

1999-E

092540715

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



DETECCION, MEDIANTE RCP EN ADN MODIFICADO,
DE LAS SECUENCIAS REPETITIVAS CGG Y DEL
ESTADO DE METILACION DE LAS ISLAS
CpG EN EL GEN FMR1

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
PRESENTA
MONICA ALEJANDRA ROSALES REYNOSO
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO ENERO 2001



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. MÓNICA ALEJANDRA ROSALES REYNOSO
P R E S E N T E .**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "DETECCIÓN, MEDIANTE RCP EN ADN MODIFICADO, DE LAS SECUENCIAS REPETITIVAS CGG Y DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL GEN FMRI", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el M.C. PATRICIO BARROS NÚÑEZ y como asesor el M.C. EDUARDO VÁZQUEZ VALLS.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
"AÑO IRENE ROBLEDO GARCÍA"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 04 de diciembre del 2000

pp. Alma Rosa Villalobos
DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS GÓMEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



SECRETARÍA ACADÉMICA
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Alma Rosa Villalobos
DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.C. PATRICIO BARROS NÚÑEZ- Director del Trabajo.
c.c.p. M.C. EDUARDO VÁZQUEZ VALLS.- Asesor
c.c.p. Expediente del alumno
MERL/ARVA/mam*

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:

MONICA ALEJANDRA ROSALES REYNOSO

con el título:

DETECCION, MEDIANTE RCP EN ADN MODIFICADO, DE LAS SECUENCIAS REPETITIVAS CGG Y DEL ESTADO DE METILACION DEL GEN FNRI

consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 4 de diciembre del 2000

EL DIRECTOR DE TESIS



NOMBRE Y FIRMA

M.C. PATRICIO BARROS NUÑEZ

EL ASESOR



NOMBRE Y FIRMA

M.C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS

SINODALES

1.- DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA

NOMBRE COMPLETO



FIRMA

2.- DRA. ANNE SANTERRE LUCAS

NOMBRE COMPLETO



FIRMA

3.- DR. CARLOS ALVAREZ MOYA

NOMBRE COMPLETO



FIRMA



SECRETARIA ACADÉMICA
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



DIRECTOR DE TESIS: M. en C. PATRICIO BARROS NUNEZ
Investigador Asociado D. División de Genética. CIBO. IMSS
Nivel I SNI.

ASESOR DE TESIS: M. en C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS.
Investigador Asociado D. División de Inmunología. CIBO. IMSS
Profesor de la U de G.

DEPARTAMENTO EN DONDE SE DESARROLLO EL PROYECTO:

Laboratorio de Bioquímica III. División de Genética. CIBO. IMSS.
Sierra Mojada 800. Col. Independencia. CP.44340.
Guadalajara, Jalisco.
Tel.: 668 30 00. Ext.31928

DEDICATORIA

A mis padres a quienes debo todo lo que soy y por que nunca me han dejado caer aun en los momentos más difíciles, por todo su amor y apoyo invaluable, siempre han sido y serán lo más grande que pueda poseer.

A mis hermanas, por todo lo que hemos compartido juntas, espero que ustedes también luchen por sus ideales aunque parezcan difíciles de alcanzar.

A la memoria de mi abuelito que aunque no este presente hoy conmigo, yo sé que nunca me dejara sola y donde quiera que se encuentre siempre vivirá en mi corazón.

A mi abuelita que siempre me ha apoyado en todo.

A José por el apoyo y comprensión que me ha brindado incondicionalmente.

A la memoria de Gaby que siempre vivirá en nuestros corazones.

Con cariño

Mónica Alejandra

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de tesis: Dr. Patricio Barros Núñez por guiarme en este trabajo por su apoyo otorgado y por brindarme su amistad en todo momento.

A mi Asesor de tesis: Dr. Eduardo Vázquez Valls, por sus sugerencias en este trabajo y sus enseñanzas como maestro y por su amistad.

A los sinodales de tesis: Dra. Alma Rosa Villalobos, Dra. Anne Santerre y Dr. Carlos Alvarez Moya. Por sus sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

Muy especialmente a la QFB. Cristina Núñez y a la Dra. En C. Ana Rebeca Jaloma Cruz, por su constante apoyo, principalmente en el trabajo experimental.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron en este trabajo.

A Dios por permitirme seguir adelante.

INDICE

Sección	Página
Resumen	1
I. MARCO TEORICO	2
Síndrome X- Frágil	
Cuadro Clínico	
Herencia	
Sitio Frágil	
Gen FMR1	
Proteína FMR1 (FMRP)	
II. ANTECEDENTES	10
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV. HIPOTESIS	15
V. OBJETIVOS	15
• Objetivo General	
• Objetivos específicos	
VI. METODOLOGIA	17
Diagrama de Flujo	
Estrategia	
Determinación del numero de repeticiones CGG	
Determinación de la metilación de las islas CpG	
Muestra	
Obtención de la muestra	
Obtención del paquete de leucocitos	
Extracción del ADN genómico	
Determinación de la concentración y calidad del ADN	
Tratamiento con bisulfito de sodio	
Amplificación de las repeticiones CGG y las Islas CpG por RCP	
Iniciadores para las repeticiones CGG	
Iniciadores para las Islas CpG	
Condiciones de amplificación para las repeticiones CGG	
Condiciones de amplificación para las Islas CpG	
Control interno	
Separación de los productos por electroforesis	
Tinción con nitrato de plata	

VII. RESULTADOS	30
VIII. DISCUSION	40
IX. CONCLUSIONES	43
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
XI. ANEXO	53

RESUMEN

El síndrome X-Frágil es la causa heredable más frecuente de retardo mental. Se transmite ligado al cromosoma X mediante un mecanismo inusual de herencia y está asociado a la expresión citogenética del sitio Frágil Xq27.3 (FRAXA).

El fenotipo clínico de los pacientes con X-Frágil incluye anomalías físicas, retardo mental y trastornos de la conducta. La mutación que causa el síndrome es una amplificación trinucleótida CGG en la región no traducible 5' del exón 1 en el gen FMR1. En individuos normales esta secuencia es polimórfica en longitud y contenido variando de 6 a 50 repeticiones CGG. En los individuos afectados con el síndrome X-Frágil, el segmento amplificado muestra más de 200 repeticiones y ocurre metilación de las secuencias CGG y las islas CpG adyacentes, lo que da lugar a la inactivación del gen. (El gen en estado de premutación contiene de 50 a 200 repeticiones CGG y las portadoras muestran alta tendencia a producir gametos con la mutación completa que dará individuos afectados). La determinación del número de repeticiones CGG se ha logrado mediante Southern blot con marcaje radiactivo aunque resulta complejo y costoso. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es difícil lograrlo ya que el alto contenido de C+G en la secuencia da lugar a la formación de estructuras secundarias, por lo que se ha utilizado análogos de base como la 7-deaza-dGTP pero con el inconveniente de no poder ser teñidos por las técnicas convencionales. Para evadir esta complicación se han propuesto técnicas como la modificación del ADN con bisulfito de sodio.

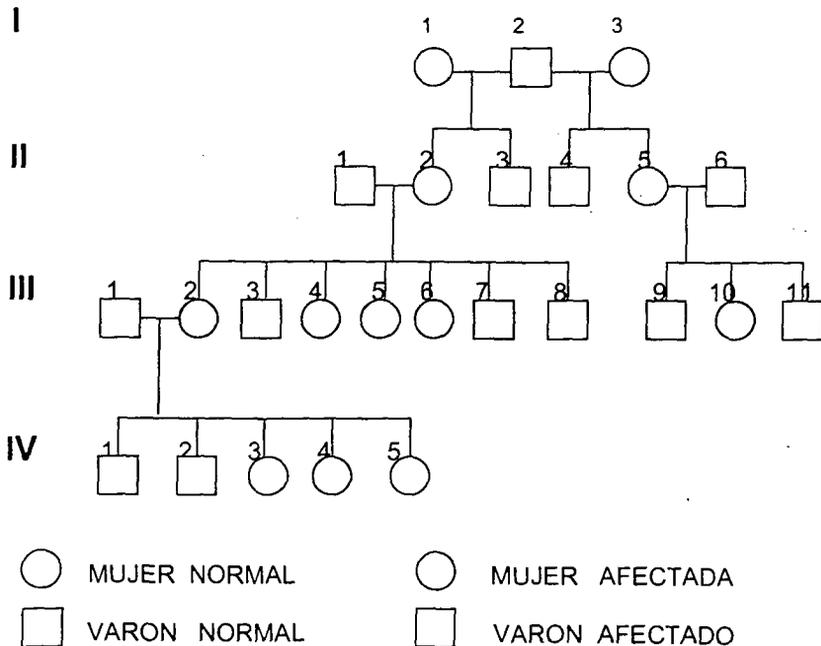
En este estudio establecimos una doble estrategia de diagnóstico: 1.- Amplificar las secuencias repetitivas CGG y 2.- Determinar el estado de metilación de las islas CpG en el gen FMR1. En 52 individuos de 32 familias se trató una alícuota de ADN genómico con bisulfito de sodio, el cual convierte las citosinas no metiladas en uracilo. Luego se realizó RCP utilizando iniciadores para la secuencia modificada y los productos se corrieron en geles de poliacrilamida. Con este procedimiento se espera amplificar las islas CpG metiladas (+ de 200 repeticiones) y por otro lado, las secuencias CGG con menos de 120 repeticiones (normales y portadoras). De 52 individuos estudiados se logró amplificar las islas CpG (metiladas) en 8 de ellos. Como era de esperarse, en estos pacientes no amplificó la secuencia que contiene las repeticiones CGG, lo que por otro lado, sí fue posible en los controles sanos.

SINDROME X-FRAGIL

El síndrome X-Frágil, llamado también síndrome Martín Bell, representa la causa heredable más común de retardo mental(1-3). Su frecuencia es de aproximadamente 1 en 1500 hombres y 1 en 2500 mujeres, y está asociado con la expresión citogenética del sitio frágil Xq27.3 (FRAXA) (4). El padecimiento se transmite como una entidad mendeliana ligada al cromosoma X mediante un mecanismo inusual de herencia (3, 5 - 6) (Figura 1).

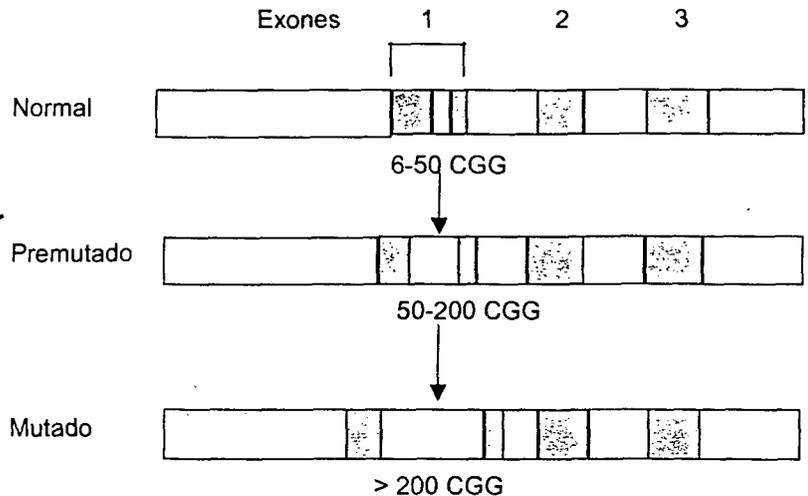
El síndrome muestra penetrancia incompleta; solo un 80% de los hombres con la mutación muestran la enfermedad. Por otro lado, un 20 % de las mujeres, heterocigotas para la mutación, muestran también la enfermedad (7 - 9).

FIGURA 1. ARBOL GENEALOGICO MOSTRANDO EL MECANISMO INUSUAL DE HERENCIA DEL SINDROME X-FRAGIL.



La mutación que causa el síndrome X-Frágil es una amplificación trinucleotida CGG del primer exón en la región no traducible 5' del gen FMR1 (Frágil-X Mental Retardation 1) (10). Esta región es normalmente polimórfica en contenido y longitud en individuos normales, conteniendo de 6 a 50 repeticiones mientras que en individuos afectados el segmento contiene entre 200 a 1000 o más repeticiones, lo que se considera una mutación completa. Alelos con 50 a 200 repeticiones se consideran en estado premutado (7, 9, 11) (Figura 2).

FIGURA 2. ESQUEMA DEL GEN FMR1 CONTENIENDO LAS REPETICIONES CGG



CUADRO CLINICO

El fenotipo clínico de los pacientes con el síndrome X Frágil incluye anomalías físicas, retardo mental y trastornos de la conducta. En edad puberal las características más sobresalientes son: macrocefalia, cara alargada, orejas prominentes, macrorquidismo, hiperextensibilidad de articulaciones pequeñas, prolapso mitral, piel fina, hipotonía, convulsiones, etc.

En edad prepuberal, los hallazgos pueden ser más inespecíficos; el macrorquidismo está presente en alrededor del 10% de los casos. Presentan también hiperquinesia, inestabilidad emocional, movimientos estereotipados y conducta autista. Aproximadamente el 10% de los varones autistas, son X-Frágil positivos.

En la etapa preescolar, el retardo mental puede no ser tan evidente, en cambio sí lo son los trastornos del lenguaje. A pesar de toda esta gama de anomalías, del 10 al 15% de afectados presentan únicamente retraso mental (3 - 5, 7, 8, 10).

HERENCIA

A partir de la primera descripción por Martin Bell, (1943), de pacientes con retardo mental heredándose en forma ligada al cromosoma X, se había observado una serie de irregularidades en la transmisión de este padecimiento, como el hecho de que algunos varones con fenotipo, desarrollo mental y cariotipo normales podían transmitir la enfermedad (8, 10).

En 1969 Lubs describió un varón con retardo mental (RM) y un sitio Frágil (constricción secundaria) en la parte distal del brazo largo del cromosoma X. Posteriormente se denominó síndrome X-frágil a la coexistencia de retardo mental (RM) con el sitio frágil en el cromosoma X (3).

Paradoja de Sherman: Luego de estudiar una serie muy grande de familias, Sherman y col. (12, 13) propusieron que la penetrancia y segregación del gen en sucesivas generaciones se caracteriza por una serie de hechos, que no tenían explicación y que en conjunto se denominó la "*Paradoja de Sherman*". Así:

- El sexo y el coeficiente intelectual del portadora influyen en la expresión del RM en sus hijas.

- Los hijos con X-frágil, de madres afectadas tienen un 100% de penetrancia, es decir, manifiestan la enfermedad, en cambio los hijos de madres normales tienen una penetrancia del 76%; esto implica que los varones transmisores sanos (VTS) son hijos de madres normales.
- Las madres, hijas y hermanos de VTS tienen muy poca penetrancia de RM, en comparación con los parientes de primer grado de los varones afectados.
- Las madres de VTS tienen mucha menor probabilidad de tener un hijo con RM (penetrancia 18%) en comparación con las hijas de esos mismos VTS (penetrancia 74%).

Estas observaciones llevaron al planteamiento de distintas hipótesis que trataron de explicar los mecanismos causantes de la enfermedad (8).

En 1985, Pembrey postuló que existiría una premutación en varones que sólo se convertiría en mutación al ser sometida al fenómeno de recombinación en las células originales hijas (14). Nussbaun y col. consideraron que la presencia del sitio frágil Xq27.3 podría favorecer una recombinación no homóloga y ser ésta la lesión inicial o premutación, de modo que en sucesivas meiosis, el apareamiento con otra secuencia similar del otro cromosoma X conllevara la amplificación de esas secuencias repetitivas (15). Friedman y Howard-Peebles argumentan que el sitio frágil podría ser consecuencia de la acción de elementos transponibles o virus (16). Steinbach (17) e Israel (18) en forma independiente sugirieron que podría intervenir un loci modificador autosómico en las manifestaciones de la enfermedad, aunque el hecho de que la fragilidad se mantuviera en híbridos celulares que tenían sólo el cromosoma X humano, cuestiona la existencia de dichos loci. (19). Warren consideró que la fragilidad observada "in vitro" también ocurriría "in vivo", lo que llevaría a la producción de un mosaicismo nulisómico para los genes distales (20). Laird propuso en 1987 que la mutación del gen es Fra-X condicionaría una alteración en el proceso de reactivación del cromosoma X en la meiosis, permaneciendo inactivo en la zona correspondiente el gen, de modo que dicho sector del cromosoma continuaría en sucesivas generaciones con dicha inactivación, marca o "imprinting" (21).

Este proceso involucraría en forma teórica una metilación diferencial en el ADN, aunque Khalifa y col. (22) no hallaron evidencia de que la metilación del ADN en zonas vecinas al locus Fra-X tuviera un papel en la producción del síndrome.

Gracias al análisis de las secuencias de los repetidos del gen FMR1 en diferentes poblaciones humanas, se cree que la secuencia ancestral relacionada con el síndrome fue una secuencia pura de CGG, carente de las interrupciones AGG (23-26). Esto plantea una posible explicación para la expansión de los repetidos, en la cual la DNA polimerasa, copia equivocadamente varias veces la misma secuencia de repetidos, durante la replicación de la hebra rezagada del DNA. (23, 24)

SITIO FRAGIL

El sitio Frágil Xq27.3, es un sitio frágil raro, sensible a la concentración de folatos y timidina en el sistema de cultivo celular. El Fra(X) (q27.3) es observable como un gap (región no teñida) o una ruptura verdadera (5, 15) (Figura 3).

FIGURA 3. CARIOTIPO HUMANO CON SITIO FRAGIL.



La flecha muestra un gap en Xq27.3

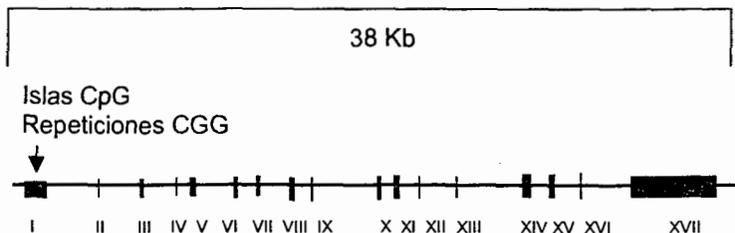
En el aspecto bioquímico, el sitio frágil es posiblemente consecuencia de la alteración en la síntesis del ADN ocasionada por una disminución del desoxitimidinamonofofato (dTMP), resultante a su vez de una deficiencia de ácido fólico (5, 15, 27).

La deficiencia de ácido fólico *in vitro*, ya sea porque el medio de cultivo carece o contiene menos de 0.2mg/L o por el uso de inhibidores del metabolismo del mismo (metotrexate o fluorodesoxiuridina), es indispensable para que ocurra la expresión del sitio frágil (5, 27 - 31).

GEN FMR1

Desde 1991 el gen FMR1 ha sido aislado y secuenciado. Mide 38Kb y consta de 17 exones y 16 intrones y está altamente conservado entre las especies (Figura 4). El hallazgo más importante en este gen ha sido la identificación de un segmento de repeticiones CGG que forman parte de las islas CpG, mismas que se encuentran diseminadas en todo el genoma (32-33). Por otro lado se han descubierto secuencias AGG denominadas estabilizadoras las cuales se encuentran intercaladas cada 9 o 10 repeticiones CGG (9, 33).

FIGURA 4. ESTRUCTURA DEL GEN FMR1



Aparentemente el gen FMR1 se expresa en todos los tejidos, pero es más alta en cerebro, placenta y gónadas de individuos normales (35).

El incremento de la secuencia repetitiva CGG a más de 200 tripletes, desencadena un proceso de sobremetilación de esta región que, como se había dicho, es parte de las islas CpG, dando lugar a la inactivación del gen FMR1 e impidiendo el proceso de transcripción y por ende la síntesis de la proteína (5, 9, 10). El hecho de existir pacientes con deleciones o mutaciones puntuales sin la expansión de los tripletes CGG, confirma que este gen es el responsable de esta enfermedad.

Esto se ha apoyado por el hecho de que ratones transgénicos afectados en el gen FMR1 y generados por técnicas de recombinación homóloga, presentaron características compatibles con el síndrome como el macroorquidismo, alteraciones cognitivas e hiperactividad (36 - 39).

PROTEINA FMR1 (FMRP)

En 1993 Siomi y col. (40) examinaron la secuencia descrita por Verker (1991) y caracterizaron al producto génico FMR1. Sus características más importantes son:

- Contienen una secuencia rica en arginina y glicina llamada caja "RGG" la cual está localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína, esta secuencia ha sido encontrada en las llamadas proteínas de unión al ARN.
- Muestra dos secuencias de repeticiones internas de aminoácidos (I/LV-I-G-X2-G,X2-I), estas repeticiones son similares entre sí con un 39%. Además estas repeticiones están altamente interespaciadas por residuos hidrofóbicos.
- Estas repeticiones abarcan 40 aminoácidos cada uno y se localizan entre los aminoácidos (286-321 y 347-382) (9, 40, 41) (Figura 5).

ANTECEDENTES

Procedimientos de diagnóstico:

Actualmente existen pruebas de diagnóstico molecular capaces de determinar en forma directa el tamaño de la secuencia repetitiva, tanto en individuos normales como en premutados y mutados. La utilización de Southern blot, asociado o no a reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y con o sin marcaje radioactivo permite el diagnóstico de estas mutaciones, pero desafortunadamente resulta compleja, costosa y requiere de mayor tiempo y esfuerzo (6, 42-44).

Debido a que la región en donde ocurre la mutación es rica en secuencias C+G, se forman estructuras secundarias por apareamiento entre ellas que impiden o dificultan la amplificación de estas secuencias por RCP simple, lo que ha llevado al uso de aditivos químicos como dimetilsulfóxido (DMSO) o formamida y de análogos de base como el 7-deaza-dGTP que, sustituyendo al GTP, evitan la formación de tales estructuras. Además se ha requerido de enzimas especiales como Pwo, Pfu o XL polimerasa (6, 45-49). Sin embargo, este procedimiento presenta varios problemas en su utilización :

1. El ADN que contiene el análogo de base migra más lentamente que el ADN intacto, por lo que se requiere de geles de poliacrilamida desnaturalizantes y marcadores especiales que, en su momento dificultan o impiden la tinción. En estas circunstancias se han utilizado también iniciadores marcados y teñidos con plata para posteriormente ser detectados por Southern blot (49).
2. Cuando las secuencias amplificadas se corren en geles de agarosa o poliacrilamida no pueden ser teñidos con bromuro de etidio debido a que el análogo altera su estructura electrónica impidiendo florecer (49-51).

Varios autores han propuesto que, sustituyendo parcialmente el análogo de base en proporción 3:1, se logran amplificar y teñir secuencias de tamaño normal. Sin embargo, existen reportes en los que se ha intentado reproducir esta metodología sin haber tenido éxito (49-54). En nuestro laboratorio, por espacio de varios meses, intentamos llevar a cabo este procedimiento sin lograr los resultados esperados.

Modificación del ADN con bisulfito de sodio:

La modificación del ADN por bisulfito de sodio fue descrita por Shapiro y col. y Hayatsu y col. en 1970 con el objeto de evitar los residuos 5-metilcitosina (5^mC), que participan en la metilación del ADN y que dan lugar a la inactivación en algunos genes durante el desarrollo (55-58).

Este procedimiento ha permitido la obtención de importantes conocimientos sobre el papel que tiene la metilación y el porqué ciertos genes son inactivados durante su desarrollo. Inicialmente este tratamiento fue utilizado para secuenciar los genes de interés y determinar en forma sensible las citosinas metiladas. Actualmente se ha propuesto su uso para evitar las estructuras secundarias y lograr amplificar secuencias repetitivas ricas en CG (59-63).

Recientemente, se ha propuesto la modificación del ADN para determinar el estado de metilación del gen FMR1 y la detección de la secuencia repetitiva CGG. De esta manera se podría utilizar la RCP simple sin el requerimiento de aditivos químicos, análogos de base o enzimas especiales, y ser teñido por cualquier técnica convencional. En estas circunstancias, este procedimiento resulta competitivo y ventajoso en comparación con el Southern blot asociado o no a RCP y con o sin marcaje radioactivo (49).

Este tratamiento consta de tres pasos para llevar a cabo la modificación:

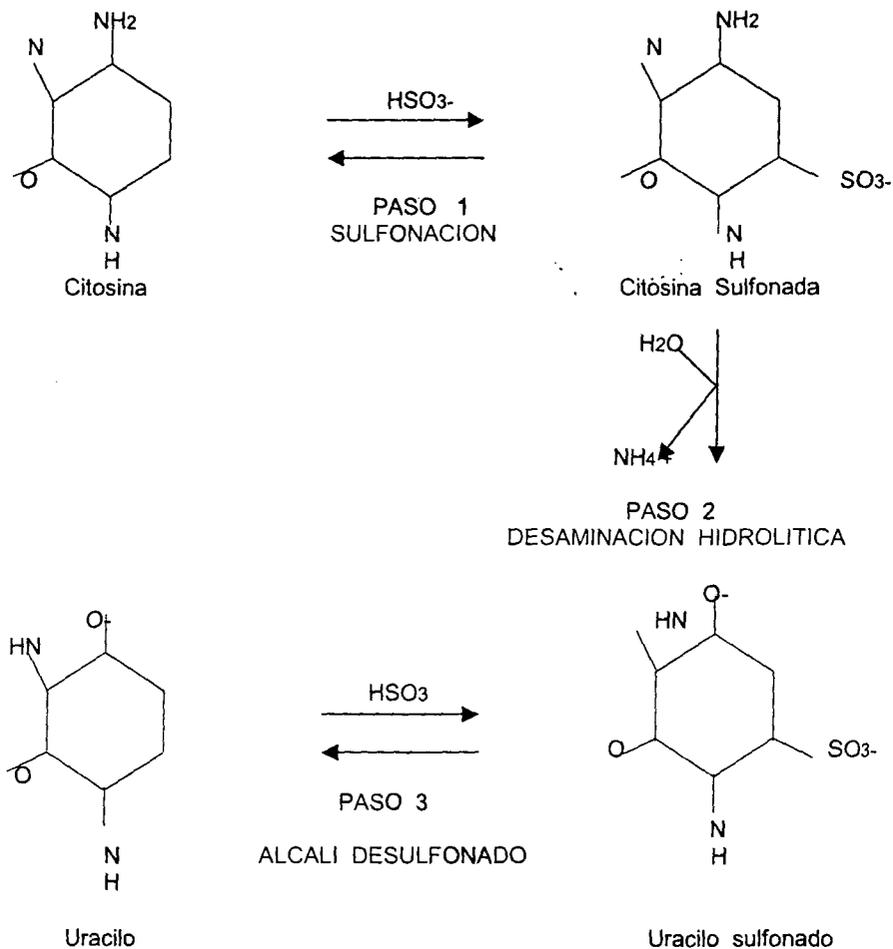
1. La adición del bisulfito de sodio a la doble unión de los carbonos 5-6 de la citosina.
2. Desaminación hidrolítica del complejo citosina-bisulfito, que da lugar a un complejo uracilo-bisulfito.
3. Remoción del grupo sulfonado por tratamiento con un álcali, resultando en un uracilo (55-59) (Figura 6).

Una de las características del ADN tratado con bisulfito es que las cadenas resultantes ya no son complementarias una de otra. Obviamente es necesario diseñar iniciadores específicos para amplificar este ADN modificado (49, 55, 60, 62-63).

El efecto del bisulfito en las cadenas varía dependiendo del estado de metilación del gen, esto significa que en la cadena 5'-3' de individuos sanos y portadores de la premutación, las citosinas de las secuencias repetitivas CGG y de las islas CpG adyacentes (no metiladas), son convertidas en uracilo (UGG y UpG), mientras que en la cadena 3'-5', las 2 citosinas de la secuencia repetitiva CCG son convertidas en uracilos (UUG). Por otro lado, en aquellos individuos con la mutación completa, la secuencia repetitiva CGG y las islas CpG en la cadena 5'-3' se encuentran metiladas, por lo que la modificación no ocurre, mientras que en la cadena 3'-5', en la que una de las citosinas está metilada (C^mCG), ocurre modificación de la C no metilada C^mUG (49) (Figura 6 y 7).

Con el tratamiento con bisulfito, la cadena antisentido (3'-5') disminuye en un 67% su contenido de guaninas mientras que en la cadena con sentido (5'-3') disminuye solo un 33% (49).

FIGURA 6. ESQUEMA DE LA MODIFICACION DEL ADN POR BISULFITO DE SODIO



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la complejidad y riesgo en el uso de métodos basados en Southern blot y, la ineficiencia de la amplificación por RCP simple con ayuda de análogos de base, la modificación del ADN con bisulfito de sodio es una alternativa útil en la determinación del tamaño de las secuencias repetitivas CGG en individuos normales y portadores de la premutación X-Fra. Por otro lado, este mismo procedimiento permitiría amplificar las islas CpG metiladas en los individuos que portan la mutación completa y conocer el estado activo o inactivo del gen.

Una estrategia, basada en la utilización simultánea de los dos procedimientos en cada individuo nos permitiría conocer el tamaño de la secuencia repetitiva CGG y/o el estado de metilación del gen FMR1?

HIPOTESIS

La detección de las repeticiones CGG y del estado de metilación de las islas CpG en el gen FMR1, se logra por RCP simple mediante la modificación del ADN por bisulfito de sodio.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

1. Determinar el numero de repeticiones CGG y el estado de metilación del gen FMR1.

- **Objetivos específicos**

1. - Estandarizar el procedimiento de RCP en ADN modificado por bisulfito de sodio.
2. - Validar el procedimiento en un número de individuos normales y en pacientes con diagnóstico clínico de síndrome X-frágil y en sus familiares.

CRITERIOS DE INCLUSION

1. Controles negativos: Hombres y mujeres sanos sin antecedentes familiares de retardo mental.
2. Controles positivos: Pacientes con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-Frágil.
3. Pacientes con diagnóstico clínico de síndrome X-Frágil.
4. Familiares en primer grado del propósito (excepto el padre).
5. Familiares en segundo grado, por vía materna, del propósito.
6. Aceptación verbal a participar en el estudio.

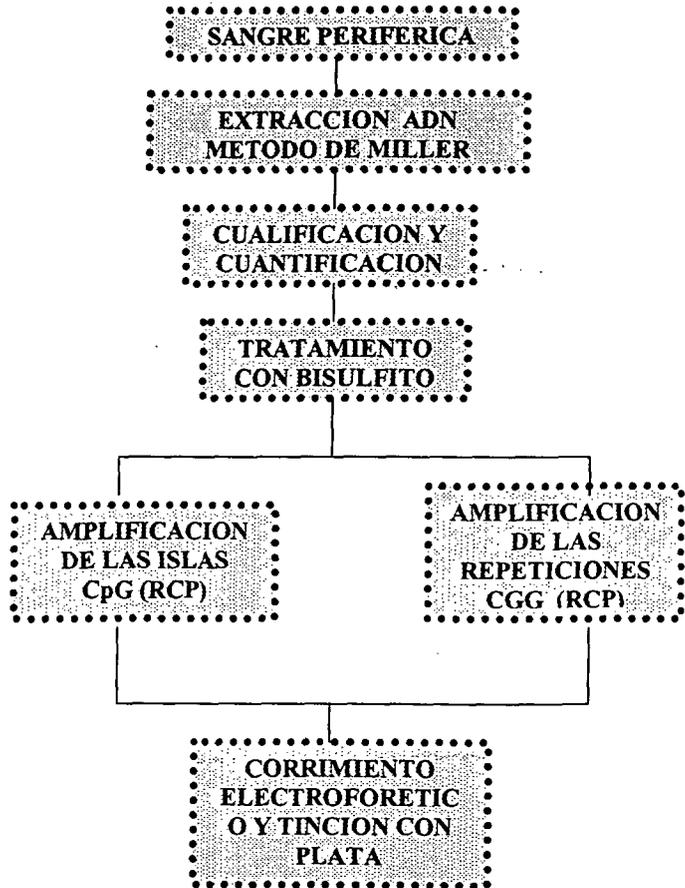
CRITERIOS DE EXCLUSION

No aceptación a participar en el estudio.

CRITERIOS DE ELIMINACION

Pacientes en los que no se logró una muestra de ADN en suficiente cantidad o calidad.

Diagrama de flujo



ESTRATEGIA

Determinación del número de repeticiones CGG

Por la ubicación de los iniciadores empleados, la secuencia a amplificar tendrá 215 pb. más el tamaño de la secuencia repetitiva CGG que es particular para cada caso (49) (Figura 7). Para determinar el número de repeticiones CGG se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{N}^\circ \text{ de repeticiones CGG} = \frac{\text{Tamaño del amplificado en pares de bases} - 215}{3}$$

Los iniciadores son diseñados para amplificar la cadena 3'-5' (antisentido) y se pegarán a ésta solamente cuando las citosinas no metiladas hayan sido convertidas en uracilo, lo que significa que los iniciadores se alinearán únicamente con las secuencias de individuos sanos y portadores de la premutación

Determinación del estado de metilación de las islas CpG:

En varones con la mutación completa y en mujeres sanas se amplificarán las islas CpG del gen FMR1 que están metiladas. En ambos casos los iniciadores están diseñados para amplificar únicamente las secuencias que tienen citosinas y que no fueron modificadas por estar metiladas. Se espera un amplificado de 80 pb (49) (Figura 8).

Muestra

La muestra estuvo conformada por todos los individuos que cumplían con los criterios de inclusión enviados de la consulta externa de Genética de los hospitales de Pediatría, Especialidades y Ginecoobstetricia del Centro Médico de Occidente del IMSS, entre noviembre de 1998 y septiembre del 2000.

FIGURA 7. TRATAMIENTO CON BISULFITO PARA AMPLIFICACION DE LAS REPETICIONES CGG

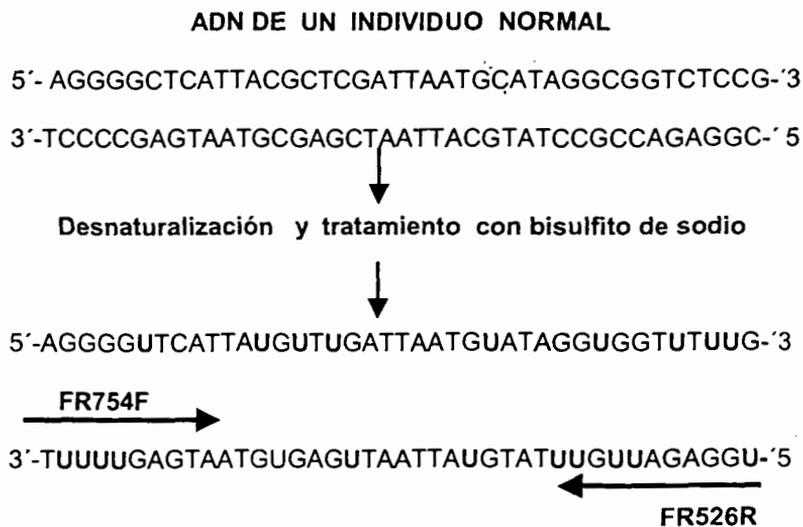
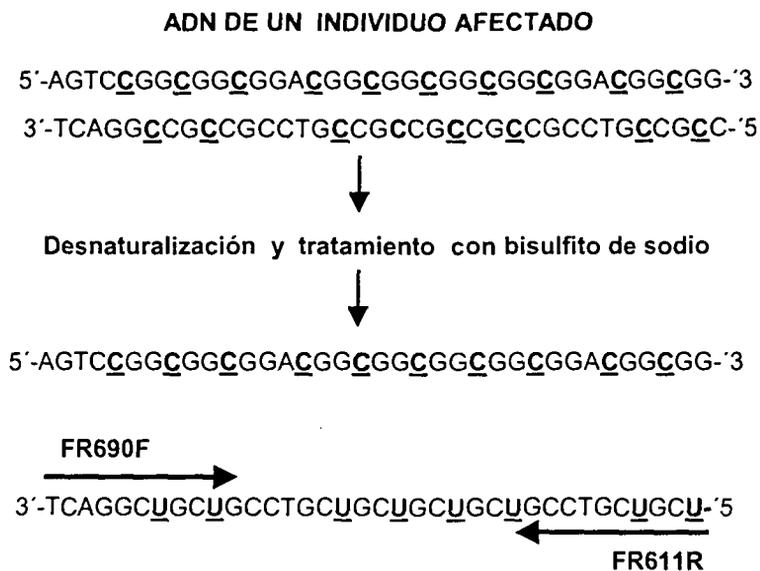


FIGURA 8. TRATAMIENTO CON BISULFITO PARA LA AMPLIFICACION DE LAS ISLAS CpG



Obtención de la muestra:

De cada individuo captado para el estudio se colectaron de 5 a 10 ml de sangre periférica (por punción venosa en un tubo con sistema de vacío, vacutainer Beckton Dickinson) con EDTA al 10%.

Obtención del paquete de leucocitos:

De cada muestra de sangre periférica se realizó la separación de leucocitos mediante una solución de lisis de eritrocitos (10:1 de NH_4CL 0.144M y NH_4HCO_3 0.01M). Se agregaron 10 ml de esta solución de lisis a la muestra de sangre, se mezcló por inversión y se dejó reposar durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante; después se agregaron otros 10 ml de la solución de lisis, se resuspendió el paquete de leucocitos y se repitió este mismo procedimiento hasta que el paquete de leucocitos estuviera libre de eritrocitos (64).

Extracción de ADN genómico:

La lisis de leucocitos y la extracción de ADN se realizó por el método de Miller, el cual involucra la saturación con sales de las proteínas celulares por deshidratación y precipitación con una solución saturada de cloruro de sodio.

El paquete de leucocitos se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis (Tris-HCL 10mM, NaCL 400mM, y Na_2EDTA 2mM pH 8.2) posteriormente se agregó 0.2ml de SDS al 10% y 0.5 ml de solución de proteinasa K (1mg de proteinasa K en SDS al 1% y Na_2EDTA 2mM pH 8.2).

Se incubó el paquete de leucocitos en esta solución a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó 1ml de una solución saturada de NaCl 6M y se mezcló vigorosamente durante 15 segundos. El sobrenadante se pasó a otro tubo de plástico de 50ml y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se invirtió lenta y repetidamente el tubo hasta que el ADN precipitó.

Las cadenas del ADN precipitado se tomaron con una punta estéril y se pasaron a un tubo de micro centrifuga de 1.5ml estéril que contenía de 100-200 μ l de buffer TE (Tris-HCL 10mM, y Na₂EDTA 2mM pH 7.5) (64).

Determinación de la concentración y calidad del ADN:

Mediante espectrofotometría y electroforesis se determinó la concentración y pureza del ADN. Las muestras cuya cantidad y pureza fueron aceptables (concentración mayor a 1 μ g/ μ l) para el análisis, se almacenaron a -20°C (65).

Tratamiento con bisulfito de sodio:

Las muestras de ADN cuya cantidad de ADN fue aceptables se sometieron al tratamiento con bisulfito de sodio. (44-45).

Para la modificación se realizaron los siguientes pasos:

1. 5 μ g de ADN genómico se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos.
2. Se incubó el ADN a 37°C por 30 minutos con NaOH a una concentración final de 0.3M.
3. Se incorporó el bisulfito de sodio (pH 5) Hidroquinona a una concentración final de 3.1M y 0.5 mM en un volumen de 500 μ l, incubándolo a 55°C por 16 horas con 150 μ l de aceite mineral.

4. Se procedió a desalar el ADN con el Kit Wizard DNA clean up system de Promega (siguiendo sus instrucciones).
5. Se transfirió el ADN con el bisulfito a un tubo de 1.5ml estéril procurando no llevarse el aceite mineral, se agregó 1ml de DNA-Clean-Up-Resin y se mezcló varias veces por inversión.
6. Se transfirió la mezcla resina-DNA a la base de la columna, se aplicó vacío.
7. Se añadió 2ml de isopropanol al 80% a la base de la columna y se aplicó vacío.
8. Nuevamente se aplicó vacío por 30 segundos, se removió la base de la columna y se colocó la columna en otro tubo de 1.5ml estéril.
9. Se centrifugó la columna a 10,000rpm por 2 minutos para remover los residuos del isopropanol.
10. Se transfirió la columna a otro tubo de 1.5ml estéril, se aplicó 50µl de H₂O grado HPLC, precalentada (65-70°C), y se dejó reposar por 1 minuto, se centrifugó la columna por 20 segundos a 10,000 rpm.
11. Se descartó la mini columna, se adiciono al tubo NaOH a una concentración final de 0.3M, se incubó a 37°C por 15 minutos.
12. La solución fue neutralizada por adición de acetato de amonio (pH 7.0) a una concentración final de 3M.
13. Se precipitó al ADN con 4 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó por 5 minutos a 10,000rpm y se descarto el sobrenadante, se dejó secar por 24 horas y se resuspendió en 50µl de H₂O grado HPLC (43).

Amplificación de la región que contiene las repeticiones CGG y las Islas CpG por la reacción en cadena de la polimerasa:

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es un procedimiento enzimático, in vitro, en el que se amplifica un segmento específico de ADN.

Para esta metodología se requiere:

- 1) Tres segmentos de ácido nucleico:
 - a) El ADN de doble cadena que va a ser amplificado
 - b) y 2 fragmentos de ADN de cadena simple a los que se les denomina iniciadores que flanquean el fragmento de ADN que va ser amplificado.
- 2) Enzima amplificadora (Taq DNA polimerasa)
- 3) Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's)
- 4) Buffer de reacción.
- 5) MgCl₂

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó la cadena antisentido de (3' a 5') del gen FMR1 el cual contiene a las Islas CpG y a las secuencias repetitivas CGG (49).

Iniciadores para las islas CpG :

- **FR611R:** (CGT CGT CGC GTT GTC GTAC) N = 19

- **FR690F:** (AAC GAC GAA CCG ACG ACG) N = 18

Iniciadores para las repeticiones CGG:

- **FR526R:** (GGG AGT TTG TTT TTG AGA GGT GGG) N = 24
- **FR754F:** (CAA CCT CAA TCA AAC ACT CAA CTC CA) N = 26

Condiciones de amplificación para las repeticiones CGG:

La reacción se realizó bajo el siguiente programa, durante 32 ciclos:

1. Desnaturalización inicial 5 min. a 95°C
2. Desnaturalización 1 min. a 95°C
3. Alineación de iniciadores 1 min. a 58°C
4. Extensión 2 min. a 74°C.
5. Ir del paso 2 al 4 (31) veces
6. Extensión final 10 min. a 74°C

Mantener 4°C (opcional).

Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25µl, en tubos eppendorf de 0.2 ml

Mezcla de reacción:

- 1X PCR Buffer
- 1X PCR Enhancer Solution
- MgSO₄ 2mM
- Iniciador (FR526R) 25pmol
- Iniciador (FR754F) 25pmol
- dNTP's (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0.2mM de c/u.
- (Platinum Taq DNA polimerasa 1U)
- 2µl de ADN tratado con bisulfito

Condiciones de amplificación de las islas CpG:

La reacción se realizó bajo el siguiente programa, durante 32 ciclos:

1. Desnaturalización inicial 5 min. a 94°C
2. Desnaturalización 30 seg. a 93°C
3. Alineación de iniciadores 30 seg. a 63°C
4. Extensión 30 seg. a 74°C.
5. Ir del paso 2 al 4 (31) veces
6. Extensión final 10 min. a 74°C
Mantener 4°C (opcional).

Mezcla de reacción:

- Buffer 10X (1X).
- MgCl₂ 3mM
- Iniciador (FR611R) 25pmol
- Iniciador (FR690F) 25pmol
- dNTP's (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 0.2mM de c/u.
- (Taq DNA polimerasa 1.25 U)
- 2µl de ADN tratado con bisulfito.

Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25µl, en tubos eppendorf de 0.2 ml

Control interno:

No pudimos usar, como control interno del proceso de amplificación, una secuencia en el ADN modificado por no disponer de iniciadores modificados. En su lugar se utilizó una secuencia de ADN no modificado.

El sistema de reacción fue el siguiente, se mezcló ADN e iniciadores no modificados con el ADN modificado y sus iniciadores específicos, en el mismo volumen de reacción y las mismas condiciones de amplificación. Los iniciadores no modificados utilizados fueron para el sitio XmnI, localizado en el intrón C del gen del factor VIII. El tamaño del amplificado como control interno es de 222pb.

Iniciadores utilizados como control interno. (66)

- XmnI-F: (5'-AAT CAG AGA CTG CTG ATT GAC TT-3') N = 23
- XmnI-R: (5'- AAA CAG CCA GAT AAA GCC TCC A-3') N = 22

Separación de los productos amplificados por electroforesis en geles de poliacrilamida:

- **Preparación de las muestras amplificadas:**

De cada producto amplificado de las 2 RCP realizadas, se le adicionaron 5µl de buffer cargador. Enseguida se aplicaron las muestras en un gel de poliacrilamida al 12% (poliacrilamida 29:1).

- Se utilizaron 3 marcadores de peso molecular de diferentes tamaños para determinar el tamaño de las repeticiones:
 1. 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL)
 2. 50 bp DNA Ladder (Gibco BRL)
 3. 25 pb DNA Ladder (Gibco BRL)

- **Preparación del gel de poliacrilamida:**

Gel de poliacrilamida al 12%

Relación 29:1

- 18.4 ml de poliacrilamida 29:1(29 g de acrilamida, 1 g de bis-acrilamida en 100ml)
- 4.6 ml de buffer TBE 10X (EDTA 0.02M, Tris 0.89M, Ácido bórico 0.89M) pH 8.0.
- 22.50 ml de H₂O desmineralizada
- 460µl de persulfato de amonio al 10%
- 46µl de temed

Se dejó polimerizar por 30 minutos, y se colocó buffer de corrimiento (TBE 1X) dejándolo precorrer por 1 hora a 100 volts , se aplicaron las muestras. Se dejó correr por 9 horas a 150 volts / 25mA.

Tinción con nitrato de plata para geles de poliacrilamida

1. Fijación en solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 0.5%) por 10 minutos, eliminar.
2. Tinción con Nitrato de plata al 0.2% disuelto en solución fijadora, por 10 minutos, eliminar.
3. Enjuágar con agua bidestilada por 1 minuto.
4. Agregar solución reveladora (NaOH 3.0%, formaldehído 0.5%) hasta la aparición de bandas(10-20 minutos) eliminar.
5. Enjuagar con solución fijadora por 5 minutos.

Preparación de soluciones:**Solución fijadora**

Etanol absoluto 10% _____ 100ml

ácido Acético 0.5% _____ 5ml

Aforar a 1 litro con agua bidestilada.

Nitrato de plata

AgNO₃ 0.2% _____ 0.2g

Aforar a 100ml con solución fijadora.

Solución reveladora

NaOH 3.0% _____ 30g

Formaldehído 0.5% _____ 5ml

Aforar a 1 litro con agua bidestilada.

RESULTADOS

El análisis, mediante RCP, de las repeticiones CGG y las Islas CpG adyacentes en el gen FMR1, se realizó en 52 individuos que incluyeron 32 propósitos y 20 de sus familiares pertenecientes a 32 familias, enviados con diagnóstico clínico de X-Frágil de la consulta externa de Genética de los hospitales de Pediatría, Ginecoobstetricia y Especialidades del Centro Médico de Occidente del IMSS, entre noviembre de 1998 y septiembre del 2000 (Cuadro 1).

**CUADRO 1.
DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS PACIENTES Y
FAMILIARES ESTUDIADOS**

	Varones	Mujeres	Total
Propósitos	31	1	32
Familiares	3	17	20
Total	34	18	52

Determinación de las secuencias repetitivas CGG.

La amplificación de las secuencias repetitivas CGG se logró en 26 de los 34 pacientes varones y en todas las 18 mujeres (Cuadro 2). En 8 de los 31 individuos varones, enviados como casos índices, no se logró la amplificación de la secuencia CGG; en todos estos individuos el control interno utilizado amplificó adecuadamente (Figuras 9 y 10). La **no amplificación** en estos pacientes, es interpretada, según la estrategia planteada, como evidencia de que la secuencia repetitiva CGG está incrementada en más de 120 tripletes.

El tamaño de los segmentos amplificados, en los individuos analizados, varió entre 5 y 31 repeticiones CGG, ubicándose dentro de lo que se conoce como rango normal. Solamente una mujer mostró, además de su alelo normal, un alelo de 62 repeticiones, considerado en el rango de premutación. En la mayor parte de las mujeres analizadas se observaron 2 alelos de tamaño diferente; en algunos casos se observó que los dos alelos eran de tamaño muy similar e incluso mostrándose como una sola banda de mayor intensidad.

10 individuos, incluyendo 5 varones y 5 mujeres, fueron estudiados como grupo control. En todos ellos se dio la amplificación de las repeticiones CGG con rangos de tamaño normal. En las 5 mujeres ocurrió también la amplificación de las islas CpG.

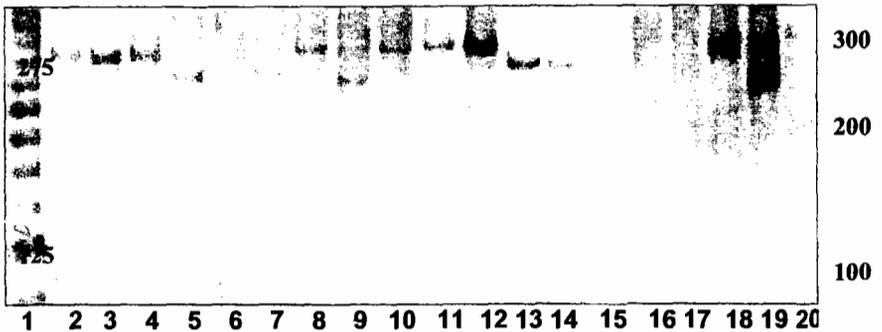
**CUADRO 2.
AMPLIFICACION DE LAS REPETICIONES CGG EN PROPOSITOS Y FAMILIARES**

	Amplificaron		No amplificaron		Total
	Propósitos	Familiares	Propósitos	Familiares	
Varones	23	3	8	0	34
Mujeres	1	17	0	0	18
Total	24	20	8	0	52

**CUADRO 3.
AMPLIFICACION DE LAS ISLAS CpG EN PROPOSITOS Y
FAMILIARES**

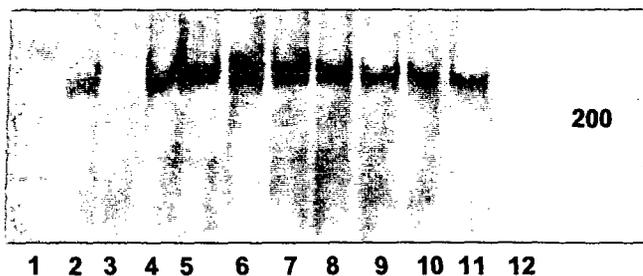
	Amplificaron		No amplificaron		Total
	Propósitos	Familiares	Propósitos	Familiares	
Varones	8	0	23	3	34
Mujeres	1	17	0	0	18
Total	9	17	23	3	52

FIGURA 9.
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LOS
PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LAS SECUENCIAS
REPETITIVAS CGG.



Carril 1: marcador de 25pb. Carril 2: Varon control. Carriles 3-5, 7-8, 10-14 : Varones sanos. Carriles 6, 15-17: Varones afectados. Carril 9: Mujer sana. Carriles 18-19: Mujeres control. Carril 20: marcador de 100pb.

FIGURA 10:
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LOS
PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON EL CONTROL INTERNO
PARA LAS REPETICIONES CGG.



Carril 1: Varon sano sin control interno.
Carriles 2, 4-11: Control interno en varones afectados.
Carril 3: Varon afectado sin control interno.
Carril 12: marcador de 100pb.

Madres y hermanas de pacientes con incremento de la secuencia CGG:

De los 8 individuos considerados afectados, pudimos estudiar a las madres de solo 4 de ellos y a una de sus hermanas. En las 4 madres se logro amplificar solo un alelo en cada una de ellas; en la hermana estudiada amplificaron ambos alelos (Cuadro 4).

**CUADRO 4.
DISTRIBUCION DEL NUMERO DE REPETICIONES CGG
EN MADRES Y HERMANAS DE VARONES AFECTADOS**

	Repeticiones CGG < 50		Repeticiones CGG 50-120
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 2
MADRES	4	-	-
HERMANAS	1	1	-

Madres y hermanas de pacientes sin incremento de la secuencia CGG:

En 11 pacientes, de los que fueron enviados con diagnóstico clínico de X- Frágil y cuyo resultado molecular descarto alteración en el gen FMR1, se pudo estudiar a sus madres y en un caso a su hermana. En 10 madres los alelos amplificados fueron de tamaño normal; solo en una de ellas, un alelo mostró tener 62 repeticiones, considerándose como una permutación.

**CUADRO 5.
DISTRIBUCION DEL NUMERO DE REPETICIONES CGG
EN MADRES Y HERMANAS DE VARONES SANOS.**

	Repeticiones CGG < 50		Repeticiones CGG 50-120
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 2
MADRES	11	10	1
HERMANAS	1	1	0

Determinación del estado de metilación de las islas CpG.

La amplificación de las islas CpG adyacentes a la secuencia repetitiva CGG en el gen FMR1 se logra, según la estrategia implementada, solo en los casos en los que esta región se encuentra metilada, lo que ocurre, en forma normal, en el cromosoma X inactivo de las mujeres y en el cromosoma X de los varones cuando el gen FMR1 se metila por la presencia de una secuencia repetitiva que sea igual o mayor de 200 tripletes CGG.

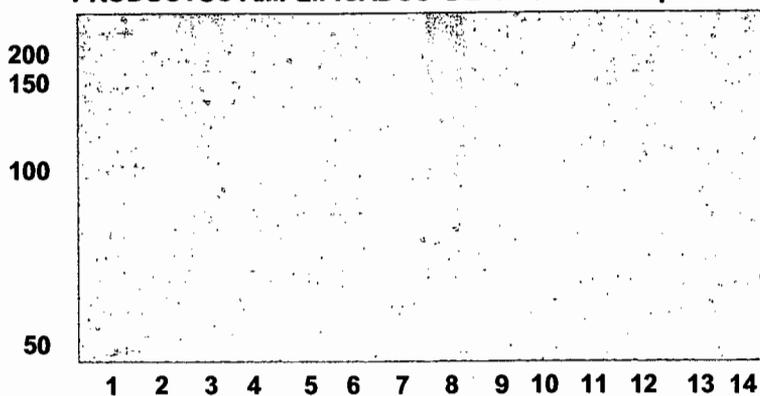
De los 31 varones enviados como propósitos, en 8 se dio la amplificación de las islas CpG así como del control interno utilizado en la prueba (Cuadro 6). Estos individuos son exactamente los mismos en los que no amplificó la secuencia repetitiva CGG. En las 18 mujeres analizadas, entre las que se incluye una propósita, hubo amplificación de esta secuencia (Figuras 11 y 12)

Por la metodología usada, solo podemos suponer que la secuencia amplificada corresponde al cromosoma X inactivo normal en estas mujeres. Sin embargo, el hecho de que en todas ellas se logró la amplificación de las secuencias repetitiva CGG, apoya esta presunción.

**CUADRO 6.
AMPLIFICACION DE LAS ISLAS CpG EN PROPOSITOS Y
FAMILIARES**

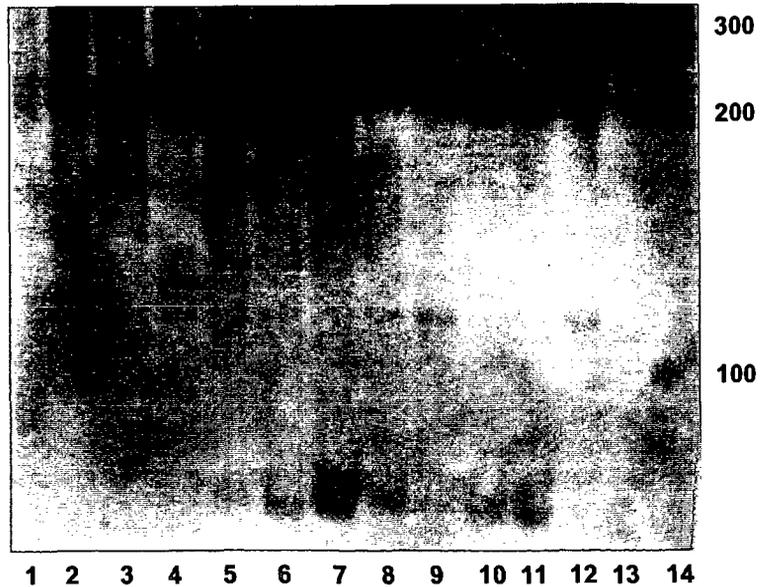
	Amplificaron		No amplificaron		Total
	Propósitos	Familiares	Propósitos	Familiares	
Varones	8	0	23	3	34
Mujeres	1	17	0	0	18
Total	9	17	23	3	52

**FIGURA 11:
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LOS
PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LAS ISLAS CpG.**



Carril 1: marcador de 50pb. Carriles 2-4, 7-14: Varones Sanos. Carriles 5-6: Varones afectados.

FIGURA 12:
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LOS
PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON EL CONTROL INTERNO
PARA LAS ISLAS CpG.



Carriles 1-3, 13: Varones sanos. Carriles 4-6, 10-12: Varones
Afectados. Carriles 7-9: Mujeres con amplificación del
Cromosoma X inactivo. Carril 14: marcador de 100pb.

DISCUSION

Desde el descubrimiento de que la expansión de la secuencia repetitiva CGG en el gen FMR1 es la causa del síndrome X-Frágil, varios métodos han sido propuestos para determinar el tamaño de dicha secuencia, lo cual define si el gen FMR1 se encuentra activo o inactivo y, por ende, si existe o no, expresión de la proteína. Los métodos basados en Southern blot resultan complejos y costosos, en tanto que los basados en la amplificación del segmento repetitivo mediante RCP simple resultan ineficientes:

Por lo tanto, una propuesta basada en la modificación del ADN mediante tratamiento con bisulfito de sodio, seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores sobre la cadena antisentido, que permitiría determinar tanto el tamaño de la secuencia repetitiva como el estado de metilación del gen FMR1, resulta sumamente interesante y de fácil realización. En estas circunstancias nos propusimos este estudio con la intención de validar el procedimiento en su utilidad para diagnosticar molecularmente, en forma fácil y eficiente, los pacientes con presunción diagnóstica de síndrome X-Frágil.

Si bien este procedimiento tiene el inconveniente de amplificar secuencias de no más de 120 pares de bases, la estrategia de estudiar conjuntamente el estado de metilación de las islas CpG adyacentes, permite confirmar los resultados previos y eliminar las dudas en la mayor parte de casos.

En este estudio se analizaron 52 individuos pertenecientes a 32 familias. En 8 de los 31 casos índices no se logró la amplificación de la secuencia repetitiva CGG, en tanto que el control interno usado amplificó adecuadamente en todos ellos.

Esto es interpretado como evidencia indirecta de que la secuencia repetitiva es demasiado grande (más de 120 triplete) para ser amplificada por este procedimiento. Por otro lado, el hecho de que en estos mismos pacientes sí amplificó la región de islas CpG, nos demuestra que estas regiones están metiladas, lo que como sabemos ocurre únicamente si la secuencia repetitiva CGG sobrepasa los 200 triplete (mutación completa). Los dos resultados, en conjunto, nos aseguran el diagnóstico molecular de X-Frágil en estos pacientes.

En todas las mujeres analizadas se logró la amplificación de las islas CpG adyacentes a la secuencia repetitiva CGG en el gen FMR1. Esta amplificación se logra, según la estrategia implementada, sólo en los casos en los que esta región se encuentra metilada. Esto ocurre en el cromosoma X inactivo de las mujeres y en el cromosoma X de los varones cuando el gen FMR1 se metila por la presencia de una secuencia repetitiva igual o mayor de 200 triplete CGG. Aunque por el procedimiento utilizado, solo podemos suponer que la secuencia amplificada en las mujeres estudiadas, corresponde al cromosoma X inactivo normal, el hecho de que en todas ellas se logró la amplificación de las secuencias repetitivas CGG, apoya fuertemente esta presunción.

De las 4 madres de pacientes afectados, en quienes fue posible realizar el estudio molecular, en todas ellas solo se pudo amplificar uno de los alelos (de tamaño normal). Así mismo, suponemos que el otro alelo no pudo ser amplificado debido a que su tamaño excedió los 120 triplete. En todas ellas, la amplificación de las islas CpG mostró bandas con características similares a las de los controles. Esto nos permite suponer que el alelo no amplificado debe tener un tamaño entre 120 y 200 repeticiones CGG, ya que de exceder este tamaño, la secuencia estaría metilada y la banda de amplificación de las islas CpG sería de mayor intensidad que las controles.

Interesantemente, la madre de un paciente en quien el tamaño de la repetición fue normal, mostró un alelo de 62 repeticiones, es decir, en estado de premutación. Es evidente que este alelo no llegó a ser una mutación completa al ser heredado.

La aplicación de esta estrategia no permite la amplificación de secuencias mayores a 120 repeticiones CGG, lo que nos impide la identificación de un número de secuencias que por su tamaño caen en el rango de premutaciones (120 a 200 pb). Desafortunadamente, la amplificación de las islas CpG en portadoras de estas premutaciones, no es tan útil como lo es con los individuos que presentan una mutación completa y que por ende muestran metilación de estas regiones.

CONCLUSIONES

1.- La modificación del ADN por bisulfito de sodio, el cual sustituye las citosinas no metiladas por uracilo, permite amplificar y visualizar eficientemente secuencias ricas en G+C como las presentes en el gen FMR1.

2.- La imposibilidad para amplificar secuencias de más de 120 triplete CGG resulta en una señal limitante de este procedimiento para la detección de secuencias en estado premutado.

3.- Esta limitación quizá pueda ser solucionada con la utilización de polimerasas de tipo elongasa que permitan la amplificación de secuencias mayores.

4.- Además del Síndrome X-Frágil, otras patologías cuyo diagnóstico molecular presenta los mismos problemas, podrían ser beneficiadas por este procedimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Knight, J.L Samantha, Hirts, Mark C. Roche Anya Et al. Molecular Studies of the Fragile X syndrome. Am J Med Genet. 1992,43:217-223.
2. Bell M.V. Hirts M.C. Nakahori Y. Et al. Physical Mapping across the fragile X: Hypermethylation and clinical expresion of the fragile X syndrome. Cell. 1991,64:861-866.
3. Tejada Isabel, Mornet Etienne, Biancalana Valérie. Et al. Direct DNA analysis of fragile X syndrome in spanish pedigrees. Am J Med Genet. 1992,43:282-290.
4. Thompson Margaret W, McInnes Roderick R, Willard Huntington F. Genética en Medicina. Masson, S.A. 4a. Edición. Barcelona (España). 1996. pp 78-79.
5. Nussbaum RL. Ledbetter DH. The Fragile X Syndrome. En: The metabolic basis of inherited disease . Scriver CR. Beaudet. AL., Sly Ws. Valle D. (Eds). Mc Graw-Hill. Inc. 7a. Edición New York. 1995 pp 795-810.
6. Brown W Ted, MD, PhD; E. George. Et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. JAMA.1993,270:1569-1575.
7. Warren Stephen T., Ph D. David L. Ph D. Nelson. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. JAMA. 1994,271:536-542.

8. Ferrari Tizzano E., Petit P., Gallano, Bastus M., Baiget. Importancia del diagnóstico molecular en la detección de varones sanos transmisores de síndrome del X frágil. *An. Esp. Pediatr.* 1992,36:272-276.
9. Hoogeveen A. T., And Oostra B. The fragile X syndrome. *J. Inher. Metab. Dis.* 1997,20:139-151.
10. De Vries Bert B, A, J Halley Dicky J. Et al. The Fragile X syndrome. *J Med Genet.* 1998;35:579-589.
11. Hui- Fu Ying, Kuhl P.A., Derek. Pizzuti Antonio. Et al. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability: Resolution of the Sherman Paradox. *Cell.* 1991,67:1047-1058.
12. Sherman, S, Morton, N, Jacobs, P, y Turner, G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet.* 1984,48:12-37.
13. Sherman, S, Jacobs, P, Morton, N. Et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.* 1985,69:289-299.
14. Prembrey, M, Winter, R, y Davies, K. A premutation that generates a defect a crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am J. Med Genet.* 1985,21:709-717.
15. Nussbaun, R, Aiharts, S, y Ledbetter, D. Recombination and amplification of pyrimidine sequences may be responsible for initiation and progression of the fragile site: an hypothesis. *Am J Med Genet.* 1986,23:715-721.

16. Friedman, J. Howard-Peebles, P. Inheritable of fragile X syndrome: an hypothesis. *Am J Med Genet.* 1986;23:701-713.
17. Steinbach, P. Mental impairment in Martin-Bell syndrome is probably determined by interaction of several genes: simple explanation of phenotypic differences between unaffected and affected males with the same X chromosome. *Hum Genet.* 1986;72:248-252.
18. Israel, M. Autosomal suppressor gene for fragile X: an Hypothesis. *Am J Hum Genet.* 1987;26:19-31.
19. Ledbetter, D. Ledbetter, S. Nussbaum, R. Implications of fragile X expression in normal males for the nature of mutation. *Nature.* 1986;324:161-163.
20. Warren S. Fragile X syndrome an Hypothesis regarding the molecular mechanism of the phenotype. *Am J Med Genet.* 1988;30:681-688.
21. Laird, CH. Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile X syndrome of mental retardation. *Genetics.* 1987;117:587-599.
22. Khalifa M, Reiss A. Migeon G. Methylation status of genes flanking the fragile sites in males with the fragile X syndrome : a test of the imprinting hypothesis. *Am J Hum Genet.* 1990;46:744-753.
23. Arenas Aranda Diego, Peñaloza Rosenda, Salamanca Gomez Fabio. Patología medica ocasionada por repetidos de trinucleotidos. *Gac Med Mex.* 1999;135:53-65.

24. Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell*. 1994;77:853-861.
25. Snow K, Doud LK, Hagemen R, Pergolizzi RG, Erster SH. Et al. Analysis of a CGG sequence at the FMR1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet*. 1993;53:1217-1228.
26. Hirts MC, Grewal PK, Davies KE. Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Mol Genet*. 1993;32:1147-1153.
27. W. Richard erbe and C. Wang Jin- Chen. Folate Metabolism in Humans. *Am J Med Genet* . 1984,17:277-287.
28. Laird Charles D. Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile X syndrome of mental retardation. *Genetics*.1987;117:587-599.
29. Sutherland Grant R, Baker Elizabeth, and Fratini Antonio. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am J Med Genet*. 1985;22:433-443.
30. Laird Charles, Jaffe Elizabeth, Karpen Gary. Et al. Fragile sites in human chromosomes as region of late- replicating DNA. 1987;3:274-281.
31. Warren Stephen T. Trinucleotide repetition and fragile X syndrome. *Hospital practice*. 1997:73-98.
32. Eichler E. Evan, Richards Stephen, Gibbs Richard A. Et al. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 1993,2:1147-1153.

33. Kunst B, Catherine, Zerynick Chris, Kanrickhoff Laurie. Et al. FMR1 in global populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58:513-522.
34. Deelen, Wout, Bakker Cathy. Et al. Conservation of CGG region in FMR1 gene in Mammals. 1994;51:513-516.
35. Verheij Coleta, De Graff Esther, Bakker Cathy E. Et al. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Human Molecular Genetics.* 1995;4:895-901.
36. Quan F, Zonana J. Et al. An Atypical case of fragile X syndrome caused by deletion that includes the FMR1 gene. *Am J Hum Genet.* 1995;56:1042-1051.
37. Hirts Mark, Grewal Prabhjit, Flannery Angela. Et al. Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment. *Am J Hum Genet.* 1995;56:67-74.
38. Watson JD, Gilman M, Witkoski J. Et al. *Recombinant DNA.* Scientific American Books. New York, 1992.
39. The Dutch-Belgian fragile X consortium. Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. *Cell.* 1994;78:23-33.
40. Siomi Haruhiko, Siomi Mikiko C. Nussbaum Robert L. Et al. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell.* 1993;74:291-298.
41. Kooy R Frank, Willensen Rob, Oostra Ben A. Fragile X syndrome at the turn of the century. *Molecular medicine today.* 2000;6:193-198.

42. Erster Susan H, Brown W. Ted, Goonewardena Ponmani, Et al. Polimerase chain reaction analysis of fragile X mutations. Hum Genet.1992;90:55-61.
43. Hecimovic S, Muller Barisic I, Et al. Expand Long PCR for fragile mutation detection. Clin Genet.1997,52:147-15.
44. El-Aleem alic Abd, Böhm Ingolf, Temtamy Samia. Et al. Direct molecular analysis of the fragile X syndrome in a sample of Egyptian and German patients using non-radioactive PCR and Southern blot followed by chemiluminicent detection. Hum Genet.1995;96:577-584.
45. Sinden Richard R. Biological implications of the DNA structures associated with disease causing triplet repeats. Am J Hum Genet. 1999;64:346-353.
46. Landre P. A, Gelfand D.H and Watson R.M. The use of cosolvents to enhance amplification by the polymerasa chain reaction. PCR strategies.1995. by Acedemic Prees, Inc. pp.3-16.
47. Abramsom Richard D. Thermostable DNA polymerasa. PCR strategies. 1995. by Academic Press, inc. pp.39-57.
48. Levinson Gene, Anne Maddalena, Palmer Frances T. Et al. Improved Sizing of Fragile X CGG repeats by nester polymerase Chain reaction. Am J Med Genet. 1994;51:527-534.
49. Panagopoulos Ioannis, Lassen Carin, Kristoffersson Ulf, Aman Pierre Methylation PCR approach for detection of fragile X syndrome. Hum Mutation.1999;14:71-79.

- 50.P Latimer Laura J, S Lee Jeremy. Ethidium bromide does not fluoresce when intercalated adjacent to 7-Deazaguanine in duplex DNA. *J Biol Chem.* 1991;266:13849-13851.
- 51.Seela Frank and Rölling Angelica. 7-Deazapurine containing DNA: efficiency of C7 GdTP, C7 AdTP and C7 IdTP incorporation during PCR amplification and protection from endodeoxyribonuclease hydrolysis. *Nucleic Acids Research.*1991;20:55-61.
- 52.Condorelli DF, Dell Milana G. Et al. Routine clinical application of the FRAXA Pfu PCR assay: limits and utility. *Clin Genet.* 1996;50:366-371.
- 53.Chong Samuel S, Eichler Evan E. Et al. Robust Amplification and Ethidium visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am J Med Genet.*1994;51:522-526.
- 54.Wang Qin, Green Elizabeth, Bobrow Martin. Et al. A rapid, non-radioactive Screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J Med Genet* 1995,32:170-173.
- 55.Shapiro Robert, Braverman Barbara. Et al. Nucleic Acid reactivity and conformation. *J Biol Chem.* 1973;248:4060-4064.
- 56.Martienssen Robert A. and Richards Erick J. DNA methylation in eukariotes. *Current Opinion in Genetics and Development.* 1995;5:234-242.
- 57.Brandeis Michael, Ariei Mira and Cedar Howard. Dynamics of DNA methylation durind development. *Bioessays.*1993;15:709-713.

58. Razin Aharon and Riggs Arthur D. DNA methylation and gene function. *Science*.1980;210:604-610.
59. Clark Susan J, Harrison Janet. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*. 1994;22:2290-2297.
60. Olek Alexander, Joachim Oswald, Jorn Walter. A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Research*. 1996;24:5064-50.
61. Grunau Christoph, Schattevoy Ruben, Mache Niels. Et al. Meth tools – a Toolbox to visualize and analyse DNA methylation data. *Nucleic Acids Research*. 2000;28:1053-1058.
62. Frommer Marianne, Mc Donald Louise E, Millar Douglas S. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.1992;89:1827-1831.
63. Fiel Robert, Charlton Jillian, Bird Adrian P. Et al. Methylation analysis on individual Chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing : *Nucleic Acids Research*.1994;22:695-696.
64. Miller SA; Dukes DD, Polesky HI. A simple salting out procedure from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research*.1988;16:215.
65. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning, a Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.1992;458-463.

66. Bowen IR, Thomas P, Webb CE. Et al. Facile and rapid análisis of tree DNA polymorphisms within the human factor IX gene using the polymerasa chain reaction. 1991;77:559-560.

ANEXO

FAMILIA	NUMERO DE INDIVIDUOS	PARENTESCO	SEXO	REPETICIONES CGG	AMPLIFICACION DE LAS ISLAS CpG
1.1	1	Propósito	M	25/---	No amplifico
2.1		Propósito	M	---/---	Si amplifico
2.2		Mama	F	18/---	Si amplifico
2.3	3	Hermana	F	18/31	Si amplifico
3.1		Propósito	M	19/---	No amplifico
3.2	2	Mama	F	15/19	Si amplifico
4.1	1	Propósito	M	22/---	No amplifico
5.1	1	Propósito	M	21/---	No amplifico
6.1	1	Propósito	F	20/21	Si amplifico
7.1	1	Propósito	M	---/---	Si amplifico
8.1		Propósito	M	5/---	No amplifico
8.2	2	Mama	F	5/18	Si amplifico
9.1	1	Propósito	M	18/---	No amplifico
10.1		Propósito	M	---/---	Si Amplifico
10.2	2	Mama	F	20/---	Si amplifico
11.1	1	Propósito	M	11/---	No amplifico
12.1		Propósito	M	10/---	No amplifico
12.2	2	Hermano	M	20/---	No amplifico
13.1	1	Propósito	M	---/---	Si amplifico
14.1	1	Propósito	M	15/---	No amplifico
15.1	1	Propósito	M	15/---	No amplifico
16.1		Propósito	M	15/---	No amplifico
16.2	2	Mama	F	12/15	Si amplifico

17.1		Propósito	M	12/---	No amplifico
17.2	2	Hermano	M	12/---	No amplifico
18.1		Propósito	M	---/---	Si Amplifico
18.2	2	Mama	F	12/---	Si amplifico
19.1		Propósito	M	---/---	Si Amplifico
19.2		Mama	F	13/---	Si amplifico
19.3		Hermana	F		Si amplifico
19.4	4	Hermana	F		Si amplifico
20.1		Propósito	M	13/---	No amplifico
20.2	2	Mama	F	13/20	Si amplifico
21.1		Propósito	M	12/---	No amplifico
21.2	2	Mama	F	12/13	Si amplifico
22.1		Propósito	M	11/---	No amplifico
22.2	2	Mama	F	11/13	Si amplifico
23.1		Propósito	M	13/---	No amplifico
23.2	2	Mama	F	13/17	Si amplifico
24.1	1	Propósito	M	17/---	No amplifico
25.1		Propósito	F	20/---	Si amplifico
25.2		Mama	M	18/20	No amplifico
25.3	3	Hermana	F	18/22	Si amplifico
26.1	1	Propósito	M	15/---	No amplifico
27.1		Propósito	F	18/---	Si amplifico
27.2	2	Mama	M	5/18	No amplifico
28.1		Propósito	M	---/---	Si Amplifico
28.2	2	Primo	M	---/---	Si amplifico
29.1	1	Propósito	M	11/---	No amplifico
30.1	1	Propósito	M	21/---	No amplifico
31.1		Propósito	M	15/---	No amplifico
31.2		Mama	F	15/62	Si amplifico
31.3	3	Hermana	F		No amplifico
32.1		Propósito	M	21/---	No amplifico

32.2	2	Mama	M	12/21	No amplifico
33.1		Propósito	M		
33.2	2	Hermano	M		
34.1		Propósito	F		Si amplifica
34.2	2	Hermana	F		Si amplifica