrome, pp. 27- 53. *In* R.D. Wells & S.T. Warren. *Genetic instabilities and hereditary neurological diseases*. Academic Press. Nueva York, USA.

Hagerman, R.J. & P.J. Hagerman. 2001. El síndrome X frágil: un modelo de la relación gen- cerebro- conducta. *Rev. Neurol.* 33 (11): S51- S57.

Hagerman, R.J. & P. J. Hagerman. 2002. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 12: 278- 283.

Hagerman, R.J. 2006. Lessons from fragile X regarding neurobiology, autism, and neurodegeneration. *Dev. Beh. Ped.* 27: 63-71.

Imbert, G., Y. Feng, D. Nelson, S. T. Warren & J.L. Mandel. 1998. FMR1 and mutations in fragile X syndrome: molecular biology, biochemistry, and genetics, pp. 15- 25. *In* R.D. Wells & S.T. Warren. *Genetic instabilities and hereditary neurological diseases*. Academic Press. Nueva York, USA.

- Irwin, S., Galvez, R. & W. Greenough. 2000. Dendritic spine structural anomalies in fragile- X mental retardation syndrome. *Cerebral Cortex* 10: 1038-1044.
- Jallinoja, P. 2001. Genetic screening in maternity care: preventive aims and voluntary choices. *Sociol. Health Illness*. 23: 286–307.
- Jin, P. & S.T. Warren. 2003. New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Bioch. Sci.* 28 (3): 152- 158.
- Jin, P., Alisch, R.S & S. Warren. 2004. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat. Cell Biol.* 6 (11): 1048-1053.
- Kau, A., W. Meyer & W. Kaufmann. 2002. Early development in males with fragile X síndrome: a review of the literature. *Micros. Res. Tech.* 57: 174- 178.
- Kooy, R.F., R. Willemsen & B.A. Oostra. 2000. Fragile X syndrome at the turn of the century. *Mol. Med.* 6: 193- 198.
- Kumari, D & K. Usdin. 2001. Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha-Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. *J Biol Chem.* 276: 4357–4364.
- Lambiris, N., H. Peters, R. Bollmann, G. Leschik, J. Leisti, R. Salonen, G. Cobet, B.A. Oostra & R. Willemsen. 1999. Rapid FMR1- protein analysis of fetal blood: an enhancement of prenatal diagnostics. *Hum. Genet.* 105: 258- 260.
- Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425 (6956):415–419.
- Lubs, H.A. 1969. A marker X chromosome. *Am J. Hum. Genet.* 21: 231- 244.

McConkie-Rosell, A., L. Abrams., B. Finucane., A. Cronister., L. Gane., S. Coffey., S. Sherman., L. Nelson., E. Berry-Kravis., D. Hessler., S. Chiu., N. Street., A. Vatave & R. Hagerman. 2007. Recommendations from multi-disciplinary focus groups on cascade testing and genetic counseling for fragile X- associated disorders. *J. Genet. Counsel.* 16: 593-606.

Menon, R. & A. Pastore. 2003. One, no-one and one hundred thousand: mRNA binding by the Fragile X Syndrome protein. *ELS gazette* 15: 1-4.

Mirkin, S. 2007. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 447: 932-940.

Nolin, S.L., W.T. Brown, A. Glicksman *et al.* 2003. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 454- 464.

O' Donnell, W.T. & S. T. Warren. 2002. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu. Rev. Neurosci.* 25: 315- 338.

Oostra, B.A. & R. Willemsen. 2001. Diagnostic tests for fragile X syndrome. *Expert. Rev. Diagn.* 1 (2): 89- 95.

Oostra, B.A. & P. Chiurazzi. 2001. The fragile X gene and its function. *Clin. Genet.* 60: 399- 408.

Oostra, B.A. 2002. Functions of the fragile X protein. *Trends Mol. Med.* 8 (3): 102- 103.

Oostra, B.A. & R. Willemsen. 2002. The X chromosome and fragile X mental retardation. *Cytogenet Genome Res.* 99: 257- 264.

Oostra, B.A. & R. Willemsen. 2003. A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum. Mol. Genet.* 12 (2): R249- R257.

- Pearson CE, Eichler EE, Lorenzetti D, Kramer SF, Zoghbi HY, et al. 1998. Interruptions in the triplet repeats of SCA1 and FRAXA reduce the propensity and complexity of slipped strand DNA (S-DNA) formation. *Biochemistry* 37:2701–2708.
- Penagarikano, O., J. Mulle & S. Warren. 2007. The pathophysiology of fragile X syndrome. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 8: 109-129.
- Pembrey, M.E, A.J. Barnicoat, B. Carmichael, M. Bobrow & G. Turner. 2001. An assessment of screening strategies for fragile X syndrome in the UK. *Health Technol. Assess.* 5: 29- 45.
- Plante, I. & P. Provost. 2006. Hipótesis: a role for Fragile X Mental Retardation Protein in mediating and relieving microRNA- guided translational repression? *J. Biomed. Biotech.* 1-7.
- Plante, I., Davidovic, L., Ouellet, D. *et al.* 2006. Dicer- derived microRNAs are utilized by the Fragile X Mental Retardation Protein for assembly on target RNAs. *J. Biomed. Biotech.* 1-12.
- Pozdnyakova, I. & L. Reagan. 2005. New insights into Fragile X syndrome. Relating genotype to phenotype at the molecular level. *FEBS J.* 272: 872-878.
- Richards, R. 2001. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum. Mol. Genet.* 10 (20): 2187- 2194.
- Rousseau, F., D. Heitz, V. Biancalana, S. Blumenfeld, C. Kretz, J. Boue, N. Tom-merup, C. Hagen, C. Delozier-Blanchet, M. Croquette, S. Gilgen-krants, P. Jalbert, M. Voelckel, I. Oberle & J. Mandel. 1991. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med.* 325: 1673–1681.

Schaeffer, C., M. Beaulande, C. Ehresmann, B. Ehresmann & H. Moine. 2003. The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol. Cell.* 95: 221- 228.

Shah, P. M. 1991. Prevention of mental handicaps in primary health care. *WHO Bulletin OPS.* 69: 779- 789.

Sherman, S., P. Jacobs, N. Morton, U. Froster- Iskenius, P. Howard- Peebles, K. Nielsen, N. Partington, G. Sutherland, G. Turner & M. Watson. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 69: 3289- 3299.

Siomi, H., Ishizuka, A. & M. Siomi. 2004. RNA interference: a new mechanism by which FMRP acts in the normal brain? What can *Drosophila* teach us? *Mental Retardation and Develop. Disabilities Res. Rev.* 10: 68-74.

Song, F.J., P. Barton, V. Sleightholme, G. L. Yao & A. Fry- Smith. 2003. Screening strategies for fragile X syndrome: a literature review and modeling study. *Health Technol. Assess.* 7: 21- 43.

Sutherland, G.R. 1977. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science.* 197: 265- 266.

Tassone, F., R.J. Hagerman, W.D. Chamberlain & P.J. Hagerman. 2000. Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet* 97: 195- 203.

Todd, P.K & J.S. Malter. 2002. Fragile X mental retardation protein in plasticity and disease. *J. Neurosci. Res.* 70: 623- 630.

- Toledano-Alhadeff, H., L. Basel-Vanagaite, N. Magal, B. Davidov, S. Ehrlich & V. Drasinover. 2001. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 351–60.
- Turner, G., T. Webb, S. Wake & H. Robinson. 1996. Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 64: 196- 197.
- Turner, G., H. Robinson, S. Wake, S. Laing & M. Partington. 1997. Case finding for the fragile X syndrome and its consequences. *BMJ.* 315:1223–6.
- Van Esch, H. 2006. The fragile X premutation: new insights and clinical consequences. *Europ. Journal. Med. Genet.* 49: 1-8.
- van Rijn, M. A, B.B de Vries, A. Tibben, A. M. van den Ouweland, D. J. Halley & M.F. Niermeijer. 1997. DNA testing for fragile X syndrome: implications for parents and family. *J. Med. Genet.* 34: 907–11.
- Wan, L., T.C. Dockendorff, T.A. Jongens & G. Dreyfuss. 2000. Characterization of dFMR1, a *Drosophila melanogaster* homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol. Cell Biol.* 20: 8536- 47.
- White, P.J., Borts, R.H. & M. C. Hirst. 1999. Stability of the human fragile X (CGG)<sub>n</sub> triplet repeat array in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in aspects of DNA metabolism. *Mol. Cell Biol.* 19:5675–5684.
- Wildhagen, M.F., T.A.M van OS, J. Polder, L. Ten Kate & J. Habbema. 1998. Explorative study of costs, effects and savings of screening for female fragile X premutation and full mutation carriers in the general population. *Community Genet.* 1: 36- 37.

Willemsen, R., S. Mohkamsing, B. de Vries, D. Devys, A. van den Ouweland, J.L. Mandel, H. Galjaard & B. Oostra. 1995. Rapid antibody test for fragile X syndrome. *Lancet*. 345: 1147- 1148.

Willemsen, R., A. Smits, S. Mohkamsing, H. van Beerendonk, A. de Haan, B. de Vries, A. van den Ouweland, E. Sistermans, H. Galjaard & B.A. Oostra. 1997. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique. *Hum. Genet.* 99: 308-311.

Willemsen, R., B. Anar, Y. de Diego Otero, B. de Vries, Y. Hilhorst- Hofstee, A. Smits, E. van Loveren, P. Willems, H. Galjaard & B.A. Oostra. 1999. Noninvasive test for fragile X syndrome, using hair root analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 98- 103.

Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. & C. Bagni. 2003. The Fragile X syndrome protein FMRP associates with *BCI* RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112: 317-327.

#### **Referencia de internet**

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Fragile X syndrome (309550). (Descargado : Junio 24, 2002. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim))

Warren, S.T. 1997. Trinucleotide repetition and fragile X syndrome. *Hospital Practice*. Emory University. (Descargado: Mayo 05, 2003. ([www.hosppract.com/genetics/9704gen.htm](http://www.hosppract.com/genetics/9704gen.htm))).

**Anexo 1**

**Universidad de Costa Rica**

**Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)**

**Ficha de recolección de datos de la persona a tamizar**

Fecha \_\_\_\_\_ Código \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

—

Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ # asegurado/cédula \_\_\_\_\_

Nombre del padre/madre/encargado \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_ Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Institución a la que asiste \_\_\_\_\_

Profesional que lo atiende \_\_\_\_\_

Diagnóstico/s que justifica sea atendido en esa institución \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

¿ tiene un hermano o hermana con el mismo diagnóstico?      SI      NO      ¿?

¿ otros miembros de su familia tienen el mismo diagnóstico?      SI      NO      ¿?

¿ Presenta alguna de las siguientes características ?

	SI Puntaje 2	NO Puntaje 0	+/- puntaje 1
Antecedentes familiares de retardo mental			
Testículos grandes			
Orejas grandes o prominentes			
Pliegue único en la palma de la mano			
Pliegue en la planta del pie			
Articulaciones hiperextensibles			
Retardo mental			
Hiperactividad			
Periodos de atención muy cortos			
Le molesta el contacto físico			
Aleteo de las manos			
Mordisqueo de las manos			
No establece contacto visual ojo a ojo			
Repite continuamente palabras o frases			
Puntaje total =			

## Anexo 2

### Universidad de Costa Rica Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

#### Fórmula de consentimiento

##### Tamizaje del síndrome del cromosoma X frágil en poblaciones seleccionadas

Código o número de protocolo\_\_\_\_\_

Nombre del investigador principal\_\_\_\_\_

Nombre del participante\_\_\_\_\_

**A. PROPÓSITO DEL ESTUDIO:** las doctoras Isabel Castro, Patricia Cuenca y la Ing. Rebeca Vindas del INISA, desean encontrar a las personas que padecen el síndrome del cromosoma X frágil, para de este modo poder entrar en contacto con las familias de estas personas y estudiar cuáles miembros de la familia no padecen la enfermedad pero la pueden transmitir a sus hijos e hijas; es decir, cuáles miembros de la familia son portadores. Este síndrome es la causa más común de retardo mental hereditario a nivel mundial. Los individuos afectados se caracterizan principalmente por tener una cara alargada, orejas grandes, problemas del lenguaje, engrandecimiento de los testículos en el caso de los varones, problemas conductuales y de aprendizaje. Debido a que el síndrome del cromosoma X frágil es una enfermedad hereditaria varios miembros de una misma familia pueden verse afectados. Por tanto, la identificación de portadores y portadoras es muy importante pues se podría prevenir el nacimiento de más personas afectadas, a través del asesoramiento genético.

Para llevar a cabo esta investigación es necesario contar con la participación de personas ya diagnosticadas, por medio de técnicas moleculares, con la enfermedad. Es decir la

participación de individuos como controles positivos para FRAXA contribuirá a la fidelidad de los resultados de la presente investigación.

**B. ¿QUE SE HARÁ?:** si acepto participar en este estudio, se me realizará lo siguiente: se me va a tomar aproximadamente una cucharada de sangre y se me van a arrancar 20 cabellos de la cabeza

**C. RIESGOS:** la participación en este estudio puede significar cierta molestia para mí pues la punzada y la extracción de los cabellos pueden ser un poco dolorosas. Si sufriera algún daño como consecuencia de los procedimientos a los que seré sometido para el estudio, las investigadoras me brindarán el tratamiento necesario para mi total recuperación. Los costos de este tratamiento serán cubiertos por el Instituto Nacional de Seguros, mediante el seguro infantil.

**E.** He hablado con \_\_\_\_\_ sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la Dra. Isabel Castro, a la Dra. Patricia Cuenca o a la Ing. Rebeca Vindas a los teléfonos 224- 3668 ó 207- 3148 del INISA. Además, puedo consultar al Ministerio de Salud al 223- 2612 sobre los Derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación o a la Vicerrectoría de Investigación de la UCR al 207- 5844 ó 207- 5845.

**F.** Recibiré una copia firmada de esta fórmula para mi uso personal.

**G.** Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo el derecho de negarme a participar o a interrumpir mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiero.

**H.** Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de manera anónima.

**I.** No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

**J.** Las muestras obtenidas para esta investigación podrán transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

### **CONSENTIMIENTO**

Yo he leído, o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

---

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores de 12 años y adultos). Fecha

---

Nombre, cédula y firma del testigo. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del investigador que solicita el consentimiento. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del padre/madre/representante legal (menores de edad). Fecha

### Anexo 3

## Universidad de Costa Rica Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

### Fórmula de consentimiento para ser sujeto de investigación 2

#### Tamizaje del síndrome del cromosoma X frágil en poblaciones seleccionadas

Código o número de protocolo\_\_\_\_\_

Nombre del investigador principal\_\_\_\_\_

Nombre del participante\_\_\_\_\_

- A. PROPÓSITO DEL ESTUDIO:** las doctoras Isabel Castro, Patricia Cuenca y la Ing. Rebeca Vindas, necesitan confirmar la sospecha de que usted padece el síndrome del cromosoma X frágil. Es decir, el estudio de la sangre y de los cabellos que realizamos hace unos meses, nos indica que usted podría tener este síndrome. Para asegurarnos que realmente sí lo tiene, es necesario realizar otro examen que es el definitivo, pero que por su alto costo, no se puede ofrecer a todas las personas sino solamente a las que tienen más probabilidad de padecerlo. Si comprobamos que realmente usted tiene el síndrome del cromosoma X frágil, podemos estudiar a otros familiares suyos interesados en saber si existe la posibilidad de heredar a sus hijos o a sus hijas este mismo problema. De esta manera las personas portadoras en su familia recibirán asesoramiento genético con el fin de ayudarlos a tomar mejor sus decisiones referentes a su reproducción, es decir, al momento de pedir familia.
- B. ¿QUE SE HARÁ?:** si acepto participar en este estudio, se me realizará lo siguiente: se me tomará una muestra de aproximadamente una cucharada de sangre de la vena del pliegue del brazo, con una jeringa nueva y desechable. Esta extracción de sangre podría

tener que repetirse si la primera muestra se malograra o para confirmar posibles resultados dudosos.

**C. RIESGOS:** la participación en este estudio puede significar cierta molestia para mí pues la punzada puede ser un poco dolorosa o se me puede formar un “cardenal” en la zona de punción. Si sufriera algún daño como consecuencia de los procedimientos a que seré sometido para el estudio, las investigadoras me brindarán el tratamiento necesario para mi total recuperación. Los costos de este tratamiento serán cubiertos por el Instituto Nacional de Seguros, mediante el seguro estudiantil.

**D. BENEFICIOS:** como resultado de mi participación en este estudio, el beneficio que obtendré será:

a. Poder confirmar la sospecha de que la causa de mis problemas de retardo o de aprendizaje es el síndrome del cromosoma X frágil.

b. Se podrá prevenir el nacimiento de más personas con retardo mental en mi familia, a través de la información que recibirán mediante asesoramiento genético, las personas de mi familia que resulten portadoras.

**E.** He hablado con la investigadora \_\_\_\_\_ sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la Dra. Isabel Castro, a la Dra. Patricia Cuenca o a la Ing. Rebeca Vindas a los teléfonos 224- 3668 ó 207- 3148 del INISA. Además, puedo consultar al Ministerio de Salud al 223- 2612 sobre los Derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación o a la Vicerrectoría de Investigación de la UCR al 207- 5844 ó 207- 5845.

**F.** Recibiré una copia firmada de esta fórmula para mi uso personal.

**G.** Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo el derecho de negarme a participar o a interrumpir mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiero.

**H.** Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de manera anónima.

**I.** No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

**J.** Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

### **CONSENTIMIENTO**

Yo he leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

---

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores de 12 años y adultos). Fecha

---

Nombre, cédula y firma del testigo. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del investigador que solicita el consentimiento. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del padre/madre/representante legal (menores de edad). Fecha

## Anexo 4

### Universidad de Costa Rica Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

#### Fórmula de consentimiento para ser sujeto de investigación 2.1

##### Tamizaje del síndrome del cromosoma X frágil en poblaciones seleccionadas

Código o número de protocolo \_\_\_\_\_

Nombre del investigador principal \_\_\_\_\_

Nombre del participante \_\_\_\_\_

**A. PROPOSITO DEL ESTUDIO:** la médico Dra. Isabel Castro, investigadora del INISA, desea conocer más acerca del síndrome del cromosoma X frágil que usted padece y de qué manera afecta su salud. Para lograr esto es necesario hacer un examen físico completo y hacer mediciones de algunas partes de su cuerpo como las orejas, lo mismo que tomar algunas fotografías.

**B. ¿QUE SE HARA?:** si acepto participar en este estudio, se me realizará un examen físico completo que comprende la cabeza, el cuello, el tórax, el abdomen, los miembros superiores e inferiores y los genitales en caso de que yo sea varón, para comparar el tamaño de mis testículos con el tamaño correspondiente al del orquidómetro que se me mostró. También se le harán preguntas a mis padres acerca de mis enfermedades pasadas y actuales y acerca de mi desarrollo para hacer una historia clínica.

**C. RIESGOS:** la participación en el examen físico puede resultarme incómoda, pero este no representa ningún peligro para mi salud.

**D. BENEFICIOS:** a través del examen físico se podrían descubrir condiciones médicas que podrían afectar mi salud, como el prolapso de la válvula mitral del corazón, que es una alteración relativamente frecuente en las personas con el síndrome del

cromosoma X frágil. En caso de que sea necesario, la Dra. Castro se compromete a conseguir que sea tratado por cualquier problema médico que se me encuentre, en el hospital de la CCSS que corresponda.

**E.** He hablado con la Dra. Isabel Castro sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a Isabel Castro o a Patricia Cuenca al número de teléfono 224-3668 o 207-3148. Además, puedo consultar al Ministerio de Salud al 223-2612 sobre los Derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación, o a la Vicerrectoría de Investigación de la U.C.R. a los teléfonos 207-5844 ó 207-5845.

**F.** Recibiré una copia firmada de esta fórmula para mi uso personal.

**G.** Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo el derecho de negarme a participar o a interrumpir mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiero.

**H.** Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de manera anónima.

**I.** No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

**J.** Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

### **CONSENTIMIENTO**

Yo he leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas

en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

---

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores que 12 años y adultos). Fecha

---

Nombre, cédula y firma del testigo. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del investigador que solicita el consentimiento. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del padre/madre/representante legal (menores de edad). Fecha

## Anexo 5

### Universidad de Costa Rica Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

#### Fórmula de consentimiento para ser sujeto de investigación 3

##### Tamizaje del síndrome del cromosoma X frágil en poblaciones seleccionadas

Código o número de protocolo \_\_\_\_\_

Nombre del investigador principal \_\_\_\_\_

Nombre del participante \_\_\_\_\_

**A. PROPOSITO DEL ESTUDIO:** las doctoras Isabel Castro, Patricia Cuenca y la Ing. Rebeca Vindas del INISA, han determinado que una persona de su familia padece el síndrome del cromosoma X frágil. Debido a que ésta es una enfermedad hereditaria, en la cual otras personas de la familia pueden ser sanas pero capaces de transmitir el problema a sus hijos o hijas, queremos investigar si usted es una de esas personas llamadas también portadoras. La prevención primaria del síndrome consiste en evitar el nacimiento de más personas afectadas Si usted resultara portadora, recibirá asesoramiento genético de parte nuestra, con el fin de que pueda utilizar la información que le daremos para tomar las decisiones más adecuadas para usted y su pareja a la hora de pedir familia, según su percepción de riesgo, creencias morales, religiosas y sus intereses personales.

**B. ¿QUE SE HARA?:** si acepto participar en este estudio, se me realizará lo siguiente: se me tomará una muestra de aproximadamente una cucharada de sangre de la vena del pliegue del brazo, con una jeringa nueva y desechable. Esta extracción de sangre podría tener que repetirse si la primera muestra se malograra o para confirmar posibles resultados dudosos.

**C. RIESGOS:** Mi participación en este estudio puede significar cierta molestia transitoria pues la punzada puede ser un poco dolorosa o se me puede formar un "cardenal" en la zona de la punción

**D. BENEFICIOS:** como resultado de mi participación en este estudio, me veré beneficiado por dos razones principales:

1. Se podrá determinar con certeza si soy o no una persona portadora del síndrome del cromosoma X frágil.
2. Se podrá prevenir el nacimiento de más personas con retardo mental en mi familia, a través de la información que recibiremos mediante asesoramiento genético, yo y las demás personas de mi familia que resulten portadoras.

**E.** He hablado con la investigadora \_\_\_\_\_ sobre este estudio y me ha contestado todas mis preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la Dra. Isabel Castro, a la Dra. Patricia Cuenca o a la Ing. Rebeca Vindas al número de teléfono 224-3668 ó 207-3148. Además, puedo consultar al Ministerio de Salud al 223-2612 sobre los Derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación, o a la Vicerrectoría de Investigación de la U.C.R. a los teléfonos 207-5844 ó 207-5845.

**F.** Recibiré una copia firmada de esta fórmula para mi uso personal.

**G.** Mi participación en este estudio es voluntaria. Tengo el derecho de negarme a participar o a interrumpir mi participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiero.

**H.** Mi participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de manera anónima.

**I.** No perderé ningún derecho legal por firmar este documento.

**J.** Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

### **CONSENTIMIENTO**

Yo he leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

---

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores que 12 años y adultos). Fecha

---

Nombre, cédula y firma del testigo. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del investigador que solicita el consentimiento. Fecha

---

Nombre, cédula y firma del padre/madre/representante legal (menores de edad). Fecha

## Anexo 6

### **Método indirecto de la inmunoperoxidasa para la detección de FMRP en frotis de sangre con el kit Zymed Histostain- Plus (Zymed 85- 9143)**

1. El frotis de sangre debe hacerse con tan solo una gota en un portaobjeto limpio y secos. Se harán al menos 5 réplicas por sujeto. El frotis puede permanecer a temperatura ambiente por diez días o almacenarse a  $-80^{\circ}$  C hasta por 1.5 años. Para el tratamiento de la muestra se descongelan los frotis aplicando aire frío para secar el área donde se encuentran las células.
2. Se realiza la fijación de las células con paraformaldehído al 3% (Buffer Sörrensen) por 10 min.
3. Se permeabilizan las muestras con metanol al 100% por 20 min.
4. Se lava con TBS 0.1 M por 5 min.
5. Se bloquea la actividad de la peroxidasa endógena con PBS- BLOCK por 30 min. (PBS- BLOCK: 100ml de PBS 0.1 M + 2ml de  $H_2O_2$  al 30%).
6. Se hacen tres lavados de 5 min c/u con TBS+ (TBS+: TBS 0.1 M+ 0.5% de Tween 20 + 0.15% de glicina).
7. Se agrega 100 $\mu$ l de una dilución de 1: 1500 del anticuerpo monoclonal anti- FMRP 1C3- 1a (CHEMICON MAB2160) a c/u de los portaobjetos. La incubación se hace por 1h a temperatura ambiente. Las diluciones de todos los anticuerpos se hacen con el diluyente de DAKO (S3022). Se repite el paso 6.
8. Se incuban los portaobjetos con dos gotas de anticuerpo secundario (Biotinylated link universal DAKO K0690) por 20min. Se repite el paso 6.

9. Se lleva a cabo una tercera incubación por 20 min con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP) (Streptavidin-HRP de DAKO K0690). Se utilizan dos gotas por portaobjeto.
10. Se hacen cuatro lavados con TBS+ de 5 min c/u.
11. Se lava con TBS 0.1 M por 5 min.
12. Se adicionan 100µl del sustrato cromógeno DAB (DAKO K3465) a temperatura ambiente por 15 min. Se usa una solución de trabajo de 20µl de DAB por 1ml de buffer.
13. Se lava en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> por 5 min.
14. Se contratiñe con Nuclear Fast Red (DAKO S1963) por 2 min.
15. Se deshidratan los portaobjetos en etanol al 80%, 95%, 100%, 100% (contaminados) seguido por dos deshidrataciones en etanol al 100% pero en solución limpia de 2s c/u. Por último se colocan en xilol por unos segundos, y nuevamente en solución de xilol por un poco más de tiempo.
16. Se procede a realizar el montaje con Entellan y se coloca un cubreobjeto evitando la formación de burbujas. Se deja secar durante toda la noche a temperatura ambiente
17. Se observa al microscopio en el aumento de 100X. Se analizan 100 linfocitos por individuo. En los individuos no afectados se observa un precipitado café en el citoplasma y en los afectados no hay coloración café indicando la ausencia de la proteína.

**Método indirecto de la fosfatasa alcalina para detectar la expresión de FMRP en  
cabellos**

1. Se colectan con una pinza 20 cabellos de diferentes áreas detrás de la oreja por individuo. Se observan en el microestereoscopio para garantizar la presencia de la raíz. Los pelos deben ser cortados antes de iniciar el tratamiento. Pueden ser almacenados por 7 días después de la recolección a temperatura ambiente o congelarse a -80° C.

2. Se colocan los cabellos en tubos para microcentrífuga. Se adiciona paraformaldehído al 3% por 10 min para la fijación.
3. Se remueve el paraformaldehído y se agrega metanol al 100% por 20 min.
4. Se lava con TBS 0.1M por 1 min.
5. Se lava con TBS+ por 5 min
6. Incubación con el anticuerpo monoclonal anti- FMRP clon 1C3- 1a, a partir de una dilución de 1: 1500. La incubación puede hacerse durante toda la noche a 4° C, si los cabellos fueron almacenados a temperatura ambiente por varios días, o por 1.5h a temperatura ambiente en el caso de muestras frescas.
7. Se enjuaga con tres lavados de TBS+ por 5 min c/u.
8. Se incuba con el anticuerpo secundario biotinilado (MOUSE- LINK de BIOGENEX ZA000- UM) a una dilución de 1:50 por 1 h. Se repite el paso 7.
9. Se incuba con Estreptavidina<sup>AP</sup> a una dilución de 1:50 por 1h. Se repite el paso 7.
10. Se hace un lavado con TBS 0.1M por 5 min seguido de un lavado con Tris 0.1M por 5 min.
11. Se agrega el sustrato cromógeno New Fuchsin Red (DAKO K0624) por 2 min (8µl de cromógeno + 8µl de reactivo activador, se espera por 2 min hasta que se observen burbujas, + 0.666 ml de buffer). Se adicionan 2µl de levamisol para bloquear la actividad fosfatasa alcalina endógena.
12. Se lava dos veces con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
13. Se examinan los cabellos en el estereomicroscopio. Los cabellos con coloración roja indican la expresión de la proteína.
14. Se puede hacer un montaje con medio acuoso en portaobjetos para preservar la preparación.

## **Anexo 7**

### **Extracción de ADN a partir de sangre periférica.**

1. La muestra de sangre se vacía en un tubo cónico de 50 ml y se le agregan 30 ml de buffer de lisis. Se mezcla. Se incuba en hielo por 30 minutos. Se centrifuga 10 min./1200rpm/4 °C.
2. Se verifica el botón de leucocitos. Se descarta el sobrenadante. Se añaden 10 ml de buffer de lisis. Se disuelve el botón de leucocitos y se centrifuga nuevamente 10 min./1200rpm/4 °C.
3. Se descarta el sobrenadante. Se añaden 5 ml de buffer SE y se disuelve el botón de leucocitos. Se centrifuga 10 min./1200rpm/4 °C.
4. Se descarta el sobrenadante. El botón se puede guardar a -70 °C o continuar con: añadir 5 ml de buffer SE. Se disuelve el botón de leucocitos. Se le agregan 40 µl de proteinasa K. Se mezcla y añaden 250 µl de SDS 20%. Se mezcla e incuba en baño maría a 37 °C toda la noche.
5. Se añaden 5 ml de buffer SE, 10 ml de fenol equilibrado. Se mezcla 10 minutos. Se centrifuga 5min/3000rpm/10 °C.
6. Se transfiere la fase superior a otro tubo cónico. Se añaden 5 ml de cloroformo:isoamílico, 5 ml de fenol equilibrado. Se mezcla 10 minutos. Se centrifuga 5min/3000rpm/10 °C.
7. Se transfiere la fase superior a otro tubo cónico. Se añaden 10 ml de cloroformo:isoamílico. Se mezcla por 10 minutos. Se centrifuga 5min/3000rpm/10°C.
8. Se transfiere la fase superior a otro tubo cónico. Se añaden 300 µl de acetato de sodio. Se mezcla. Se agregan 2 volúmenes y medio de alcohol absoluto. Se agita el tubo

hasta que el ADN precipite. Se saca el ADN con pipeta Pasteur, luego se enjuaga el ADN en etanol al 70 % y se disuelve en TE (de 0.5 a 1ml). Finalmente se deja disolver toda la noche.

**Buffer de lisis, pH: 7.4 :** NH<sub>4</sub>Cl 8.29g, KHCO<sub>3</sub> 1.00g, EDTA 200μl (0.5M)

**Buffer SE, pH:8.0 :** NaCl (75mM) 4.39g, Na<sub>2</sub>EDTA (25mM) 8.41g

**SDS 20% :** 20g, 100 ml H<sub>2</sub>O

**Proteinasa K :** 10mg, 1ml H<sub>2</sub>O

**Acetato de Sodio 3M, pH: 5.2:** 24.61 g, 100ml H<sub>2</sub>O

**Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1):** 240 ml Cloroformo, 10 Alcohol Isoamílico

## Anexo 8

### Montaje del blot e hibridación con la sonda

1. Poner el gel en solución depurinizante por 20 minutos, y enjuagar en agua destilada.
2. Poner el gel en solución desnaturalizante por 1 h, y enjuagar en agua destilada.
3. Colocar el gel sobre un vidrio plano y colocar una membrana de nylon de 20x20 sobre el gel. Colocar 4 piezas de papel filtro de 20x20 sobre la membrana y un grupo de papel absorbente. Colocar otro vidrio sobre el papel absorbente y un peso extra sobre el plato de vidrio y dejarlo toda la noche.
4. Desmontar el blot, lavar la membrana y hornearla por 2 h a 80 °C.
5. Poner a prehibridar la membrana en solución de pre-hibridación (20 ml) por al menos dos horas a 65 °C. La sonda STb12.3 se marca usando fósforo radiactivo.
6. Poner a hibridar la membrana toda la noche a 65 °C, no es necesario cambiar la solución de pre-hibridación.
7. Lavar las membranas en:
8. 2X SSC, 1% SDS por 30' a 65 °C
9. 1X SSC, 0.1 % SDS por 15' a 65 °C
10. 0.1X SSC, 0.1 % SDS por 20' a 65 °C.
11. 2X SSC por 2' a temperatura ambiente
12. Envolver las membranas en plástico adhesivo y exponerlas a una película autorradiográfica por una semana a -70 °C.
13. Revelar las películas poniéndolas 5 minutos en Revelador GBX Kodak, 2 minutos en Acido acético al 3% y 5 minutos en fijador GBX Kodak.
14. Estimar el tamaño de la amplificación por comparación con el marcador de peso molecular.

**Buffer TBE 1X (1L)**

Tris Base 10.8 g

Acido Bórico 5.5 g

**Solución depurinizante 1L (HCL, 0.25 M)**

EDTA 0.95g

21 ml HCl

**Solución desnaturizante 1L (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)**

NaOH 20g y NaCl 87g

**Solución 6X SSC 1L, pH: 7.0**

NaCl 52.56g y Citrato de Sodio 26.46g

**Solución de pre-hibridación:**

2.5X SSC: 1.5ml (20X SSC)

0.1% SDS: 1ml (20% SDS)

10% Denhardts: 1ml (100X, 0.2 g Ficoll, 0.2g Pílvilpirrolidona, 0.2g BSA)

10% Dextrán Sulfato: 1g

Hearing Sperm (50µg/ml): 200µl (100mg/ml)

H<sub>2</sub>O destilada: 16.3ml

## Anexo 9

### Protocolo para geles de poliacrilamida

1. Limpiar los vidrios con etanol y el vidrio pequeño se siliconiza.
2. Armar con los respectivos espaciadores y sellar bien con cinta adhesiva. El vidrio pequeño debe quedar bien ajustado a las esponjas.
3. Preparar solución al 30% de acrilamida y 0.8% bisacrilamida en agua. A partir de esta solución preparar otra que quede 6% de poliacrilamida y 7M de ureasa.
4. Tomar 70 ml de la solución poli+ureasa, 490  $\mu$ l de APS al 10% (persulfato de amonio) y 35  $\mu$ l de TEMED (N,N,N,N-tetramethyl-ethylenediamine) y mezclar en un agitador magnético.
5. Montar el gel inmediatamente deslizando la solución entre los vidrios con una jeringa de 50 ml. Poner prensas sobre el vidrio. Dejar toda la noche, envolviéndolo con un plástico humedecido para evitar la desecación.
6. Precalentar el gel hasta que alcance 50°C, después de instalar los vidrios en la cámara de electroforesis.
7. Las muestras se desnaturalizan por 5min a 95°C y se cargan los productos con azul de bromofenol y un marcador de peso molecular.

#### **Solución de acrilamida (100 ml) 30%:**

Acrilamida 30g

Bis-acrilamida 0.8g

#### **Gel de acrilamida 6%:**

70 ml Sol. Acrilamida + 35  $\mu$ l TEMED + 490  $\mu$ l APS 1%

## **Anexo 10**

### **Protocolo de Tinción con plata**

#### ***Solución Fijadora***

1. Se mezclan 75 ml de etanol al 95% con 4.0 ml de ácido acético y se lleva a 750 ml con agua.
2. Se agrega esta solución fijadora a una bandeja, se sumerge el gel en ella y se agita por 20 min.
3. Se guarda un poco de la solución fijadora y se descarta el resto.
4. Se hacen 3 lavados de 2 min. cada uno con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>).

#### ***Solución de plata***

5. Se disuelve 1 g de nitrato de plata en 1000 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
6. Se le agregan 1500 µl de formaldehído y se guarda la solución en un sitio oscuro.
7. Se agrega la solución a la bandeja con el gel y se agita por 30 min.
8. Se descarta.
9. Se hace un lavado con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> por 10 segundos para eliminar el exceso de plata.

#### ***Solución Reveladora***

10. Se disuelven 15 g de NaOH en 1000 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se deja enfriar durante ~30 min.
11. Previo a usarla se añaden 1500 µl de formaldehído y se agrega a la bandeja con el gel.
12. Se agita hasta que aparezcan las bandas.
13. Se agrega la solución fijadora que se había guardado y se deja por 2-3 min. con el fin de detener la reacción y luego se descarta.
14. Se hacen 2 lavados de 2 min. cada uno con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se pone a secar.