

# Diagnóstico molecular por reacción en cadena de la polimerasa del síndrome X frágil: aplicación de un protocolo diagnóstico en 50 familias del norte de España

M. Durán Domínguez<sup>a,b</sup>, M. Molina Carrillo<sup>a</sup>, J. Fernández Toral<sup>c</sup>,  
T. Martínez Merino<sup>d</sup>, M.ªA. López Arístegui<sup>e</sup>, A.I. Álvarez Retuerto<sup>a</sup>,  
M.ªL. Onaindía Urquijo<sup>a</sup> y M.ªI. Tejada Mínguez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Genética. Hospital de Basurto. Bilbao. <sup>b</sup>Instituto de Biología y Genética Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. <sup>c</sup>Sección de Genética. Servicio de Pediatría. Hospital Central de Asturias. <sup>d</sup>Laboratorio de Genética. Hospital de Cantabria. Santander. <sup>e</sup>Laboratorio de Genética. Hospital de Cruces. Baracaldo. Bilbao.

(An Esp Pediatr 2001; 54: 331-339)

## Objetivos

Poner a punto una metodología rápida y eficaz para el diagnóstico molecular del síndrome X frágil (SXF), mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del triplete CGG, y establecer así un protocolo que nos sirva para: a) descartar el síndrome en pacientes con retraso mental no clasificado; b) averiguar el genotipo exacto de los individuos afectados; c) estudiar todos los individuos en riesgo de las familias con síndrome X frágil y encontrar los portadores asintomáticos, y d) proporcionar así el adecuado asesoramiento genético y reproductor a las familias en las que se transmite el síndrome.

## Pacientes y métodos

Se estudiaron 438 muestras de individuos de 50 familias con síndrome X frágil. Se utilizaron tres protocolos de PCR, uno para detección con bromuro de etidio y luz ultravioleta; el segundo para detección con digoxigenina y el sustrato quimioluminiscente (CSPD), tras blotting e hibridación con la oligosonda (CGG)<sub>5</sub>; el tercero para amplificar y detectar de forma parecida el microsatélite DXS548.

## Resultados

Se encontraron 121 individuos con la mutación completa (60 varones y 61 mujeres); 86 premutados (7 varones y 79 mujeres); 16 mosaicos y 215 normales. La PCR amplificó hasta 120-150 repeticiones, y fue necesario el estudio

directo con sonda en el caso de ausencia de banda o banda única en mujeres. La PCR resultó más precisa que el Southern-blot de ADN genómico en los portadores premutados. Finalmente, se halló en una familia recombinación entre el locus FRAXA y el microsatélite DXS548.

## Conclusiones

Estos protocolos de PCR no radiactiva permiten el diagnóstico rápido y seguro del síndrome X frágil, y están especialmente indicados en posibles portadoras y para establecer el diagnóstico prenatal.

## Palabras clave:

Síndrome X frágil. Triplete CGG. PCR. Microsatélite DXS548.

## MOLECULAR DIAGNOSIS OF FRAGILE X SYNDROME BY POLYMERASE CHAIN REACTION: APPLICATION OF A DIAGNOSTIC PROTOCOL IN 50 FAMILIES FROM NORTHERN SPAIN

## Objectives

The aim of this study was to develop a rapid, non-radioactive and effective method for the molecular diagnosis of

Este trabajo ha sido financiado por un Proyecto de Investigación FIS (n.º 94/0857) y ayudas del Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco.

Correspondencia: Dra. M.ªI. Tejada Mínguez.  
Unidad de Genética. Hospital de Basurto.  
Avda. Montevideo, 18. 48013 Bilbao.  
Correo electrónico: itejada@hbas.osakidetza.net

Recibido en abril de 2000.  
Aceptado para su publicación en diciembre de 2000.

fragile X syndrome (FXS) by the polymerase chain reaction (PCR) of the CGG repeat and to establish a protocol to be used in: a) ruling out FXS in patients with non-specific mental retardation; b) determining the exact genotype of affected individuals; c) studying all at-risk individuals from families with FXS and identifying asymptomatic carriers, and d) offering accurate genetic and reproductive counselling to families with FXS.

### Materials and methods

Samples from 438 individuals from 50 families with FXS were studied using three different PCR tests: the first to detect ethidium bromide through ultraviolet light, the second to detect digoxigenin and CSPD after blotting and hybridisation with the (CGG)<sub>5</sub> oligoprobe, and the third to amplify and detect the DXS548 microsatellite.

### Results

Of the 438 individuals studied, 121 had full mutations (60 males and 61 females), 86 had pre-mutations (7 males and 79 females), 16 showed mosaic patterns and 215 had no mutations. PCR techniques amplified up to 120-150 repeats, and direct study with probes was required when no bands or only one band was detected in females. PCR was more accurate than genomic DNA Southern blot analysis in pre-mutated carriers. In one family, recombination between the FRAXA locus and the DXS548 microsatellite was found.

### Conclusions

These non-radioactive PCR protocols permit rapid and accurate diagnosis of FXS. They are especially useful in prenatal diagnosis and in the identification of carriers.

### Key words:

Fragile X syndrome. CGG repeat. Polymerase chain reaction. DXS548 microsatellite.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome X frágil es la causa más común de retraso mental hereditario<sup>1</sup>. Los pacientes con este síndrome presentan un retraso mental de leve a grave, asociado a un fenotipo característico: cara alargada, orejas grandes despegadas, macroorquidismo, hiperactividad, lenguaje repetitivo, etc.<sup>2</sup>. Se trata de una enfermedad ligada al cromosoma X, de herencia dominante con penetrancia incompleta y cuya prevalencia es de aproximadamente 1:4.000 varones y 1:8.000 mujeres<sup>3</sup>. Su característica molecular es una expansión anormal en dos etapas del triplete CGG localizado en 5' del exón 1 del gen FMR1 descubierto en 1991<sup>4</sup>: en la población normal el número de repeticiones CGG es polimórfico, variando entre 6 y 50; su expansión hasta unas 200 repeticiones provoca una premutación, llamada así porque los individuos no manifiestan el síndrome pero el triplete se vuelve inestable, pudiendo amplificarse en la siguiente generación a más de 200 repeticiones o mutación completa en la que se inactiva el gen con la consiguiente falta de su proteína y desarrollo del síndrome<sup>5</sup>. Inicialmente, éste se diagnosti-

có por métodos citogenéticos y, después del descubrimiento del gen, se describieron las sondas adecuadas para su estudio molecular directo<sup>1</sup>. Posteriormente, y debido a lo laborioso del método Southern-blot, diversos autores se centraron en amplificar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región que contiene el triplete CGG<sup>6-8</sup>. Se han descrito asimismo unos marcadores polimórficos del tipo microsatélite cercanos al gen FMR1 como el DXS548, situado a 150 kb en dirección contraria: este marcador, del tipo (CA)<sub>n</sub> es muy informativo y se han descrito 9 alelos distintos del mismo con una heterocigosidad del 70-80%<sup>9</sup>. En este trabajo se presenta el estudio molecular mediante PCR no radiactiva de 438 individuos pertenecientes a 50 familias con síndrome X frágil del norte de España. Se describe un protocolo de estudio molecular completo basado en la combinación de dos técnicas de PCR para la amplificación del triplete CGG junto con el método directo. Se valora finalmente la utilidad del microsatélite DXS548.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Pacientes

La Unidad de Genética del Hospital de Basurto recibió, entre los años 1991 y 1997, la mayoría de las peticiones para estudio molecular del síndrome X frágil que se produjeron en el norte de España. Las muestras para diagnóstico llegaron seleccionadas en su mayoría por pediatras, genetistas, ginecólogos y neurólogos bajo sospecha clínica del síndrome por muy diversas razones: historia familiar de retraso mental ligado al X, fenotipo sugerente, citogenética positiva para X frágil, niños hipercinéticos y/o con problemas de lenguaje, autismo, retraso mental aislado no clasificado, etc. Entre todas ellas se hallaron 50 casos índice de síndrome de X frágil; 26 pertenecientes al País Vasco, 15 a Asturias, siete a Cantabria y dos a La Rioja.

El trabajo que se presenta se inició en el año 1994 y consistió en estudiar las familias de estos 50 casos índice, 27 de ellas, de manera retrospectiva, puesto que habían sido estudiadas por el método directo con sonda o Southern-blot, y las otras 23 prospectivamente. Sumaron un total de 438 muestras, los 50 casos índice, 308 individuos con riesgo genético de llevar la mutación por el pedigrí y otros 80 sin riesgo (maridos de portadoras; hijos e hijas de no portadores que entregaron sus muestras junto con las de sus padres, etc.). En cuanto al sexo, 248 eran mujeres, 179 varones y 11 diagnósticos prenatales (biopsias de corion). En todas las muestras se estudió, mediante PCR, el triplete CGG y el microsatélite DXS548.

Este estudio fue avalado por la Comisión de Investigación y el Comité de Ética del Hospital de Basurto y los médicos que remitieron las muestras se encargaron de la información y del consentimiento informado de los pacientes.

## Estudio molecular

En todos los pacientes se extrajo el ADN a partir de 15-20 ml de sangre periférica en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mediante el método salino (Salting Out)<sup>10</sup>, salvo en los casos de diagnóstico prenatal que se obtuvo de biopsia de vellosidades coriales.

Se han utilizado tres protocolos diagnósticos basados en la PCR:

1. El primero fue para la técnica que hemos llamado de detección y se basa en los métodos descritos por Fu et al.<sup>6</sup> y Chong et al.<sup>7</sup>, con la introducción de variantes propias. Básicamente consiste en la amplificación de un fragmento que incluye el triplete CGG que se visualiza con luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio tras electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (tabla 1).

2. En el segundo protocolo de PCR, utilizado para la técnica que se ha llamado de "cuantificación", se ha seguido la técnica descrita por Brown et al.<sup>8</sup> también con modificaciones propias. Después de esta PCR, la detección del fragmento amplificado se hace migrándolo en geles de poliacrilamida que se transfieren a un filtro y se hibridan con una oligosonda del triplete CGG (tabla 1).

3. Para la amplificación del microsatélite DXS548 de cada muestra problema se puso a punto el tercer protocolo de PCR. Se utilizó para ello la técnica descrita por Oudet et al.<sup>12</sup> con los cebadores o primers descritos por Verkek et al.<sup>4</sup> y con el método no radiactivo de detección con digoxigenina, que se ha descrito con detalle en la tabla 1.

## RESULTADOS

Puede decirse sin lugar a dudas que el primer resultado conseguido, ha sido en realidad la puesta a punto de un protocolo diagnóstico de estudio del síndrome X frágil en tres pasos o fases, como se aprecia en la figura 1:

Primer paso. Ante la llegada de una muestra de un varón para descartar o diagnosticar el síndrome se realiza en primer lugar la que se ha llamado "técnica de detección". Con esta PCR sólo se detectan los alelos de hasta unas 65 repeticiones (fig. 2A), por lo que, si existe aparición de banda, el individuo no será X frágil, o como mucho, un premutado con premutación menor de 65. Si hay ausencia de banda se repite la técnica una o dos veces más, ya que a veces falla y, si persiste la ausencia de banda, se sigue con el segundo paso.

Segundo paso. La técnica de cuantificación (fig. 2B) se aplica a la vez con el ADN del varón con retraso mental, que no ha amplificado en el primer paso y con el de su madre. También se aplica directamente en los casos de mujeres con retraso mental. Esta técnica amplifica siempre hasta unas 150 repeticiones, por lo que pueden discriminarse perfectamente todos los alelos normales de los premutados, salvo en el caso de homocigosidad en las

TABLA 1. Técnicas

<p>Técnica de detección</p> <p>Los cebadores o primers utilizados se corresponden con los llamados C y F respectivamente de Fu et al.<sup>6</sup>:            P4 sense, 5'-GCTCAGCTCCGGTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3', y            P6 antisense, 5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3'</p> <p>Las condiciones de reacción fueron: 2,5 U de Taq Plus Long (Stratagene); 10% de su tampón; 12,5% de DMSO; 10 pm/μl de cada primer; 40 mM de una mezcla equimolar de dNTP y 200 ng/μl de ADN problema en un volumen final de 25 μl.</p> <p>Los ciclos fueron: 5' a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización, 1' a 98 °C, hibridación 2' a 75 °C y elongación 2' a 75 °C, unido a una extensión final de un ciclo 10' a 75 °C.</p> <p>Los productos se migran en una electroforesis de agarosa al 1,5% y se visualizan con bromuro de etidio.</p>
<p>Técnica de cuantificación</p> <p>Los cebadores utilizados fueron: P4 sense, 5'-GCTCAGCTCCGGTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3', y            P5 antisense, 5'-TTGTAGAAAAGCGCCATTGGAGCCC-3', que se corresponden con los primers C y P2 descritos por Fu et al.<sup>6</sup>, y Krueyer et al.<sup>11</sup>, respectivamente.</p> <p>Las condiciones de reacción fueron: 1,25 U de Taq Plus DNA polimerasa (Roche); 10% de su tampón; 10% de DMSO; 16 pm/μl de cada primer; 10 mM de una mezcla equimolar de dATP + dCTP + dTTP + 7deaza-dGTP y 200 ng/μl de ADN problema en un volumen final de 50 μl.</p> <p>Los ciclos fueron: 2' a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 30'' a 94 °C, hibridación 1' a 61 °C y elongación 2' a 72 °C.</p> <p>Del producto amplificado, se toman 4 μl que, mezclados con 2 μl de azul formamida desnaturalizante, se desnaturalizan a 98 °C durante 5' y se cargan en geles verticales de acrilamida-trea-TBE (6%).</p> <p>Tras la electroforesis, se transfieren a un filtro que se hibrida con una oligosonda (CGG)<sub>5</sub> marcada con digoxigenina. Los filtros se detectan con quimioluminiscencia (CSPD) según protocolos modificados de Boehringer Mannheim (Roche).</p> <p>El tamaño de los distintos alelos se calcula por medio de una escalera propia creada con el marcador V Digoxigenin-labeled® (10 μg/ml) de Roche, al que se le intercalan fragmentos conocidos de amplificados de ADN del laboratorio, que se habían enviado a secuenciar.</p>

mujeres. En este último caso, así como si hay ausencia de banda, se sigue con el tercer paso.

Tercer paso. Se utiliza el método directo con Southern blot y la sonda Stb12.3<sup>1</sup>, no sólo en las dos situaciones acabadas de mencionar, sino también para verificar las premutaciones altas, los mosaicos y en todos los casos de diagnóstico prenatal. Con este método, utilizado antes de usar la PCR, se describieron las 11 primeras familias de las 50 aquí presentadas<sup>13</sup>.

Aplicando este completo protocolo a las 50 familias con X frágil se obtuvieron todos los genotipos en las 438 muestras de esas familias, cuyos resultados globales se muestran en la tabla 2. Se desea destacar en este tra-

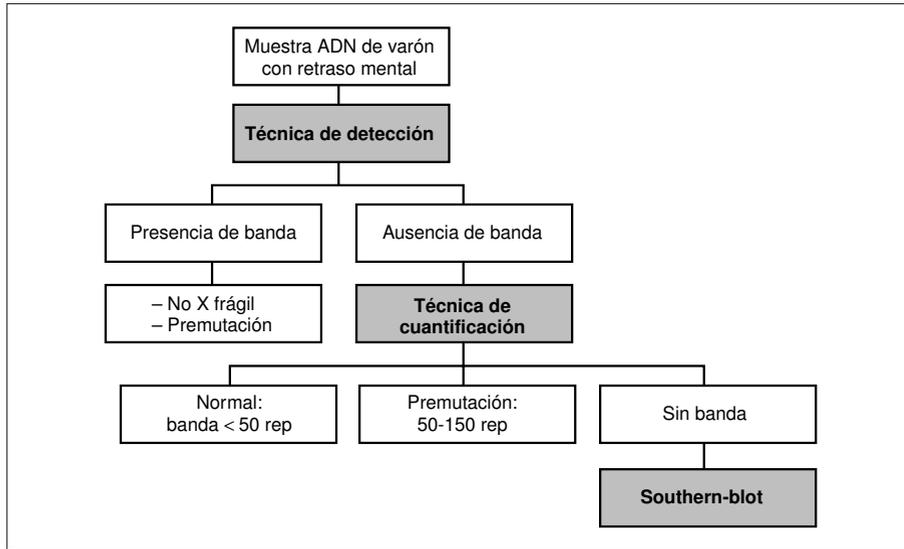


Figura 1. Protocolo de diagnóstico del síndrome X frágil. rep: repeticiones.

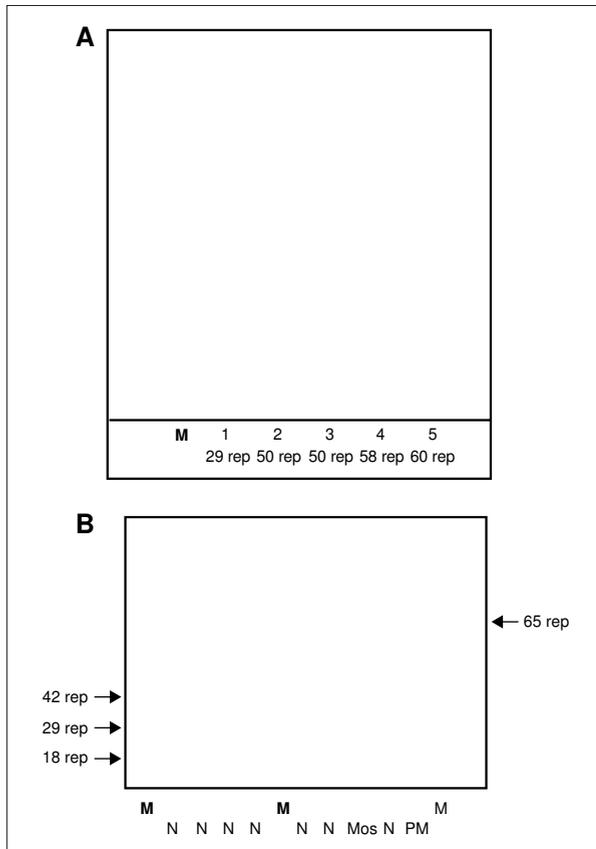


Figura 2. A) Técnica de detección. Fotografía con video-printer de la tinción con bromuro de etidio. B) Técnica de cuantificación, autorradiografía. M: marcador de pesos moleculares; Mos: mosaico; N: normal; PM: premutación; rep: repeticiones.

TABLA 2. Genotipos de los 438 individuos de las 50 familias con síndrome X frágil

Mutación	Varones	Mujeres	Total
Estado normal	104 (2 VC)	111 (6 VC)	215
Premutación	7	79	86
Mutación completa	60 (1 VC)	61 (2 VC)	121
Mosaico	11	5	16
Total	182	256	438

VC: muestras de biopsias de vellosidad corial existente del total indicado.

en 3 casos: un varón de la familia 13 de 58 repeticiones que incluso fue dado inicialmente como normal; en la familia 17, en una abuela también con 58 repeticiones, y en la familia 27 en la que la madre de un afectado sólo presenta 47 repeticiones (fig. 3); b) en 2 casos hallados de mujeres premutadas (familias 31 y 49, fig. 4) en las que por azar, todo el cromosoma X normal está activo y el premutado inactivo, con lo que mediante Southern-blot sólo se observan dos bandas.

Descontando estos 5 casos, en el resto de individuos existía concordancia entre el método de Southern-blot y la PCR, tanto para los valores de amplificación (< 150 repeticiones), como para los individuos afectados en los que la "no amplificación" equivale a mutación completa. La excepción a esto se encuentra en los mosaicos.

Por último, se ha corroborado que en este síndrome hay expansión de generación a generación, aunque se han encontrado cuatro excepciones o reducciones del número de repeticiones CGG a la siguiente generación: familias 16 y 31 de padres a hijas y familias 6 y 50 de madres a hijo e hija (fig. 5).

Para el microsatélite DXS548, la figura 6 representa la distribución de los alelos DXS548, de los 50 cromosomas X asociados con el síndrome X frágil. Se han obtenido

bajo que la técnica de cuantificación ha resultado ser más precisa que el Southern-blot en los siguientes casos: a) en casos de premutaciones muy bajas. Esto nos ha ocurrido

cuatro alelos diferentes y se observa una clara distribución bimodal con dos picos en los alelos 194 y 204. Contrariamente a lo que se ha descrito en la mayoría de las publicaciones sobre la ausencia de recombinación del microsatélite DXS548 con el locus FRAXA, nosotros sí hemos encontrado un caso de recombinación en una de las familias X frágil (familia 19) como se muestra en la figura 7.

### DISCUSIÓN

Como se ha comprobado en los resultados, un objetivo importante conseguido en este trabajo ha sido la puesta a punto de una metodología por PCR no radiactiva para la determinación de los alelos CGG del locus FRAXA. Este protocolo, que combina dos técnicas de PCR diferentes, puede resultar largo, pero, en vista de los resultados tan fiables que se obtienen merece la pena su utilización. Hasta llegar a éste, se realizaron muchas pruebas y experimentos para obtener el mejor resultado, el más claro y el menos ambiguo: se utilizaron para ello diversos cebadores y enzimas, y se combinaron y modificaron varios protocolos<sup>6-8,11,14</sup>, sobre todo en lo que se refiere a la cantidad de ADN, los ciclos y dos componentes que merecen especial mención, que son el DMSO y el 7-deaza-dGTP. El DMSO es necesario para evitar la formación de estructuras secundarias en el ADN que aparecen porque la zona que se desea amplificar es rica en citosinas y guaninas, lo que dificulta la amplificación por PCR. Realizando pruebas con las técnicas descritas por di-

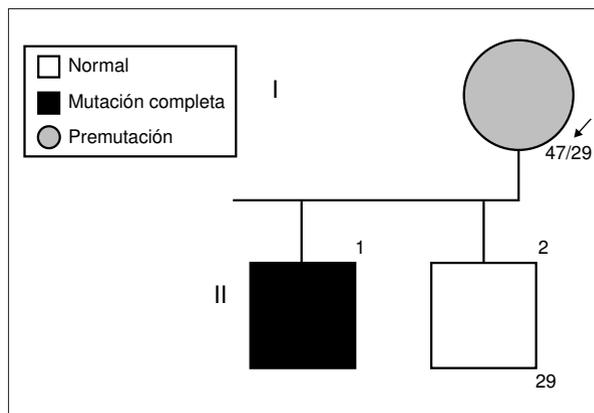


Figura 3. Pedigrí de la familia 27; I-1, mujer portadora obligatoria por tener un hijo con síndrome X frágil, pero no detectada por Southern blot, premutación muy baja (47 repeticiones por reacción en cadena de la polimerasa). El número de repeticiones se encuentra indicado en la parte inferior derecha.

versos autores<sup>7,8,14</sup> los mejores resultados se obtuvieron al utilizar el DMSO al 12,5 % en la técnica de detección y al 10 % en la técnica de cuantificación. Por la misma razón se requiere también la sustitución en la mezcla de reacción del nucleótido guanina por un compuesto análogo denominado 7-deaza-dGTP<sup>15</sup>, pero como este compuesto inhibe la fijación del bromuro de etidio, su sustitución no es posible en la técnica de detección que se visualiza

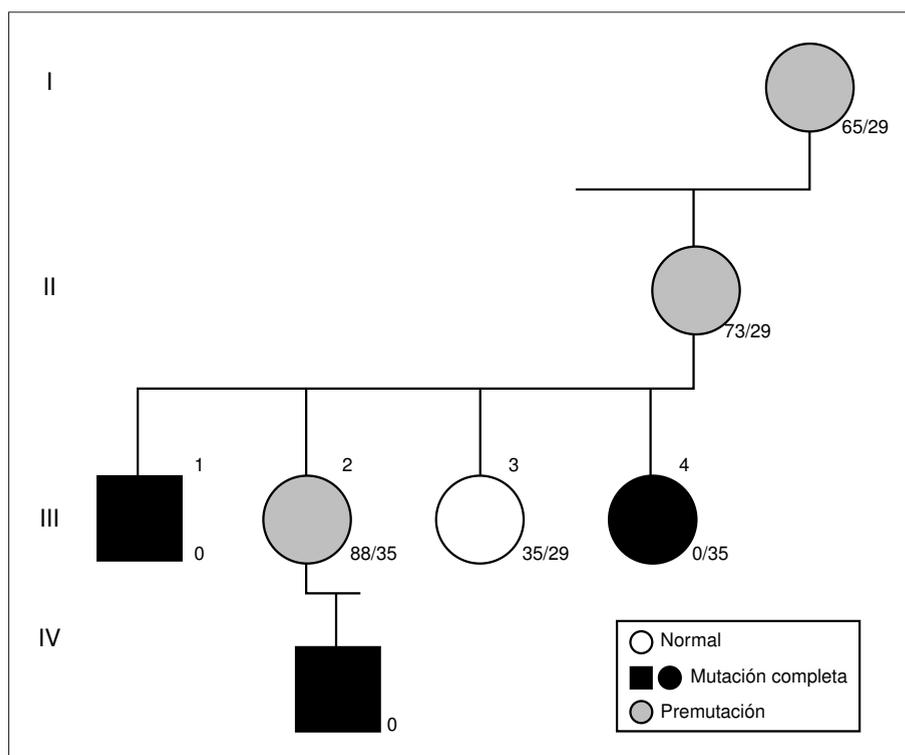


Figura 4. Pedigrí de la familia 49: caso de premutación encontrado por reacción en cadena de la polimerasa (I-1) y no detectado mediante Southern blot, debido a la inactivación de todo el cromosoma X premutado.

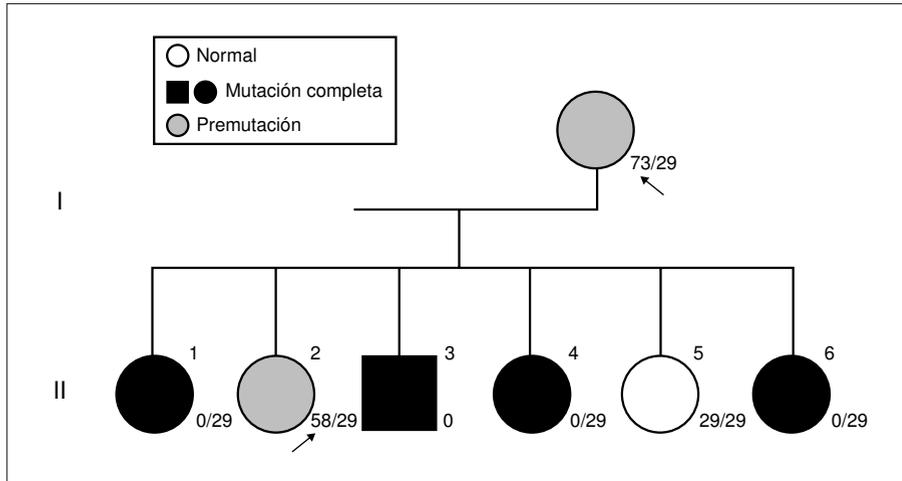


Figura 5. Pedigrí de la familia 50: ejemplo de reducción de la amplificación en el paso de (I-1) a (II-2) señalados con flecha.

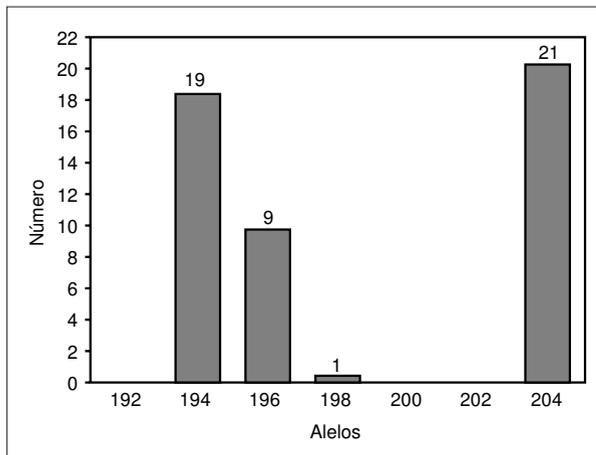


Figura 6. Distribución alélica del microsatélite DXS548 en los 50 cromosomas X frágil de los 50 casos índice.

por luz ultravioleta, razón por la que esta PCR falla a veces carencia que se ha compensado incrementando la concentración de DMSO (12,5 fente a 10 %). Por último, en la técnica de cuantificación se optimizó también la detección de los fragmentos amplificados. Como se requiere hibridación, se probaron dos oligosondas distintas, la (CGG)<sub>5</sub><sup>8</sup> y la (CGG)<sub>6</sub>-C G<sup>16</sup>, y resultó más efectiva la primera. Con todo ello, y con la visualización de los alelos por quimioluminiscencia mediante digoxigenina y CSPD se obtuvo un protocolo que resultó infalible y fiable, como se observa en la figura 2B.

Cuando se señala que resulta fiable no nos referimos sólo a su aspecto técnico, sino que también ha habido una correlación exacta entre la clínica (afectación o no), el método directo o de Southern-blot y la PCR, en el rango de amplificación de ésta (< 150 repeticiones). Por otro lado, dado que el síndrome X frágil tiene una transmisión compleja, y atraviesa diversos estadios hasta el desarrollo del síndrome (alelo normal a riesgo, alelo pre-

mutado, alelo mutado completo), la aplicación de estas técnicas al asesoramiento en las familias cobra gran relevancia, sobre todo en las mujeres portadoras premutadas para valorar su riesgo. La técnica de cuantificación del triplete CGG se ha revelado esencial para estudiar el papel del tamaño de los diferentes alelos y cómo se transmiten éstos de generación en generación.

Desde el descubrimiento del triplete CGG, cuya inestabilidad es la responsable del síndrome X frágil<sup>4,6</sup>, se supo que dicha inestabilidad suponía una amplificación anómala, también llamada expansión, de ese triplete en sucesivas generaciones. En las 50 familias se ha verificado que, en efecto, a través de la meiosis femenina, de una premutación pequeña se pasa en general a otra mayor, y así hasta llegar a la mutación completa de tal forma que, a partir de 90-100 repeticiones, el riesgo de expansión a mutación completa es del 100 % en nuestra muestra, como ya habían publicado otros autores<sup>17,18</sup>. Conocer esto es fundamental para el asesoramiento genético a esas mujeres.

La mayoría de los autores<sup>19,20</sup> aseguran que ningún niño con el síndrome X frágil ha nacido de madres con menos de 59 repeticiones. Sin embargo, en la familia 27, la madre del caso índice poseía sólo 47 repeticiones. Murray et al (1997)<sup>18</sup>, que han estudiado específicamente las transmisiones de generación en generación, no encuentran inestabilidad alguna en los alelos claramente normales (límites, 29-39 repeticiones), pero sí en los alelos denominados intermedios o en la zona gris (entre 45-59 repeticiones), que aumentan de tamaño al pasar de generación, aunque ninguna de las amplificaciones halladas por ellos llega a la mutación completa. En este rango nosotros encontramos 8 portadoras, una de 50 repeticiones y 7 de 58: mientras que la mujer con 50 repeticiones (familia 13) no tuvo ningún hijo con el síndrome y pasó a sus hijos e hijas una premutación superior, dos de sus hijas de 58 repeticiones sí tuvieron hijos con la mutación completa. Las otras 5 portadoras de 58 repeti-

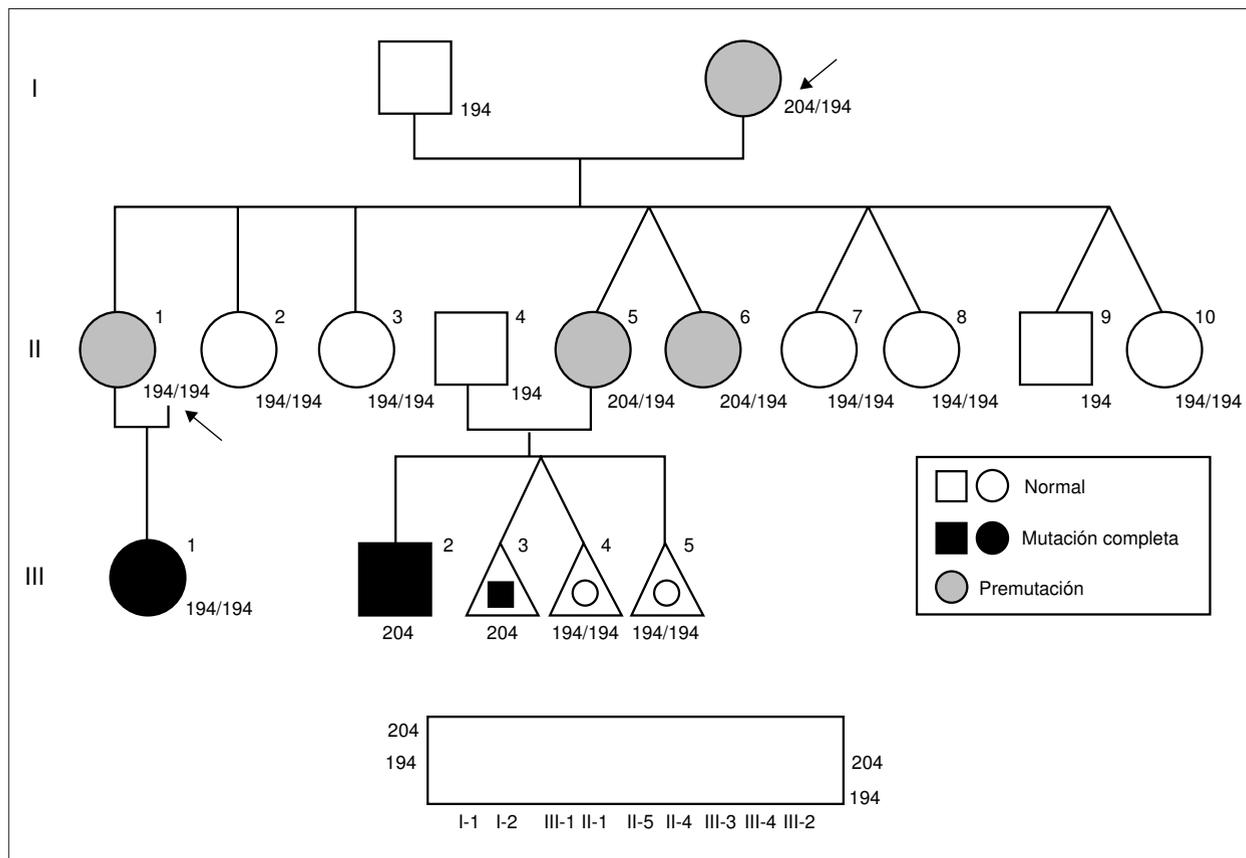


Figura 7. Familia 19: caso de recombinación entre los loci FRAXA y del microsatélite DXS548 en el paso de (I-1) a (II-1). Pedigri de la familia y autorradiografía del microsatélite DXS548 de algunos individuos, entre ellos los implicados en la recombinación.

ciones no pasaron la mutación completa a sus hijos. Pero además, en dos familias (familias 1 y 45), se encontraron también alelos de 50 repeticiones, pero no responsables del síndrome X frágil y se estudió entonces su transmisión a través de varias generaciones y no se encontró ninguna variación, lo que indicó que no eran inestables. En conclusión, el asesoramiento genético en este rango de 45 a 55 repeticiones es delicado: existen alelos normales y alelos premutados inestables que, aunque con poca frecuencia, pueden llegar a pasar a mutación completa. Algo parecido habíamos encontrado en una población de gestantes que se ha analizado previamente<sup>21</sup>, por lo que ya en su día se aconsejaba cautela con este tipo de diagnósticos. Además, se ve claro con todo esto lo importante de la cuantificación exacta del triplete CGG en estas premutaciones bajas: ya se han descrito en los resultados que 3 casos de premutación de las familias 13, 17 y 27 no fueron detectados por el método de Southern-blot. Macpherson et al<sup>22</sup> fueron los primeros autores en destacar este mismo problema, que se debe a que el método directo con la sonda Stb12.3 detecta fragmentos normales de aproximadamente 2,8 kb en electroforesis horizontales de agarosa, que son sensibles hasta unas 80-100 pb, lo

cual logra distinguir un alelo de 29 repeticiones de otro de 58-60, pero no mucho más. Pero además, el Southern blot, tras digestión con EcoRI/EagI, detecta normalmente 4 bandas en las mujeres premutadas, debido a que tanto los cromosomas X normales como los premutados sufren en inactivación al azar. En el extremo de la curva por azar se encuentran los casos en los que todo el cromosoma X normal está activo (banda de 2,8 kb) y todo el cromosoma X premutado está inactivo (banda de 5,3 kb o más). Es evidente que, en este rango tan alto de pesos moleculares es muy difícil distinguir incluso las premutaciones de 60-65 repeticiones, como ha ocurrido en dos portadoras (familias 31 y 49) (v. fig. 4<sup>23</sup>).

Siguiendo con este tema de la inactivación o metilación de uno de los dos cromosomas X en las mujeres, hay que comentar también la importancia de la cuantificación del triplete CGG en el diagnóstico prenatal. Las vellosidades coriales son muestras embrionarias extrafetales, por lo que el cromosoma X puede no inactivarse, o inactivarse parcialmente, obteniendo patrones en Southern-blot difíciles de interpretar<sup>24,25</sup>. La PCR del triplete CGG puede resolver estos problemas, salvo en el caso de que aparezca una sola banda en un feto hembra, que podría ser ho-

mocigota normal, o mutada completa. Así, en el diagnóstico prenatal hay que ser cautos, y es necesario utilizar también las técnicas de Southern-blot e incluso de PCR de microsatélites cercanos. En cualquier caso, en el diagnóstico prenatal no cabe duda de que, si lo primero que se efectúa es la PCR del triplete CGG, de una forma rápida se habrán diagnosticado más del 75 % de los fetos: casi todos los varones (excepto los mosaicos), y las mujeres heterocigotas, bien normales o premutadas.

Hay que hacer mención también a las cuatro regresiones encontradas: dos a partir de varones (familia 16: un premutado de 115 repeticiones pasa a su hija un alelo de 88 repeticiones; familia 31: otro varón de 105 repeticiones pasa a su hija también un alelo de 88 repeticiones) y dos a partir de mujeres (v. fig. 5). Esta disminución del tamaño del triplete CGG es un fenómeno poco frecuente, pero también descrito por otros autores<sup>26-28</sup> y se han propuesto diversos mecanismos para explicarlo, como la conversión génica, las recombinaciones anómalas o las deleciones. Aunque nosotros hemos encontrado estas disminuciones al 50 % para varones y mujeres, en la bibliografía parecen más frecuentes las transmisiones paternas con reducción que las maternas, lo que podría deberse a una no expansión más que a una reducción, pues se ha descrito que los varones pueden tener en sus espermatozoides alelos CGG más pequeños que en otras células somáticas<sup>18,29</sup>.

Por último, respecto al microsatélite DXS548, los resultados obtenidos con la PCR han demostrado que constituye una buena ayuda diagnóstica: es sencillo de estudiar; su amplificación no falla nunca, su visualización es muy clara y pueden diferenciar perfectamente incluso aquellas mujeres heterocigotas cuyos alelos difieren en una sola repetición (v. fig. 7). Además, es un microsatélite muy informativo en nuestra población: en las mujeres de las 50 familias estudiadas se ha calculado el porcentaje de heterocigosidad y se ha encontrado un 71,42 %, resultado similar al publicado inicialmente<sup>9</sup>, pero superior al de otras series<sup>12</sup>. En total, de las 50 familias, sólo 7 no fueron informativas (7/50 = 14 %), por portar todos los miembros de cada familia el mismo alelo. Gracias a esta heterocigosidad pudo establecerse el diagnóstico prenatal en 1 caso de la familia 31: por Southern-blot la muestra de vellosidades coriales del feto (XX por citogenética) daba una sola banda, lo cual podía deberse a un fallo de metilación en una hembra normal o podía ser una niña con la mutación completa. La PCR del triplete CGG no se encontraba en ese momento puesta a punto todavía y, gracias a que el DXS548 resultó informativo<sup>23</sup> pudo diagnosticarse el feto como normal. Posteriormente, se supo que esta niña era heterocigota para el triplete CGG (29/18), pero este caso sirve de ejemplo para aplicarlo también en casos de homocigosidad. De todas formas, teniendo los métodos directos de diagnóstico (Southern-blot y PCR del triplete CGG), no hay que utilizar los mé-

todos indirectos de forma sistemática, sino como ayuda y con precaución, pues como se ha expuesto en los "Resultados", se ha encontrado un caso de recombinación con el locus FRAXA en la familia 19 (v. fig. 7). Este tipo de recombinaciones son muy infrecuentes, siendo así que en la mayoría de artículos y revisiones sobre el tema se asegura que no hay recombinación. Sin embargo, revisando de manera exhaustiva la bibliografía, se han hallado varios casos descritos<sup>28,30,31</sup>, lo que ratifica las recomendaciones de cautela.

## BIBLIOGRAFÍA

- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Bue J et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673-1681.
- Hagerman RJ. Physical and behavioral phenotype. En: Hagerman RJ, Silverman AC, eds. *Fragile X Syndrome: diagnosis treatment and research*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1991; 3-68.
- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196-197.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A et al. Identification of a Gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 906-914.
- Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, MacPherson J, Malmgren H, Dahl N et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2.253 cases. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 225-237.
- Fu Y, Kuhl D, 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: 1047-1058.
- Chong SS, Evan EE, Nelson DL, Hughes MR. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using pfu polymerase. *Am J Med Genet* 1994; 51: 522-526.
- Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA* 1993; 270: 1569-1575.
- Riggins G, Sherman S, Costra B, Sutcliffe J, Feitell D, Nelson D et al. Characterization of a highly polymorphic dinucleotide repeat 150 KB proximal to the fragile X site. *Am J Med Genet* 1992; 43: 237-243.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 1215.
- Krayer H, Mila M, Glover G, Carbonell P, Ballesta F, Estivill X et al. Fragile X syndrome and the (CGG)<sub>n</sub> mutation: two families with discordant MZ twins. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 437-442.
- Oudet C, Mornet E, Serre JL, Thomas F, Lentes-Zengerling S, Kretz C et al. Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggests that fragile X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 297-304.
- Tejada I, Mornet E, Biancalana V, Oberle I, Bue J, Mandel JL et al. Direct DNA analysis of fragile X syndrome in Spanish pedigrees. *Am J Med Genet* 1992; 43: 282-290.

14. Hirst MC, Grewal PK, Davies E. Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Molec Genet* 1994; 3: 1553-1560.
15. Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT. Detection of full fragile X mutation. *Lancet* 1992; 339: 271-272.
16. Mornet E, Chateau C, Taillandier A, Simon-Bouy B, Serre JL. Recurrent and unexpected segregation of the FMR1 CGG repeat in a family with fragile X syndrome. *Hum Genet* 1996; 97: 512-515.
17. Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet* 1992; 29: 794-801.
18. Murray A, Macpherson JN, Pound MC, Sharrock A, Youings SA, Dennis NR et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 173-184.
19. Zhong N, Yan W, Dobkin C, Brown T. Fragile X gene instability: Anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 351-361.
20. Eichler E, Macpherson J, Murray A, Jacobs P, Chakravarti A, Nelson D. Haplotype and interspersal analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 319-330.
21. Durán M, López-Valverde M, Álvarez AI, Molina M, Onaindia ML, Tejada MI. Síndrome del cromosoma X-frágil: ¿es viable un screening en gestantes? *Prog Diag Prenat* 1999; 11: 96-100.
22. Macpherson J, Harvey J, Curtis G, Webb T, Heitz D, Rousseau F et al. A reinvestigation of 33 fragile X families using probe StB12.3. *Am J Med Genet* 1992; 43: 905-912.
23. Tejada MI. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome: abnormal methylation in a prenatally affected mother and in her female normal fetus in chorionic villi. En: *Medizinische Genetik. Berlin, 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Genetics (ESHG)*, 1995.
24. Sutherland GR, Gedeon A, Kornman L, Donnelly A, Byard RW, Milley JC et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N Engl J Med* 1991; 325: 1720-1722.
25. Stcliff 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.
26. Van den Ouweland A, Deelen WH, Kunst CB, Giovannucci Uzielli ML, Nelson D, Warren ST et al. Loss of mutation at the FMR1 locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes. *Hum Molec Genet* 1994; 3: 1823-1827.
27. Graaff E, Ruillard P, Willens PJ, Smits AP, Rousseau F, Costra BA. Hotspot for deletions in the CGG repeat region of FMR1 in fragile X patients. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 45-49.
28. Murray A, Macpherson JN, Pound MC, Sharrock A, Youings SA, Dennis NR et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 173-184.
29. Fisch GS, Snow K, Thibodeau SN, Chalifoux M, Holden J, Nelson D et al. The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1147-1155.
30. Dreesen JC, Smits AP, Van Oost BA. Recombination of DXS548 (RS46) with the FRAXA locus. *Am J Med Genet* 1994; 51: 535-537.
31. Macpherson JN, Curtis G, Grolla JA, Dennis N, Migeon B, Grewal PK et al. Unusual (CGG)<sub>n</sub> expansion and recombination in a family with fragile X and DiGeorge syndrome. *J Med Genet* 1995; 32: 236-239.