

# Estudio de la proteína FMRP en la raíz de cabello: aplicación al diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil

M. Rifé Soler<sup>a,b</sup>, A. Sánchez Díaz<sup>a,b</sup>, F. Ramos<sup>c</sup> y M. Milà Recasens<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Genética. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic. Barcelona. España.

<sup>b</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Cátedra de Pediatría. Universidad de Zaragoza. España.

## Introducción

El síndrome del cromosoma X frágil (SFX) es la causa más común de retraso mental hereditario. La ausencia de la proteína FMRP, codificada por el gen *FMR1*, es responsable del fenotipo X frágil. Los métodos de diagnóstico habituales detectan la expansión de la región CGG del gen, la mutación más recurrente en estos pacientes. Las técnicas de detección inmunohistoquímicas detectan todas las mutaciones que dan lugar a ausencia de proteína FMRP. Este test, aplicado a raíces de cabello, tiene una buena correlación con el coeficiente intelectual de hombres y mujeres afectados.

## Pacientes y métodos

Se ha estudiado la presencia de proteína FMRP mediante técnicas inmunohistoquímicas a un grupo de individuos control para establecer la correlación con su estatus mutacional respecto a la expansión CGG de *FMR1* y, posteriormente, se han estudiado 65 niños y niñas con retraso mental de escuelas especiales.

## Resultados

Los varones y mujeres caracterizados molecularmente en el rango normal y de la premutación presentaron expresión de proteína FMRP en más del 70 % de las raíces de cabello. Los portadores de la mutación completa presentaron expresión en un porcentaje inferior al 70 %. El estudio inmunohistoquímico de niños y niñas con retraso mental permitió la detección de un varón afectado de SFX.

## Conclusiones

La prueba inmunohistoquímica para la detección de la SFX en la raíz de cabello es apropiada para el cribado de poblaciones por la baja invasividad de la técnica de obtención de la muestra, y por su rapidez y facilidad, así como para ser aplicada en la práctica clínica habitual.

## Palabras clave:

*Síndrome de fragilidad del cromosoma X. FMRP. Raíz del cabello.*

## FMRP IMMUNODETECTION ON HAIR ROOTS: APPLICATION TO THE DIAGNOSIS OF FRAGILE X SYNDROME

### Introduction

Fragile X syndrome is the most common inherited form of mental retardation. The absence of FMRP protein, codified by the *FMR1* gene, results in fragile X phenotype. DNA-based diagnostic methods determine the length of the CGG repeat within the *FMR1* gene, the main mutation causing the syndrome. Immunohistochemical diagnostic tests detect all mutations leading to the absence of FMRP expression. Results of the antibody test on hair roots correlate with intellectual quotient in affected men and women.

### Patients and methods

Immunohistochemical techniques were used to study FMRP expression in hair roots in a control group to establish the correlation with the length of the CGG repeat. Subsequently, 65 girls and boys with mental retardation attending special schools were screened by using the FMRP test on hair roots.

### Results

Males and females molecularly characterized as within the normal and premutated range expressed FMRP in more than 70 % of hair roots. Full mutation carriers expressed FMRP in less than 70 % of hair roots. Immunohistochemical studies in males and females with mental retardation led to the identification of one affected male.

*Correspondencia:* Dra. M. Milà Recasens.

Servicio de Genética. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic. Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.  
Correo electrónico: mmila@clinic.ub.es

Recibido en junio del 2003.

Aceptado para su publicación en julio de 2003.

## Conclusions

**Fragile X syndrome detection by immunohistochemical testing of hair roots is a valid method of population screening because of the relative noninvasiveness of obtaining samples, and the ease and rapidness of the technique, which can be applied to routine clinical practice.**

## Key words:

*Fragile X syndrome. FMRP. Hair root.*

## INTRODUCCIÓN

El síndrome del cromosoma X frágil (SFX) es la causa de retraso mental hereditario más común con una incidencia estimada en nuestra población de 1 de cada 2.466 varones y 1 de cada 8.333 mujeres<sup>1</sup>. El síndrome está causado, en el 98 % de los casos, por la expansión del triplete repetitivo CGG de la región 5' no traducida del gen *FMR1*. En la población general, el tracto repetitivo es polimórfico y varía entre 6 y 52 CGG; entre 53 y 200 repeticiones se habla de premutación, que es inestable a través de la transmisión materna y, finalmente, se habla de mutación completa cuando el número de tripletes es mayor de 200. Por encima de 200 repeticiones la región promotora del gen se hipermetila causando la represión de la transcripción<sup>2</sup>. La ausencia o déficit de la proteína codificada por el gen *FMR1* (FMRP) es responsable del fenotipo X frágil<sup>3</sup>.

La dificultad de un diagnóstico clínico<sup>4</sup> en el SFX hace necesario aplicar métodos de laboratorio ante cualquier retraso mental de etiología desconocida. Los métodos de diagnóstico habituales para la detección de pacientes con el SFX se basan en el estudio directo de la región repetitiva CGG del gen *FMR1*. La combinación de las técnicas de *Southern blot* y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la determinación del número exacto de repeticiones CGG y del patrón de metilación de la región promotora del gen. Son técnicas muy precisas y que permiten la determinación del estatus genético del individuo respecto al SFX. Estas metodologías sólo detectan la expansión, no otras mutaciones del gen *FMR1*.

En 1995, Willemsen et al<sup>5</sup> describieron un método de diagnóstico alternativo basado en la ausencia de expresión de FMRP en los linfocitos de los pacientes. Esta prueba inmunohistoquímica se aplicaba en extensiones de sangre en portaobjetos, e identificaba a los pacientes que no mostraban FMRP en el citoplasma de sus linfocitos. Las principales ventajas metodológicas de esta técnica son la rapidez y el estudio directo de la presencia de la proteína, con independencia del defecto molecular existente; detecta a los pacientes SFX, tanto con expansión del triplete CGG como cualquier otra mutación que provoque la ausencia de proteína FMRP. Estos últimos casos no son detectados mediante los análisis habituales de ADN. Los resultados iniciales demostraron que la técnica tenía un gran poder de diagnóstico en los varones, incluyendo los portadores de mosaicismo, pero el test resultó

ser menos específico para identificar mujeres con la mutación completa debido al proceso de inactivación de uno de sus cromosomas X durante las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. Algunas mujeres con la mutación completa tenían porcentajes de expresión de FMRP en los linfocitos que se solapaban con el rango de valores de las mujeres control, y el grado de retraso mental no se correlacionaba con el porcentaje de expresión de la proteína en este tejido<sup>6</sup>.

En 1999, el mismo grupo holandés<sup>7</sup>, con ánimo de mejorar las correlaciones entre los valores de cociente intelectual y el diagnóstico, tanto en varones como en mujeres, describió una nueva prueba inmunohistoquímica para detectar la expresión de la proteína FMRP en raíz de cabello. La elección de este tejido se debe a que las células epiteliales y el sistema nervioso derivan de la misma hoja embrionaria (ectodérmica) durante el desarrollo, de forma que la expresión observada en las células epiteliales debería reflejar mejor lo que ocurre en las neuronas.

En este artículo se ha aplicado dicha técnica para el cribado de SFX entre niños y niñas que acuden a escuelas de educación especial con el fin de probar el poder discriminatorio de ésta para poder aplicarla al diagnóstico del SFX.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se refirieron al servicio de genética para estudio de retraso mental 30 pacientes incluyendo los afectados de SFX y sus familiares (60 muestras en total) sirvieron de grupo control para ver la correlación entre el estatus genético respecto la SFX (normal, premutado o mutación completa) y la expresión de proteína FMRP.

Seenta y cinco niños y niñas de escuelas de educación especial con retraso mental y con diagnóstico. Para la realización de los estudios en pacientes y controles se obtuvo el consentimiento informado de los padres y/o tutores.

El estudio molecular de la región repetitiva CGG y del patrón de metilación de la región promotora se realizó mediante hibridación por *Southern blot* con la sonda STB12.3 después de una doble digestión *EcoRI/EagI*<sup>8</sup> y la PCR se realizó con los *primers* descritos por Fu et al<sup>9</sup>.

Para el estudio de la proteína FMRP se obtuvieron entre 15 y 20 cabellos con raíz de zonas distintas del cuero cabelludo. Las muestras fueron procesadas el mismo día o, como máximo, 2 días después de su obtención. El protocolo de inmunohistoquímica utilizado fue el descrito por Willemsen et al<sup>7</sup>. La expresión de proteína FMRP en las raíces de cabello se expresó en forma de porcentaje de raíces con proteína respecto al total de raíces examinadas. En cada uno de los experimentos se incluyó para estudio un control positivo.

A los 30 pacientes se les practicó el estudio molecular de la región repetitiva CGG del gen *FMR1* y el test inmunohistoquímico sobre la raíz del cabello. A los 65 alumnos de las escuelas, la prueba inmunohistoquímica, y

cuando éste salió negativo se procedió al estudio molecular. Después del estudio se revisaron los diagnósticos preexistentes para confirmación.

## RESULTADOS

Los pacientes varones con resultado normal para el estudio molecular de la zona repetitiva CGG del gen *FMRI* presentaron expresión de la proteína FMRP entre el 71 y el 100 % de raíces de cabello, los portadores de la premutación; entre el 75 y 91 % y los portadores de la mutación completa entre 0 y 40 %. Las mujeres con alelos dentro del rango normal de repeticiones presentaron entre 75 y 100 % de expresión, las portadoras de la premutación entre el 70 y 100 % y las 2 mujeres analizadas portadoras de la mutación completa expresan FMRP en el 44 y 68 % de raíces del cabello, respectivamente.

Los estudios de la proteína FMRP en la raíz del cabello realizados a los 65 niños y niñas con retraso mental de escuelas especiales, mostraron expresión positiva (entre el 70 y 100 % de raíces de cabello) en todos ellos, excepto un varón que mostró una expresión del 8 % de las raíces.

El estudio molecular de este varón puso de manifiesto una expansión de la zona repetitiva CGG correspondiente a una mutación completa, indicando que se trataba de un varón afectado de SFX.

Estos resultados se reflejan en la figura 1.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los pacientes referidos al servicio de genética permitieron establecer y confirmar que existe una buena correlación entre el estatus genético del individuo estudiado y la expresión de FMRP en raíz de cabello (fig. 1A). En los varones existe una separación muy clara de los porcentajes de expresión de proteína entre los portadores de la mutación completa y los normales, mientras que en mujeres la separación de valores de expresión respecto al estado del gen no está tan diferenciada.

Los varones normales y normales transmisores tienen valores de expresión superiores al 70 %.

Los varones con la mutación completa tienen una expresión de proteína muy inferior a los individuos normales y normales transmisores. Cabe destacar que los valores más altos de expresión encontrados en este grupo de pacientes (30 y 40 %) corresponde a 2 varones mosaico para la mutación completa y un alelo normal y una premutación, respectivamente.

En las mujeres con alelos normales y premutados, los rangos de expresión de FMRP son superiores al 70 %. Tan sólo se han estudiado dos mujeres portadoras de la mutación completa, por lo que del presente estudio no pueden extraerse conclusiones, pero tienen una expresión de FMRP de 44 y 68 %, respectivamente. Una de las pacientes (68 %) presentaba una expresión similar a la de las mujeres premutadas; una mujer casada con hijos y que

lleva una vida normal. El segundo caso (44 %) se trata de una niña que consulta por retraso mental; aunque el porcentaje de expresión de FMRP no sea muy bajo, en este caso impide una función cognitiva normal.

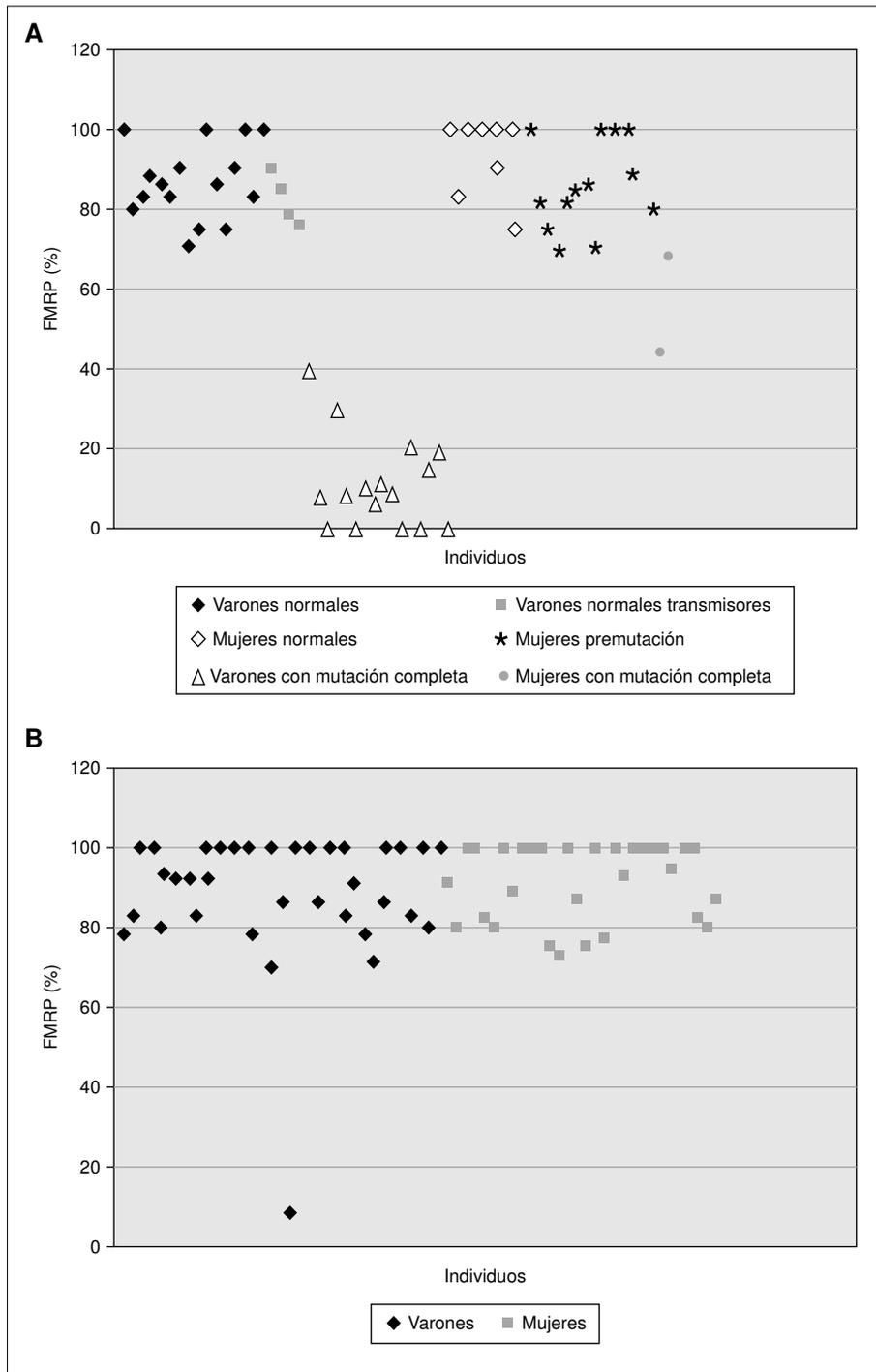
Los portadores y portadoras de la premutación, en conjunto, tienen valores de expresión ligeramente inferiores al de los normales, sin que podamos establecer diferencias claras.

El cribado inmunohistoquímico de 35 niños y 30 niñas con retraso mental de escuelas de educación especial permitió detectar 2 muestras de varones con el 8 y 10 % de expresión de FMRP en raíz de cabello, frente al control positivo (fig. 1B). El resto de muestras, tanto de niños como de niñas, presentaron valores de expresión superiores al 70 %. El estudio de la zona repetitiva CGG de los 2 niños con baja expresión de proteína permitió confirmar que uno de ellos (8 %, FMRP) era portador de la mutación completa. El otro niño (10 %, FMRP) presentaba un alelo normal, resultado que hizo sospechar la presencia de una mutación distinta a la expansión. Antes de realizar un cribado mutacional exhaustivo por todo el gen, se repitió el test de expresión (más rápido, fácil y económico). El segundo análisis inmunohistoquímico de una segunda obtención de muestra de este niño mostró una expresión de FMRP en el 70 % de raíces, dentro del rango de la normalidad. En este caso, la discordancia probablemente se deba a un problema técnico durante la realización de la inmunohistoquímica. Este falso positivo no disminuye la utilidad del test por su rapidez metodológica comparado con otras técnicas moleculares de diagnóstico de este síndrome.

Este estudio pone de manifiesto la utilidad de la técnica inmunohistoquímica aplicada a la raíz del cabello. Al estar el grupo de escolares formado por niños y niñas afectados de retraso mental de otras etiologías (síndrome de Down, síndrome de Angelman, etc.) permitió comprobar la especificidad del test para la detección de pacientes X frágil que presentan una reducción de FMRP en sus tejidos debido a un defecto molecular en el gen *FMRI*.

Otra de las ventajas de este método es la facilidad para obtener la muestra que no precisa de un experto, de manera que ya sean padres o profesionales (pediatras o neurólogos) pueden obtenerlas y remitirlas al laboratorio de genética dentro de un sobre por correo regular.

Los estudios publicados hasta el momento han mostrado la funcionalidad del test para detectar pacientes X frágil en poblaciones grandes<sup>10</sup>, debido a la sencillez y rapidez del método y, sobre todo, por la menor invasividad de obtención de la muestra. El test también se ha confirmado como válido en casos de difícil diagnóstico en que el estatus genético para el SFX no correspondía a la afectación intelectual presentada por el individuo, pero había sospecha de mosaicismo tisular. En 2 varones portadores de la premutación en sangre pero con afectación



**Figura 1.** Porcentajes de expresión de FMRP en raíz de cabello. **A)** Individuos del grupo control según su estatus mutacional para el gen FMR1. **B)** Muestras de niños y niñas con retraso mental de escuelas de educación especial.

intelectual se observó una disminución de la expresión de proteína en la raíz del cabello, lo cual demuestra un mosaicismo tisular que no permitía el diagnóstico de los pacientes utilizando las muestras de sangre habituales<sup>6</sup>. El test también permitió dar explicación a los resultados de ADN en 2 gemelas monozigóticas con la mutación completa, una con un cociente intelectual normal y la otra afectada. En este caso, la hermana normal presentó un 79% de expresión de FMRP en el cabello mientras que en

la muestra de la afectada sólo se observó un 35% de expresión, demostrando otra vez el mosaicismo tisular, en este caso debido a que la inactivación del cromosoma X entre estas 2 gemelas monozigotas se dio después de la separación de los embriones<sup>11</sup>. Finalmente, se ha puesto de manifiesto el poder de este test para la predicción de la función cognitiva en mujeres portadoras de la mutación completa<sup>12</sup>. Uno de los puntos clínicos sin resolver del SFX, la imposibilidad de pronosticar la afectación in-

telectual de las mujeres portadoras de la mutación completa, podría beneficiarse de este test para ofrecer una intervención educacional temprana en niñas afectadas.

La técnica inmunohistoquímica también se ha descrito para la aplicación en el diagnóstico prenatal, utilizando el mismo tipo de muestras que se obtienen para el estudio del ADN: vellosidad corial, líquido amniótico o sangre de cordón<sup>13-16</sup>. De momento hay pocos estudios pero se empieza a utilizar como refuerzo o confirmación de los resultados obtenidos del estudio del ADN.

### Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de las familias SFX y las escuelas Centre Pilot Sant Just y Institut Ortopedagògic Nen Déu, así como al Dr. R. Willemsen por facilitarnos el anticuerpo.

Este trabajo ha estado financiado por las redes temáticas de investigación cooperativa: Red de Centros de Genética Clínica y Molecular (V-2003-RedC-07-O) y Red de Grupos. Estudio cooperativo en retraso mental de origen genético (V-2003-RedG-098-O).

### BIBLIOGRAFÍA

- Rifé M, Badenas C, Mallolas J, Jiménez L, Cervera R, Maya A, et al. Incidence of Fragile X in 5,000 consecutive newborn males. *Genet Test*. (En prensa).
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in Fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1992;1:397-400.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in Fragile X syndrome. *Cell* 1991;66:817-22.
- Fernández Carvajal I, Blanco Quirós A, Fernández Toral J, Tellería Orriols JJ, Alonso Ramos MJ, Sanz Cantalapiedra A, et al. Eficacia de un test clínico como preselección de niños con sospecha de síndrome X frágil. *An Esp Pediatr* 2001;54:326-30.
- Willemsen R, Hohkamsing S, De Vries B, Devys D, Ouweland A van den, Mandel JL, et al. Rapid antibody test for Fragile X syndrome. *Lancet* 1995;345:1147-8.
- Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S, Van Beerendonk H, De Haan A, De Vries B, et al. Rapid antibody test for diagnosing Fragile X syndrome: A validation of the technique. *Hum Genet* 1997;99:308-11.
- Willemsen R, Anar B, De Diego Otero Y, De Vries BBA, Hilhorst-Hofstee Y, Smits A, et al. Noninvasive test for Fragile X syndrome, using hair root analysis. *Am J Hum Genet* 1999;65:98-103.
- Milà M, Sánchez A, Glover G, Castellví S, Carbonell P, Kruijer H, et al. Estudio genético y molecular de 85 familias afectas de síndrome del cromosoma X frágil. *An Esp Pediatr* 1996;44:250-6.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991;67:1047-58.
- Tunçbilek E, Alikasifoglu M, Aktas D, Duman F, Yank H, Anar B, et al. Screening for the Fragile X syndrome among mentally retarded males by hair root analysis. *Am J Med Genet* 2000;95:105-7.
- Willemsen R, Renske O, De Diego Otero Y, Oostra BA. Twin sisters, monozygotic with the fragile X mutation, but with different phenotype. *J Med Genet* 2000;37:603-4.
- Willemsen R, Smits A, Severinjnien LA, Jansen M, Jacobs A, De Bruyn E, et al. Predictive testing for cognitive functioning in female carriers of the fragile X syndrome using hair root analysis. *J Med Genet* 2003;40:377-9.
- Willemsen R, Oosterwijk JC, Los FJ, Galjaard H, Oostra BA. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. *Lancet* 1996;348:967-8.
- Willemsen R, Los F, Mohkamsing S, Van den Ouweland A, Deelen W, Galjaard H, et al. Rapid antibody test for prenatal diagnosis of fragile X syndrome on amniotic fluid cells: A new appraisal. *J Med Genet* 1997;34:250-1.
- Jenkins EC, Wen GY, Kin KS, Zhong N, Sapienza VJ, Hong H, et al. Prenatal fragile X detection using cytoplasmic and nuclear-specific monoclonal antibodies. *Am J Med Genet* 1999;83:342-6.
- Lambiris N, Peters H, Bollmann R, Leschick G, Leisti J, Salonen R, et al. Rapid FMR1-protein analysis of fetal blood: An enhancement of prenatal diagnostics. *Hum Genet* 1999;105:258-60.