

2002 "A"- 2006 "B"

398503226

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

*CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS*
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FMRP EN PACIENTES
MEXICANOS CON SÍNDROME X-FRÁGIL”**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE **TESIS** QUE PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

PAVEL ROMERO ESPINOZA

TESIS/CUCBA

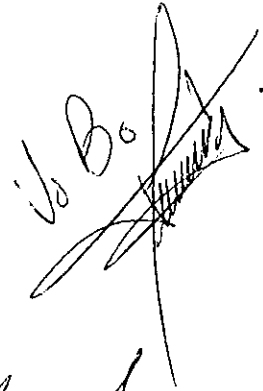
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., ENERO de 2008

Dr. Fco. MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
Presente.

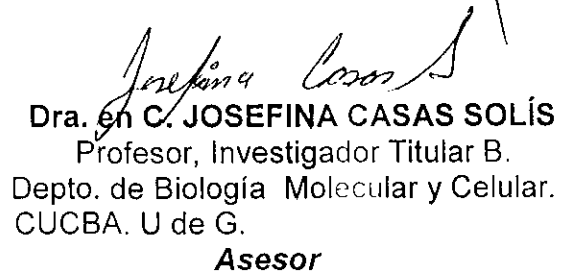
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS** o **INFORMES**, opción **TESIS** con el título: "**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FMRP EN PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME X-FRÁGIL**" que realizó el pasante **PAVEL ROMERO ESPINOZA** con número de código **398503226** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

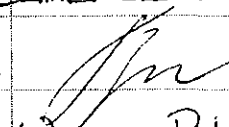
ATENTAMENTE
 Las Agujas, Zapopan, Jal., Enero de 2008




Dr. en C. PATRICIO BARROS NÚÑEZ
 Investigador Titular A. División de Genética.
 CIBO, IMSS.
Director del trabajo



Dra. en C. JOSEFINA CASAS SOLÍS
 Profesor, Investigador Titular B.
 Depto. de Biología Molecular y Celular.
 CUCBA. U de G.
Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Patricia Castro Felix	Patricia Castro	9-Ene-2008
Alma Rosa Villalobos A	Alma Rosa Villalobos	Ene 9, 2008
Galina Petrovna Zaitseva		09/01/2008
Supl. Veronica Palomera Avalos	Veronica Palomera G.	Ene 9, 2008.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**“EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FMRP EN PACIENTES MEXICANOS
CON SÍNDROME X-FRÁGIL”**

PASANTE: PAVEL ROMERO ESPINOZA

DIRECTOR EXTERNO: Dr. en C. PATRICIO BARROS NÚÑEZ

Profesor de Asignatura. Doctorado en Genética Humana. Departamento de Fisiología. CUCS. Universidad de Guadalajara.

Investigador Titular A. División de Genética. Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social.

ASESOR INTERNO: Dra. en C. JOSEFINA CASAS SOLÍS

Profesor Investigador Titular B. Departamento de Biología Molecular y Celular. CUCBA. Universidad de Guadalajara.

DEPARTAMENTO EN DONDE SE DESARROLLO EL PROYECTO:

Laboratorio de Bioquímica III. División de Genética. Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Sierra Mojada # 800, Col. Independencia. C.P. 44340. Guadalajara, Jalisco.
Tel.: 36-68-30-00. Ext. 31928.

SINODALES

Dra. Luz Patricia Castro Félix.- Sinodal Titular.

Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula.- Sinodal Titular.

Dra. Galina Petrovna Zaitzeva.- Sinodal Titular.

M. C. Verónica Palomera Ávalos.- Sinodal Suplente.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Porque en cada momento me brindan su apoyo y confianza, su amor y paciencia, por su incansable esfuerzo y dedicación que me demuestran día a día, y porque gracias a sus bendiciones y acciones me han hecho ser un mejor hijo, un mejor amigo, un mejor hombre y un mejor ser humano, y simplemente lo han dejado todo..... los quiero mucho.

A mis hermanos

Omar y Dinah por su particular forma de apoyarme y ayudarme en mi vida, por su esfuerzo de mantenernos juntos, por darme valiosísimos momentos de felicidad y sencillamente por forman parte de mí..... los quiero mucho.

A mi amor

Por formar parte de mi vida, por enseñarme el significado del amor, por estar ahí día a día, porque ante mis equivocaciones siempre me has brindado tus consejos, apoyo, cariño, comprensión y lealtad, por ser mi novia, mi mejor amigo, mi compañera y simplemente por compartir conmigo todo lo que eres..... por lo que eres, fuiste y siempre serás para mi Gaby.

A mi familia

En especial a mi abuelita que aunque no está aquí conmigo, siempre me motivo a seguir adelante dedicándome todo su esfuerzo, tiempo y cariño; lo que siempre formará parte de mí. A mis tíos, tías, primos y primas que me han dado parte de ellos, sus consejos, su cariño y su apoyo; son muchos y no puedo nombrar a todos pero quiero que sepan que los quiero mucho.

A mis amigos

Tony, Gustavo, Cristian, Nibardo, Mayra, Jazmín, Carlos, Ernesto, José Luís, Tania, Ivvette, Hugo, Pablo, Toño, Karina, Lalo, Ricardo, Lily, Sandra, Gaby, Vero, Fátima y Claudia, que han sido mi segunda familia y los que ante las adversidades de la vida estuvieron a mi lado apoyándome a seguir adelante.

Al Dr. Patricio

Por brindarme su amistad, paciencia, ser un buen tutor, compañero, amigo y orientarme en esta etapa de mi vida que hoy concluyó.

A mis compañeros de laboratorio

La Dra. Rebeca, Chuy, Johana, Jessy, Bere, Herbert, Claudia, Ivvette, Olivia, la Mta. Hilda, Ari y Clara, que también son mis amigos, por compartir conmigo una parte de lo que son y por hacerme amenas las horas de trabajo.

A la Dra. Pina

Por el apoyo, tiempo y amistad que me otorgo no sólo en este trabajo sino por todos aquellos de mi carrera profesional.

A mis sinodales

Por el tiempo, apoyo y sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

A mis maestros

Por ser parte de mi formación, preparación y a quienes les debo todo mi aprendizaje.

Y a todos los que de alguna manera me han apoyado en mi vida para concluir esta etapa.

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Abreviaturas	vi, vii
Resumen	1
Antecedentes	2
Síndrome X-Frágil	2
Cuadro clínico	2
Sitio Frágil	3
Gen <i>FMR1</i>	4
Mecanismo mutacional	4
Proteína FMRP	5
Métodos de diagnóstico del X-Frágil	7
Southern Blot	8
PCR	8
Análisis inmunohistoquímico	10
Planteamiento del problema	14
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivo	15
Material y Métodos	16
Procedimiento general	17
Diagrama de flujo	19
Procedimiento metodológico	20
Análisis estadístico	30
Consideraciones éticas	32
Resultados	33
Discusión	38
Conclusiones	41
Bibliografía	42
Anexos	47

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.
AgNO₃: Nitrato de plata.
ARN: Ácido ribonucleico.
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
BSA: Albúmina bovina sérica.
DAB: Buffer 3,3'-diaminobenzideno imidazol-HCl.
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.
FMR1: Fragile X Mental Retardation 1.
HCl: Ácido clorhídrico.
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.
IMMS: Instituto Mexicano del Seguro Social.
kb: Kilobase.
kDa: Kilodalton.
L: Litros.
M: Solución molar.
mg: Miligramos.
MgCl₂: Cloruro de magnesio.
MgSO₄: Sulfato de magnesio.
min: Minuto.
mL: Mililitro.
mM: Milimolar.
mmol: Milimol.
Na₂EDTA: Buffer sodio EDTA.
NaCl: Cloruro de sodio.
NaOH: Hidróxido de sodio.
ng: Nanogramo.
NH₄Cl: Cloruro de amonio.
NH₄HCO₃: Bicarbonato de amonio.
nm: Nanómetros.
°C: Grado centígrado.
pb: Pares de bases.
PBS: Buffer fosfato Sörrensen.
PBS-BLOCK: Buffer fosfato Sörrensen, H₂O₂ y azida de sodio.
PBS+: Buffer fosfato Sörrensen BSA y glicina.
pH: Potencial de hidrógeno.
PM: Peso molecular.
pM: Picomolar.
pmol: Picomol.
rpm: Revoluciones por minuto.
s: Segundo.
SDS: Dodecil sulfato de sodio.
Taq pol: Polimerasa de ADN, aislada de *Thermophilus aquaticus*.
TBE: Buffer Tris Base-Ácido Bórico-EDTA.

TE: Buffer Tris EDTA.

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina.

UV: Luz ultravioleta.

μg: Microgramo.

μL: Microlitro.

RESUMEN

El síndrome X-frágil es la causa más común de retraso mental. Se conoce que la mutación que causa el síndrome es una amplificación trinucleótida CGG en la región 5' no traducida del exón 1 del gen *FMR1*. La ausencia de la proteína codificada por el gen *FMR1* (FMRP) es responsable del fenotipo X-frágil. Los métodos de diagnóstico molecular detectan la expansión de la región repetitiva CGG del gen, en tanto que las técnicas de detección inmunohistoquímica detectan todas las mutaciones que dan lugar a la ausencia de la FMRP.

En este estudio se analizaron 22 individuos mexicanos, que incluyeron 11 pacientes con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-frágil y 11 controles sanos en los que se verificó molecularmente el estado normal del gen *FMR1*. Los resultados del diagnóstico molecular en los 22 individuos estudiados, obtenidos mediante reacción en cadena de la polimerasa simple, en ADN modificado por tratamiento con bisulfito de sodio, fueron comparados con los resultados obtenidos mediante detección de la FMRP en linfocitos de sangre periférica por medio de inmunohistoquímica.

El análisis muestra una correlación entre el estado mutacional del gen, el estado de metilación del promotor del gen y la expresión de la FMRP, tanto en pacientes con síndrome X-frágil como en los controles.

La sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos positivo y negativo obtenidos en este estudio, demuestran que la detección de la expresión de la FMRP se puede lograr en forma eficiente y confiable por inmunohistoquímica.

ANTECEDENTES

SÍNDROME X-FRÁGIL

El síndrome X-frágil, también llamado Martin-Bell, es la causa más común de retardo mental heredable (Bell et al., 1991; Knight et al., 1992; Tejada et al., 1992). Su frecuencia en población general es de aproximadamente de 1/4000 varones y 1/6000 mujeres (Oostra y Chiurazzi, 2001). Se transmite ligado al cromosoma X por un mecanismo inusual de herencia (Bardoni et al., 2001; Hagerman, 1996; Warren y Sherman, 2006). La mutación que causa el síndrome X-frágil es una amplificación trinucleótida CGG en la región 5' no traducida del exón 1 del gen *FMR1* (de Vries et al., 1998; Glóver-López y Guillén-Navarro, 2006).

CUADRO CLÍNICO

El fenotipo clínico de los pacientes incluye anomalías físicas, retardo mental y trastornos de la conducta. En edad puberal las características más sobresalientes son: macrocefalia, cara alargada, pabellones auriculares prominentes, macroorquidismo, hiperextensibilidad de articulaciones pequeñas, prolapso mitral, piel fina, hipotonía, convulsiones, hiperquinesia, inestabilidad emocional, movimientos estereotipados y conducta autista (Figura 1). En edad prepuberal, los hallazgos pueden ser más inespecíficos y el macroorquidismo está presente en sólo 10% de los casos. Aproximadamente 10% de los varones autistas son X-frágil positivos (Hagerman, 1996; Warren y Sherman, 2006). A pesar de toda esta gama de anomalías, sólo del 10-15% de los afectados presentan únicamente retardo mental (Bardoni et al., 2001; Ferrari et al., 1992; Tejada et al., 1992; Warren, 1997).



Figura 1. Pacientes con síndrome X-Frágil. Observe que en la mujer (a) las características faciales no son evidentes como se observan en los varones (b), con la excepción de los pabellones auriculares prominentes.

SITIO FRÁGIL

El sitio frágil asociado al síndrome X-frágil está localizado en Xq27.3; es un sitio frágil sensible a la concentración de folatos y timidina en el sistema de cultivo celular, es observable como una región no teñida o *gap*, o una ruptura verdadera (Figura 2) (Nussbaum y Ledbetter, 1995). La deficiencia del ácido fólico *in Vitro*, ya sea porque el medio de cultivo carece o contiene menos de 0.2 mg/L, o por uso de inhibidores del metabolismo del mismo (metotrexate o fluorodesoxiuridina), es indispensable para que ocurra la expresión del sitio frágil (Warren, 1997). En el aspecto bioquímico, el sitio frágil es posiblemente consecuencia de la alteración en la síntesis del ADN, ocasionada por disminución del desoxitimidinamonofosfato (dTMP) que resulta de la deficiencia de ácido fólico (Nussbaum y Ledbetter, 1995; Warren, 1997).



Figura 2. Cariotipo humano que muestra el sitio frágil en el cromosoma X. La flecha muestra un gap (región no teñida) en Xq27.3.

GEN *FMR1*

En 1991, Verkerk y colaboradores lograron identificar la alteración génica causante del síndrome X-frágil. La mutación se encuentra en un gen situado en el sitio X-frágil Xq27.3; mide 38 kb y consta de 17 exones y 16 intrones. El gen está altamente conservado entre las especies (Figura 3) (Oostra y Chiurazzi, 2001) y codifica un ARN mensajero de 3.9 kb, que consta de una región 5' no traducida de 0.2 kb, una región codificante de 1.9 kb y una región 3' no traducida de aproximadamente 1.8 kb. El hallazgo más importante en este gen es la existencia de un segmento de repeticiones CGG que forman parte de las islas CpG, mismas que se encuentran diseminadas en todo el genoma. Dentro del gen se encuentran secuencias AGG intercaladas cada 9 o 10 repeticiones CGG. La pérdida de estas secuencias está en relación con la inestabilidad de la secuencia repetitiva CGG (Eichler et al., 1993; Kunst et al., 1996; Verheij et al., 1995).

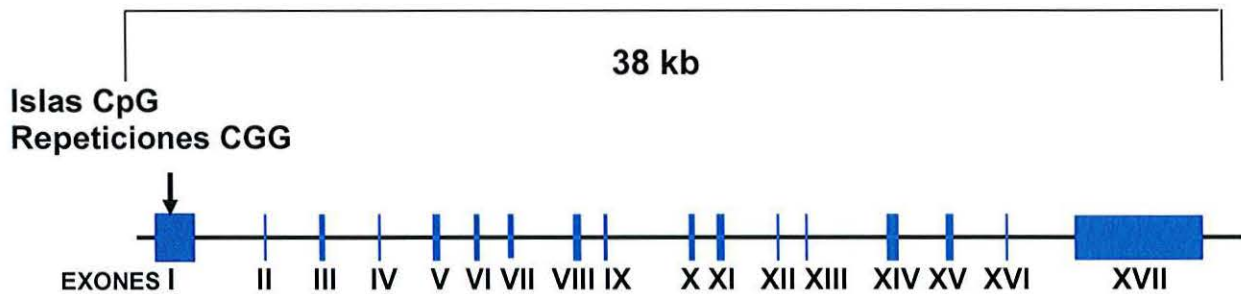


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del gen *FMR1*.

MECANISMO MUTACIONAL

La mutación que causa el síndrome X-frágil es una amplificación trinucleótida CGG en la región 5' no traducida del exón 1 del gen *FMR1* (de Vries et al., 1998). Esta secuencia es polimórfica en longitud y contenido; en individuos normales varía de 6-50 repeticiones CGG, en individuos portadores (premutación) 50-200 repeticiones, y en individuos afectados (mutación completa) el incremento de la secuencia repetitiva CGG a más de 200 tripletes desencadena un proceso de hipermetilación de las secuencias CGG y las islas CpG adyacentes, dando lugar a la inactivación del gen *FMR1*, lo que impide el proceso de transcripción y por ende la síntesis de la proteína (Figura 4) (de Vries et al., 1998; Hoogeveen y Oostra, 1997; Nussbaum y Ledbetter,

1995). La expansión de la secuencia repetitiva en estos individuos solamente se ha descrito por vía materna. La mutación completa es somáticamente inestable y parece estar limitada a la embriogénesis temprana (Fu et al., 1991; Hoogeveen y Oostra, 1997).

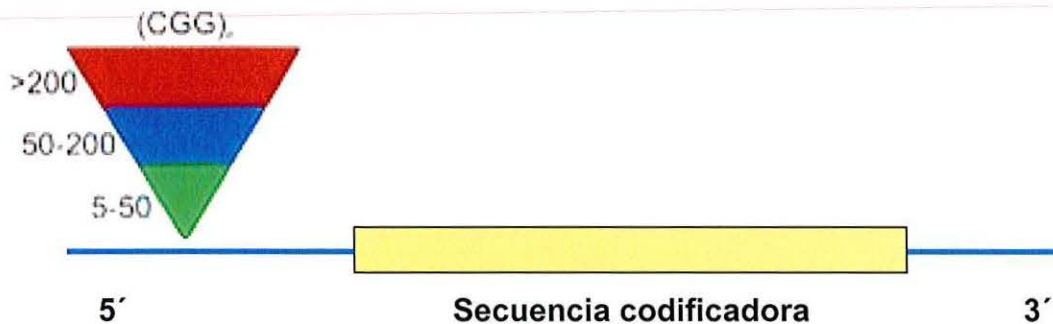


Figura 4. Esquema del gen *FMR1* conteniendo las repeticiones CGG.

La probabilidad de que ocurra la expansión depende directamente del número de repeticiones en la portadora. El mecanismo molecular responsable de la expansión de las repeticiones CGG, de su metilación selectiva y de la fragilidad cromosómica aún no ha sido determinado. Es posible que la expansión y la metilación de estas repeticiones inhiban el adecuado ensamblaje del nucleosoma, alterando la organización funcional de la cromatina, lo cual estaría provocando la alteración en la expresión del gen *FMR1* y aún la fragilidad cromosómica propia de este padecimiento (Godde et al., 1996; Wang y Griffith, 1996; Wells, 1996). Se han descrito muy esporádicamente otros tipos de alteraciones en el gen *FMR1* como deleciones y mutaciones puntuales, que igualmente impiden su función. Estas mutaciones se han encontrado tanto en el promotor como en la secuencia codificante de la proteína (Coy et al., 1995; Milá et al., 2000).

PROTEÍNA FMR1 (FMRP)

En 1993 Verheij y colaboradores identificaron la proteína del gen *FMR1* llamada FMRP (Fragile Mental Retardation Protein). La FMRP se traduce en numerosos tejidos humanos y murinos, con elevada expresión en cerebro, testículos, ovarios, linfocitos, epitelio esofágico, timo, ojo y vaso; y moderada expresión en colon, útero,

tiroides e hígado. No se ha evidenciado expresión en corazón, aorta y músculo. El gen presenta un proceso de empalme alternativo que genera diferentes proteínas cuyos pesos moleculares van de 70 a 80 kDa (Jin y Warren, 2000; Siomi et al., 1993). Sólo se conocen 6 isoformas de la proteína; la isoforma más grande (FMRP1), de aproximadamente 632 aminoácidos, consta de varios dominios funcionales (Figura 5).

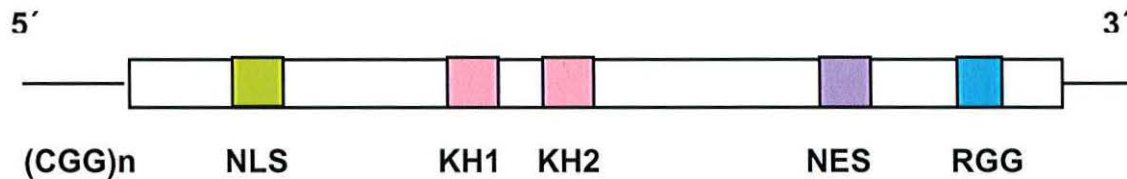


Figura 5. Representación esquemática de la proteína *FMRP*.

En la región N-terminal se encuentra una secuencia de localización nuclear funcional (NLS); enseguida se localizan 2 dominios de unión al ARN (dominios de homología a ribonucleoproteína K, llamados KH1 y KH2). Una secuencia de exportación nuclear (NES), codificada por el exón 14; y por último, un conjunto de residuos de glicina y arginina llamado caja RGG, ubicada en el extremo carboxilo (Siomi et al., 1993).

Actualmente se sabe que los dominios KH y la caja RGG son secuencias que se encuentran en proteínas de unión al ARN (Bardoni et al., 2001), lo que concuerda con la observación de que la FMRP característicamente se encuentra asociada con polisomas traduciendo activamente (Corbin et al., 1997; Hoogeveen y Oostra, 1997; Kooy et al., 2000; Siomi et al., 1993), y apoya la idea de que la proteína puede estar modulando la traducción o influenciando la estabilidad del ARNm *in vivo*. Entre los hallazgos más recientes sobre su función se menciona que la FMRP es metilada postraduccionalmente principalmente en sus residuos arginina-glicina-glicina de la caja RGG, por lo que su metilación funciona limitando o modulando la unión al ARN (Stetler et al., 2006). Además, ensayos de traducción *in vivo* demuestran que la FMRP inhibe la traducción de ARN mensajeros mediante el bloqueo de la subunidad ribosómica 60S, por lo que se ha propuesto que la FMRP funciona como regulador negativo de la expresión génica a nivel traduccional (Li et al., 2001; Laggerbauer et al., 2001; Peng y Warren, 2000).

Los dominios KH tienen entre 40 y 60 aminoácidos con varios dominios hidrofóbicos de isoleucina, leucina, metionina y glicina. De los dominios de la proteína que interactúan con el ARN, únicamente se tiene evidencia de su función en el dominio KH1. Por otro lado, la caja RGG no parece tener especificidad alguna. Estudios *in vitro*, llevados a cabo para determinar la especificidad de la FMRP, han demostrado que dicha proteína se une preferencialmente a poli (G) y poli (U) en lugar de poli (C) y poli (A) (Peng y Warren, 2000).

Aunque la FMRP se encuentra predominantemente en el citoplasma, se ha demostrado que las regiones NLS y NES juegan un papel preponderante en la exportación de ARN mensajeros específicos del núcleo al citoplasma. La FMRP naciente entra al núcleo en donde se ensambla en una partícula ribonucleoproteica-ARN mensajero, interactuando con transcritos de ARN específicos y otras proteínas (Warren y Sherman, 2006). Aún no es claro por qué la ausencia de la FMRP conlleva al retardo mental y a sus problemas específicos. En las neuronas, la proteína transporta ARN's mensajeros específicos hacia los ribosomas cerca de las sinapsis. La función de la FMRP no ha sido entendida completamente, parece que su ausencia altera los mecanismos de traducción de otras proteínas implicadas en el complejo fenotípico del síndrome X-frágil (Ramos-Fuentes, 2001).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME X-FRÁGIL

Durante más de 10 años el estudio cromosómico fue la prueba de elección para confirmar el diagnóstico clínico. La existencia de al menos 4% de metafases con un cromosoma X-frágil se consideraba una prueba positiva en varones clínicamente afectados. En mujeres portadoras de la mutación la prueba se mostraba menos sensible y en ocasiones no se encontraba fragilidad en ninguna metafase; ésto, junto con las dificultades técnicas del cultivo celular con medios pobres en ácido fólico, los resultados falsos positivos, la falta de discriminación entre premutaciones y mutaciones completas y los requerimientos en tiempo y costo, fueron los principales inconvenientes de la técnica (Warren y Sherman, 2006).

Actualmente se han diseñado una serie de técnicas moleculares e inmunohistoquímicas que permiten efectuar el diagnóstico del síndrome X-frágil;

estos incluyen el Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis inmunohistoquímico.

SOUTHERN BLOT

Es el procedimiento de diagnóstico molecular más frecuentemente utilizado; permite cuantificar el tamaño de las secuencias repetitivas CGG en individuos normales, premutados y mutados. Esta técnica puede usarse asociada o no a la PCR y con o sin marcaje radioactivo; sin embargo, su utilización tiene algunos inconvenientes derivados de su complejidad, costo y requerimiento de tiempo y esfuerzo; además, no permite determinar secuencias repetitivas de tamaño pequeño, que resulta importante cuando se necesita distinguir secuencias normales y premutadas (Condorelli et al., 1996).

PCR

Debido a que la región del gen *FMR1* es rica en secuencias CG, por apareamiento entre ellas se forman estructuras secundarias que impiden o dificultan su amplificación por PCR simple. Esto lleva al uso de aditivos químicos (dimetilsulfóxido, formamida o el análogo de base 7-deaza-dGTP) que presentan varios problemas en su utilización: 1.- El ADN que contiene el análogo de base migra más lento que el ADN intacto, por lo que requiere de geles de poliacrilamida desnaturalizantes y marcadores de tamaño especiales. 2.- Cuando las secuencias amplificadas se corren en geles de agarosa, no pueden ser teñidos con bromuro de etidio debido a que el análogo de base altera su estructura electrónica e impide su fluorescencia (Condorelli et al., 1996).

El uso de PCR basado en ADN modificado con bisulfito de sodio permite la amplificación de las secuencias repetitivas por PCR simple; convierte las citosinas no metiladas en uracilo, evitando la formación de estructuras secundarias que impiden el funcionamiento de la ADN polimerasa.

La modificación del ADN por bisulfito de sodio fue descrita por Shapiro y colaboradores en 1973 con el objeto de convertir los residuos de citosina no metilados en uracilo y así conocer los residuos 5-metil citosina (5^mC) que participan

en la metilación del ADN y que dan lugar a la inactivación de algunos genes durante el desarrollo (Shapiro et al., 1973).

Actualmente se ha propuesto el procedimiento de modificación del ADN para evitar las estructuras secundarias y lograr amplificar secuencias repetitivas ricas en CG. El procedimiento para llevar a cabo la modificación consta de tres pasos (Figura 6):

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.

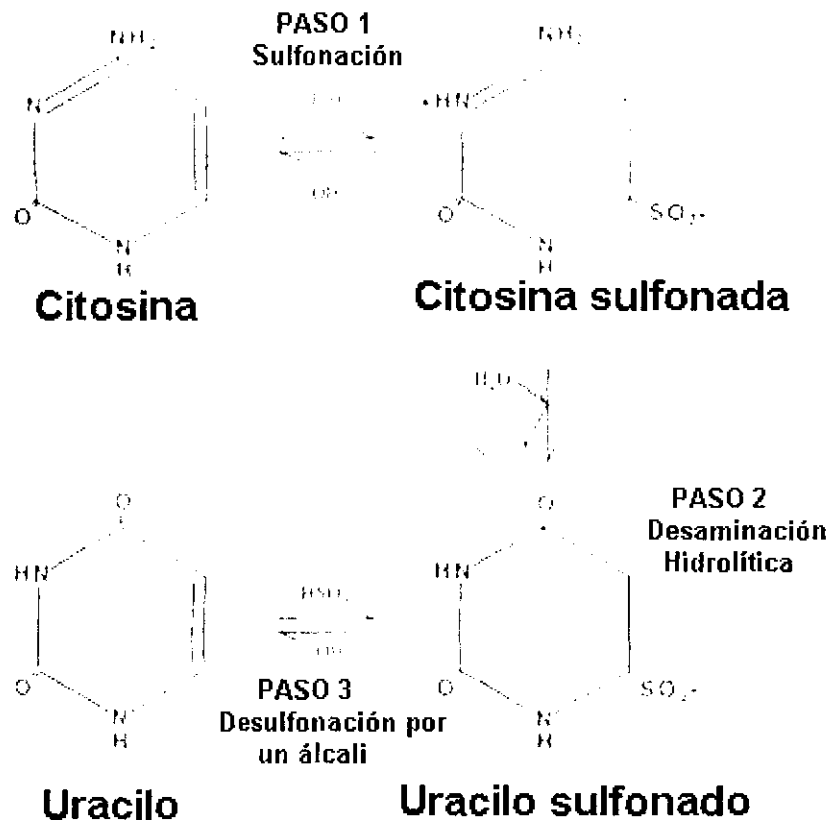


Figura 6. Esquema de la modificación del ADN.

Una de las características del ADN tratado con bisulfito de sodio es que las cadenas resultantes ya no son complementarias una de otra. Obviamente, es necesario diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar este ADN modificado (Panagopoulos et al., 1999; Shapiro et al., 1973).

Gracias a esta técnica se puede conocer el estado de metilación del gen y establecer el tamaño de la secuencia repetitiva en individuos normales y premutados. Muestra gran ventaja en comparación con otras técnicas, ya que resulta fácil y económica, además permite obtener resultados mediante la utilización de PCR sin ayuda de aditivos químicos ni de análogos de base. La desventaja es que no se puede cuantificar el tamaño de la secuencia repetitiva en algunas portadoras y en los individuos afectados (Panagopoulos et al., 1999).

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Gracias a anticuerpos dirigidos contra la FMRP se han desarrollado técnicas inmunohistoquímicas que permiten el estudio de la expresión de la proteína codificada. Estudios con Western blot en líneas celulares linfoblastoides demostraron que individuos con la mutación completa del gen *FMR1* carecían de proteína, mientras aquellos que presentaban la premutación la expresaban en niveles normales (Ramos-Fuentes, 2001).

En 1995, Willemsen y colaboradores publicaron el primer trabajo en el que describieron una nueva técnica inmunohistoquímica no invasiva para estudiar la expresión de la FMRP en células sanguíneas. En dicho trabajo se empleó anticuerpo monoclonal de ratón (1A1) contra la FMRP; la muestra biológica consistía sólo en una o dos gotas de sangre que se extendían en un portaobjetos; las células que se analizaban eran linfocitos. El estudio demostró que todos los individuos del grupo control expresaban la FRMP (>96%); y el grupo de pacientes expresaban la FMRP en <10% (Willemsen et al., 1995). Posteriormente, los mismos autores revalidaron los resultados mediante el estudio de un número mayor de individuos afectados, confirmando que la prueba inmunohistoquímica para FMRP en sangre es ideal para el diagnóstico y tamizaje de varones en poblaciones de riesgo porque discrimina sin ningún solapamiento entre varones normales y afectados con la mutación completa.

Establecieron de forma práctica porcentajes de corte en el nivel de expresión de la proteína: menos del 42% de expresión determina afectación, y más de 42% establece normalidad. Dicho valor posee una sensibilidad y especificidad del 100%. Para obtener este valor deben examinarse un mínimo de 80 linfocitos (Willemsen et al., 1997).

De Vries y colaboradores estudiaron 412 varones con retraso mental de causa desconocida; encontrando dos varones que mostraban 2% y 3% de expresión de la FMRP en linfocitos; estos resultados se confirmaron con el estudio molecular ya que ambos tenían >200 repeticiones CGG en el gen *FMR1* (de Vries et al., 1998).

La expresión de la FMRP se ha podido estudiar en otros tejidos. En 1996 Willemsen y colaboradores emplearon la prueba inmunohistoquímica en tejido fetal (vellosidades coriales) en cuatro embarazos de fetos afectados y un control. Los fetos afectados carecían de la FMRP, mientras que el feto normal la expresaba. Los resultados se confirmaron con el estudio molecular de ADN fetal (Lambiris et al., 1999). En 1999, estos mismos autores optaron por estudiar la expresión de la FMRP en raíz de cabello como un tejido anatómico y embriológicamente cercano al sistema nervioso central. Encontraron que varones normales expresan la FMRP en raíz de cabello entre el 77 y 100%. Los cabellos de varones con síndrome X-frágil carecían de expresión de FMRP. Todos los individuos (pacientes y controles) se sometieron al estudio molecular convencional, y los resultados concordaron con los niveles de expresión de la FMRP (Willemsen et al., 1999). De Vries y colaboradores sugieren que la expresión de la FMRP en raíces de cabello refleja mejor el desarrollo y la función mental cognoscitiva que la expresada en la prueba inmunohistoquímica de sangre (de Vries et al., 2003).

Tassone y colaboradores estudiaron la expresión de la FMRP en sangre, correlacionándola con el fenotipo y el Coeficiente Intelectual (CI) de cada individuo; encontraron una correlación entre el grado de expresión de la FMRP y el CI en varones con mosaicismo, varones con mutación completa parcialmente metilada y mujeres con mutación completa. Estos autores encontraron varones con la mutación completa parcialmente metilada, sin retardo mental y con expresión de FMRP en $\geq 50\%$ de linfocitos. El descubrimiento de expresión normal de FMRP en individuos

con la mutación completa parcialmente metilada está en contraste con el reporte de Feng y colaboradores quienes encontraron marcada disminución en la producción de FMRP en fibroblastos clonados con más de 200 repeticiones CGG. Estos resultados contradictorios indican que mutaciones completas sin metilar, pueden mostrar una expresión normal o moderadamente disminuida de FMRP (Tassone et al., 1999).

Aproximadamente el 13% de los varones con síndrome X-frágil muestran un CI de más de 70; la mayoría de estos varones tienen una mutación completa parcialmente metilada o son mosaicos para la mutación completa o premutación del gen *FMR1* (Hagerman, 1996). Existen reportes de varones sin retardo mental que muestran una mutación completa con una predominante falta de metilación (McConkie-Rosell et al., 1993). Smeets y colaboradores reportaron expresión normal de FMRP en líneas celulares de dos adultos con mutación completa parcialmente metilada (Smeets et al., 1995). Taylor y colaboradores encontraron que varones con mutación completa parcialmente metilada (<10%) no presentan retardo mental (CI de 73-116), aunque presentan problemas de aprendizaje, y características faciales y de comportamiento que están presentes en el síndrome (Taylor et al., 1994).

De Vries y colaboradores reportaron tres afectados (primos entre sí) con 75, 40, y 10% de linfocitos que expresan la FMRP, y una mutación completa sin metilar en 90, 35, y 10% de linfocitos respectivamente; los dos últimos individuos tienen retardo mental mientras que el varón con 75% de expresión de FMRP presenta un CI normal (de Vries et al., 1996). En los individuos con la mutación completa, el grado de afección físico y mental no guarda correlación con el número de repeticiones del gen (Rousseau et al., 1991).

Actualmente se acepta que todos los varones X-frágil son mosaicos, tienen diferentes secuencias de repeticiones CGG del gen *FMR1* amplificadas en diferentes células. Sin embargo, existen dos subclases de mosaicismo que pueden ser distinguidas en base al tamaño de la repetición CGG y al patrón de metilación: 1. En el primer grupo llamado "mosaicos de tamaño", del 20-40% de los varones X-frágil tienen una premutación en una proporción de sus células y en el resto (la mayoría de las células) una mutación completa. En general, la proporción de células con una premutación es <30% y varios estudios han mostrado que la función cognoscitiva de

estos pacientes X-frágil no es significativamente mejor que la de varones con mutación completa, sugiriendo que el número de células con expresión de FMRP con una premutación es insuficiente para presentar una mejor función cognoscitiva. 2. En el segundo grupo de individuos mosaicos, llamados "mosaicos metilados", la situación es diferente. Estos pacientes tienen una mutación completa en todas las células, pero una proporción de sus células con mutación completa están sin metilar. Las células con una mutación completa sin metilar son capaces de producir FMRP y por lo tanto pueden funcionar normalmente. Dependiendo de su proporción, son capaces de compensar la pérdida de funcionamiento de las células con mutación completa metiladas. Varios estudios sobre pacientes mosaicos metilados sugieren que se requiere una proporción de células con mutación completa sin metilar de al menos el 40% para un normal funcionamiento cognoscitivo. Esta situación es similar a la de mujeres con una mutación completa en quienes la función cognoscitiva está relacionada con el patrón de inactivación del X (de Vries et al., 2003).

De Vries y colaboradores en el 2003 reportaron tres hermanos con síndrome X-frágil con un patrón de mosaicismo metilado; el análisis molecular encontró 200-250, 177 y 183-187 repeticiones CGG respectivamente; el análisis inmunohistoquímico por duplicado mostró los siguientes porcentajes de expresión de FMRP en linfocitos 20 y 10; 22 y 10, y 7 y 2 respectivamente (de Vries et al., 2003).

La prueba inmunohistoquímica tiene ciertas ventajas sobre otras, resulta económica, fácil y rápida de realizar, sin embargo no permite la detección de portadores de la premutación, ni de individuos mosaicos (Willemsen et al., 1997). La principal aplicación de la prueba inmunohistoquímica de FMRP es el tamizaje del síndrome X-frágil en varones en poblaciones de riesgo (de Vries et al., 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que la mutación que causa el síndrome X-frágil es un incremento de la secuencia repetitiva CGG a más de 200 tripletes, lo que desencadena un proceso de hipermetilación que da lugar a la inactivación del promotor del gen *FMR1*, impidiendo el proceso de transcripción y por ende la síntesis de la FMRP. Sin embargo, todavía no es claro porque la ausencia de la FMRP conlleva al retardo mental y a sus problemas específicos. Además, el tamaño de la secuencia repetitiva CGG no siempre está directamente relacionado con la expresión de la FMRP; así, existen individuos con grandes premutaciones en los que el gen *FMR1* se encuentra metilado en la mayoría de sus células, por lo que no hay expresión de la FMRP; o individuos con mutación completa en los que el gen *FMR1* no se encuentra metilado y expresan la FMRP, o que son mosaicos para la mutación y muestran células con el gen *FMR1* no metilado, permitiendo la expresión parcial de la FMRP.

Los hallazgos reportados muestran contradicciones respecto al estado mutacional del gen *FMR1* y la expresión de FMRP en los individuos, por lo que se puede plantear la siguiente pregunta de investigación:

¿La expresión de la FMRP muestra una correlación directa con el estado mutacional del gen *FMR1*?

JUSTIFICACIÓN

La distinción funcional entre las grandes premutaciones y pequeñas mutaciones no siempre es estricta, pues algunos individuos con mutaciones completas menores expresan FMRP, en tanto que individuos con grandes premutaciones pueden no expresarla; además está el hecho bien demostrado que todos los varones con síndrome X-frágil son mosaicos ya que presentan diferentes tamaños de la secuencia repetitiva CGG en las diferentes células. Todo esto conduce a pensar que no existe una definición precisa entre el tamaño de las secuencias repetitivas en el gen *FMR1*, el estado de metilación del mismo y la expresión de la proteína FMRP en el citoplasma.

La expresión del gen *FMR1* mediante la identificación de la FMRP por medio de inmunohistoquímica es un procedimiento sencillo que se puede realizar para un número relativamente grande de individuos, lo cual facilita la elaboración de procedimientos de tamizaje en subpoblaciones de riesgo: individuos con retardo mental de causa desconocida, autismo, etc. El método resulta además económico, fácil y rápido. El diagnóstico inmunohistoquímico para el síndrome X-frágil constituye un instrumento mediador entre la evidencia clínica y la confirmación molecular directa de la mutación, el cual permite esclarecer algunos casos en los que los diagnósticos molecular y clínico parecen incongruentes.

HIPÓTESIS

El estado mutacional del gen *FMR1* no siempre muestra una correlación directa entre el estado de metilación del promotor y la expresión citoplasmática de FMRP.

OBJETIVO

Determinar la expresión de FMRP en linfocitos de individuos normales y de pacientes con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-frágil, procedentes de la región occidente de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO METODOLÓGICO

TIPO DE ESTUDIO: Descriptivo, transversal, prospectivo y comparativo.

MUESTRA DE ESTUDIO

Grupo Problema: Se estudiaron 11 individuos de sexo masculino con diagnóstico clínico de síndrome X-frágil quienes mostraron amplificación de la secuencia repetitiva CGG en el rango de mutación completa (más de 200 repeticiones) y metilación de las islas CpG próximas al promotor del gen *FMR1*. Estos pacientes fueron captados de la consulta de Genética de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS. Este centro de salud atiende derechohabientes procedentes de los estados de Jalisco, Nayarit, Colima, Michoacán y Zacatecas.

Grupo Control: Se estudiaron 11 individuos sanos de sexo masculino, quienes mostraron un rango de repeticiones CGG del gen *FMR1* dentro del rango normal (6-50) y sin metilación de su promotor.

GRUPO PROBLEMA (PACIENTES)

Criterios de inclusión

1. Individuos de sexo masculino con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-frágil (mutación completa).
2. Derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social, nacido en alguno de los estados de jurisdicción de la UMAE de Pediatría, e hijo de padres mexicanos.

Criterios de no inclusión

1. No aceptación a participar en el estudio.

Criterios de eliminación

Pacientes en los que el proceso metodológico no se logre adecuadamente.

VARIABLES OPERACIONALES

Variable independiente: Estado mutacional del gen *FMR1*.

Variable dependiente: Expresión citoplasmática de la FMRP.

PROCEDIMIENTO GENERAL

(Ver Diagrama de Flujo y Anexo 1: Descripción de la metodología)

Las muestras de ADN de los pacientes con diagnóstico clínico de síndrome X-frágil y de los individuos del grupo control, cuya concentración y calidad de ADN fueron aceptables, se sometieron a tratamiento con bisulfito de sodio para la modificación de ADN, lo que permitió la identificación del tamaño de la secuencia repetitiva CGG mediante PCR simple, y la determinación del estado de metilación del promotor del gen *FMR1* (Panagopoulos et al., 1999). El procedimiento contempló los siguientes pasos:

1. Obtención de la muestra.
2. Extracción del ADN mediante método de Miller (Miller et al., 1988).
3. Modificación de una alícuota de ADN mediante tratamiento con bisulfito de sodio.
4. Amplificación de las secuencias repetitivas CGG y de las islas CpG adyacentes al promotor del gen *FMR1*, mediante PCR.
5. Separación de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 y 12% (acrilamida: bis acrilamida 29:1) (Rickwoooo y Hames, 1988).
6. Tinción con nitrato de plata para visualizar el producto amplificado (Sanguinetti et al., 1994).
7. Determinación del tamaño de las secuencias repetitivas y el estado de metilación de las islas CpG.
8. Determinación del grupo control y grupo de pacientes.

Posteriormente, la determinación de la expresión de la FMRP en linfocitos de sangre periférica del grupo de pacientes con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-frágil y del grupo control se llevo a cabo mediante técnica inmunohistoquímica (Willemsen et al., 1997). El procedimiento contempló los siguientes pasos:

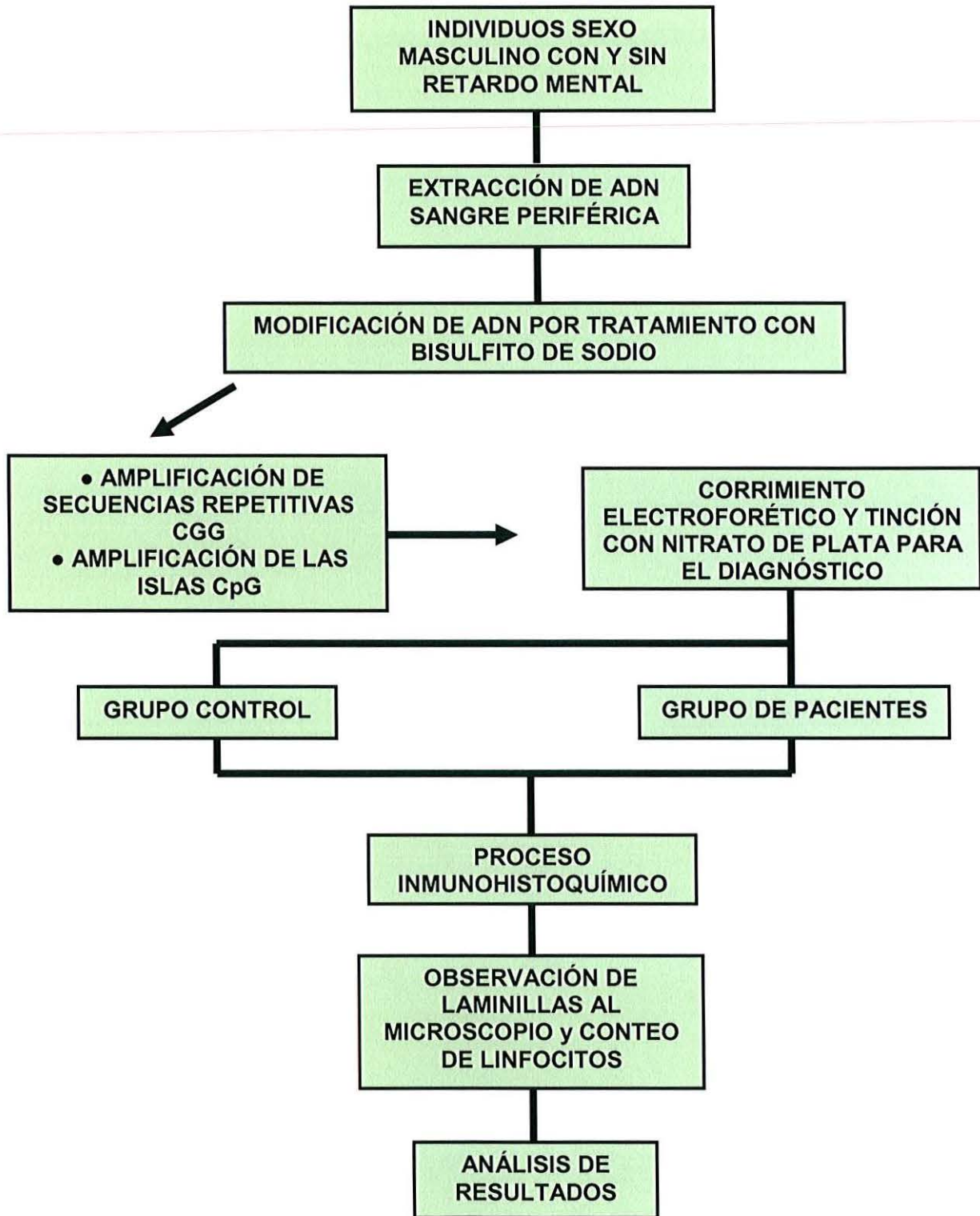
1. Obtención de la muestra.
2. Elaboración de frotis sanguíneos.
3. Efectuar la aplicación de la técnica inmunohistoquímica.

4. Fijación y conservación de la muestra preparada con entellan o bálsamo de Canadá.

5. Observación de laminillas al microscopio y conteo de linfocitos.

Elaborados el diagnóstico molecular e inmunohistoquímico del grupo de pacientes con síndrome X-frágil y el grupo control, se efectuó el análisis y comparación de resultados: diagnóstico molecular versus diagnóstico inmunohistoquímico.

DIAGRAMA DE FLUJO



PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

(Ver anexo 1)

1. Obtención de la muestra

De cada individuo se colectaron de 5 a 10 mL de sangre periférica obtenida por punción venosa en un tubo con sistema de vacío (vacutainer Beckton Dickinson), con EDTA al 10% como anticoagulante.

2. Obtención del paquete de leucocitos

Para la obtención del paquete de leucocitos se siguió el siguiente procedimiento:

1. De cada muestra de sangre periférica se efectúa la separación de leucocitos mediante una solución de lisis de eritrocitos (10:1 de NH_4Cl 0.144 M y NH_4HCO_3 0.01 M).
2. Se agregan 20 mL de esta solución de lisis a la muestra de sangre, se mezcla por inversión y se deja reposar durante 15 minutos a 4°C.
3. Posteriormente, se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos.
4. Se descarta el sobrenadante.
5. Se agregan otros 20 mL de la solución de lisis, se resuspende el paquete de leucocitos y se repite este mismo procedimiento hasta que el paquete de leucocitos quede libre de eritrocitos (Miller et al., 1988).

3. Extracción del ADN genómico

La lisis de leucocitos y la extracción de ADN se llevaron a cabo por el método de Miller, el cual involucra la saturación con sales de las proteínas celulares por precipitación con una solución saturada de cloruro de sodio. Se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. El paquete de leucocitos se resuspende en 3 mL de buffer de lisis de leucocitos (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, y Na_2EDTA 2 mM pH 8.2).
2. Posteriormente se agregan 0.2 mL de SDS al 10% y 0.125 mL de solución de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en SDS al 1% y Na_2EDTA 2 mM pH 8.2), se incuba el paquete de leucocitos en esta solución a 37°C durante toda la noche.

3. Se agrega 1 mL de una solución saturada de NaCl 6 M y se mezcla vigorosamente durante 15 segundos y se centrifuga por 20 minutos a 3500 rpm.
4. El sobrenadante se pasa a otro tubo de plástico estéril de 50 mL y se agregan de dos a tres volúmenes de etanol absoluto frío.
5. El ADN precipitado se toma con una punta estéril y se pasa a un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL estéril conteniendo de 100-200 μ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, y Na₂EDTA 2 mM pH 7.5) (Miller et al., 1988).

4. Determinación de la concentración y calidad del ADN

a) **Cuantificación por espectrofotometría** (Sambrook y Russell, 2001).

Para determinar la cantidad del ADN genómico en la muestra se siguió el siguiente procedimiento:

1. Colocar 1000 μ L de agua destilada en una celdilla de cuarzo
2. Colocar 1 μ L de muestra de ADN en la celdilla.
3. Determinar la absorbancia (densidad óptica, DO) a 260 y 280 nm.
4. Estimar la concentración de ADN a partir de dicha lectura por la siguiente fórmula:

$$\text{ADN ng}/\mu\text{L} = (\text{DO } 260 \text{ nm}) (\text{FD}) (* 50) \quad \text{en donde:}$$

FD= Volumen total/Volumen de la muestra; en este estudio es igual a 1001/1 μ L.

- *50 es una constante, es el coeficiente de extinción molar de 50 ng de ADN que es la máxima absorbancia de 1.0 unidad de DO a 260 nm.

- Para determinar la pureza de ADN (cantidad de proteínas), el valor de la relación DO 260 nm/DO 280 nm, debe estar entre 1.8 y 2.0 para considerarse como satisfactoria.

b) **Electroforesis en gel de agarosa** (Sambrook y Russell, 2001).

Para determinar la integridad del ADN, su estado de degradación, y la concentración de sales se siguió el siguiente procedimiento:

1. Preparar el gel de agarosa 1%.
2. Utilizar TBE 1X como buffer de corrimiento, adicionado a la cámara de electroforesis.

3. Mezclar 2 μL de ADN disuelto en buffer TE y 1 μL de buffer de carga 6X.
4. Aplicar la mezcla anterior en los pozos del gel.
5. Efectuar el corrimiento, en condiciones de voltaje constante 60 volts por aproximadamente 2 horas.
6. Teñir el gel sumergiéndolo en bromuro de etidio 0.5 mg/mL por 5 minutos.
7. Visualizar el ADN con el transiluminador de luz UV.

5. Modificación del ADN por tratamiento con bisulfito de sodio:

Las muestras de ADN cuya concentración y calidad de ADN fueron aceptables se sometieron al tratamiento con bisulfito de sodio (Panagopoulos et al., 1999).

Para la modificación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. 5 μg de ADN genómico se desnaturalizan a 95°C por 5 minutos.
2. Se incuba el ADN a 37°C por 30 minutos con NaOH a una concentración final de 0.3 M.
3. Se incorpora el bisulfito de sodio (pH 5.0) e hidroquinona a una concentración final de 3.1 M y 0.5 mM respectivamente en un volumen de 500 μL , incubando a 55°C por 16 horas con 56 μL de agua grado HPLC y 150 μL de aceite mineral.
4. Desalación del ADN mediante el kit "Wizard ADN clean-up system" de Promega (www.promega.com), siguiendo sus instrucciones.
5. Se transfiere el ADN con el bisulfito a un tubo de 1.5 mL estéril procurando no llevarse el aceite mineral, se agrega 1 mL de resina ADN-clean-up del mismo kit y se mezcla varias veces por inversión.
6. Se transfiere la mezcla resina-ADN a la base de la columna, y se aplica vacío.
7. Se añade 2 mL de isopropanol al 80% a la base de la columna y se aplica vacío.
8. Se retira la base de la columna y se coloca la columna en otro tubo estéril de 1.5 mL.
9. Se centrifuga la columna a 10,000 rpm por 2 minutos para remover los residuos del isopropanol.
10. Se transfiere la columna a otro tubo estéril de 1.5 mL, se añaden 50 μL de agua grado HPLC, precalentada (70°C), y se deja reposar por un minuto, se centrifuga la columna por 20 segundos a 10,000 rpm.

11. Se descarta la mini-columna, se agrega al tubo NaOH a una concentración final de 0.3 M y 6 μ L de agua grado HPLC, se incuba a 37°C por 15 minutos.
12. La solución se neutraliza por adición de 120 μ L de acetato de amonio (pH 7.0) a una concentración final de 5 M.
13. Se precipita el ADN con 600 μ L de etanol absoluto frío, se centrifuga por 8 minutos a 10,000 rpm y se descarta el sobrenadante, se deja secar por 24 horas y se resuspende en 50 μ L de agua grado HPLC e incubar en baño maría por media hora.

6. Amplificación de la región que contiene las repeticiones CGG y las Islas CpG mediante la PCR

Para amplificar la cadena antisentido de 3'-5' del gen *FMR1*, el cual contiene las islas CpG y las secuencias repetitivas CGG, fueron diseñados los iniciadores FR754F y FR526R para las repeticiones CGG; FR690F y FR611R para las islas CpG. En este caso, los iniciadores contienen timina para unirse a los uracilo que resultaron de la modificación de las citosinas no metiladas (Panagopoulos et al., 1999).

Iniciadores para las repeticiones CGG del gen *FMR1*:

- **FR754F:** 5' (CAA CCT CAA TCA AAC ACT CAA CTC CA) 3' N = 26
- **FR526R:** 5' (GGG AGT TTG TTT TTG AGA GGT GGG) 3' N = 24

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. Programar 31 ciclos con los pasos 2 al 4.
6. Extensión final 10 min. a 74°C.
7. Mantener a 4°C (opcional).

Cada reacción de amplificación se efectuó en un volumen final de 25 μL , en microtubos eppendorf de 0.2 mL.

Mezcla de reacción para las repeticiones CGG

Reactivo	Concentración		Concentración
	Inicial	Cantidad	Final
PCR Buffer	10X	2.5 μL	1X
PCR Enhancer	10X	2.5 μL	1X
MgSO ₄	25 mM	3.0 μL	3 mM
Mezcla de dNTP's	10 mM	2.0 μL	0.2 mM c/u
Iniciador FR526R	25 pmol/ μL	0.5 μL	12.5 pmol.
Iniciador FR754F	25 pmol/ μL	0.5 μL	12.5 pmol.
Taq platinum	5 U/ μL	0.25 μL	1.25 U/ μL
ADN	-----	2.0 μL	200 ng
Aforar con H ₂ O	-----	25 μL	-----

Iniciadores para las islas CpG en el gen *FMR1*

- **FR690F:** 5' (AAC GAC GAA CCG ACG ACG) 3' N = 18
- **FR611R:** 5' (CGT CGT CGC GTT GTC GTAC) 3' N = 19

Condiciones de amplificación de las islas CpG en el síndrome X-frágil

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

1. Desnaturalización inicial 5 min. a 94°C.
2. Desnaturalización 30 s a 93°C.
3. Alineación de iniciadores 30 s a 65°C.
4. Extensión 30 s a 74°C.
5. Programar 31 ciclos con los pasos 2 al 4.
6. Extensión final 10 min. a 74°C.
7. Mantener a 4°C (opcional).

Cada reacción de amplificación se efectuó en un volumen final de 25 μL , en microtubos eppendorf de 0.2 mL.

Mezcla de reacción de las islas CpG en el síndrome X-frágil

Reactivo	Concentración		Concentración
	Inicial	Cantidad	Final
Buffer	10X	2.5 μL	1X
MgCl ₂	25 mM	3.0 μL	3 mM
Mezcla de dNTP's	10 mM	2.0 μL c/u	0.2 mM c/u
Iniciador FR611R	25 pmol/ μL	0.5 μL	12.5 pmol.
Iniciador FR690F	25 pmol/ μL	0.5 μL	12.5 pmol.
Taq polimerasa	5 U/ μL	0.4 μL	1.25 U/ μL
ADN	-----	3.0 μL	300 ng
Aforar con H ₂ O	-----	25 μL	-----

7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (29:1)

1. Preparar geles de poliacrilamida al 6 y 12% (Sambrook y Russell, 2001).
2. Utilizar TBE 1X como buffer de corrimiento, adicionarlo a la cámara de electroforesis.
3. Adicionar y mezclar los 25 μL de los productos de PCR con 5 μL de buffer de carga 6X.

8. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata (Sanguinetti et al., 1994).

1. Obtener el gel de los cristales y colocarlo en un recipiente, lavar con abundante agua desionizada.
2. Agregar solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 0.5%) durante 10 minutos y eliminar la solución.
3. Agregar nitrato de plata al 0.2% disuelto en solución fijadora durante 5 minutos y eliminar la solución.

4. Lavar con agua desionizada durante 2 minutos, haciendo mínimo 2 cambios de agua y eliminar el agua.
5. Agregar solución reveladora (NaOH 3.0%, formaldehído 0.5%) hasta la aparición de bandas (5-15 minutos) y eliminar la solución.
6. Enjuagar con solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 0.5%) por 1 minuto y eliminar la solución.
7. Enjuagar con agua destilada por 2 minutos, haciendo mínimo 2 cambios de agua y eliminar el agua.
8. Montar el gel sobre un acetato y envolverlo con una bolsa de plástico transparente.
9. Tomar fotografía y registrar.

9. Determinación del tamaño de la secuencia repetitiva CGG y del estado de metilación de las islas CpG

a) Determinación del número de repeticiones CGG.

Por la ubicación de los iniciadores empleados, la secuencia a amplificar CGG tendrá 183 pb más el tamaño de la secuencia repetitiva CGG que es particular para cada caso (Panagopoulos et al., 1999).

Para determinar el número de repeticiones CGG se utiliza la siguiente fórmula.

$$\text{N}^\circ \text{ de repeticiones CGG} = \frac{\text{Tamaño del amplificado (en pares de bases)} - 183 \text{ pb}}{3}$$

b) Determinación del estado de metilación de las islas CpG.

En varones con la mutación completa se amplifican las islas CpG del gen *FMR1* que están metiladas. En este caso, 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.

10. Determinación del grupo control y de pacientes

Se analizan los resultados del diagnóstico molecular y se determinan los pacientes y el grupo control.

11. Aplicación de la técnica inmunohistoquímica

Las muestras de sangre obtenidas por punción venosa con tubos con anticoagulante EDTA, fueron sometidas al procedimiento inmunohistoquímico (Willemsen et al., 1997). Para la elaboración del proceso inmunohistoquímico se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se realiza la extensión sanguínea con una gota de sangre en un portaobjetos, directamente después de la toma de muestra y se deja secar a temperatura ambiente.
2. Se montan 2 láminas con caras invertidas en una solución fijadora con pH 7.4 (buffer de Sörrensen fosfato) en 4% de paraformaldehído durante 10 min. El objetivo de este paso es evitar la descomposición estructural, impedir la disfunción de componentes solubles y fortalecer el tejido.
3. Se procede a montar las láminas en metanol al 100% durante 20 min; con el objetivo de lograr el paso de los distintos anticuerpos a través de la membrana celular.
4. Se enjuagan las laminillas en PBS 0.1 M (buffer de Sörrensen fosfato) durante 5 min.
5. Se bloquea la actividad de la peroxidasa endógena por 30 min; con el fin de que la peroxidasa que se usa como cromógeno sustrato sea la única responsable de darle la coloración carmelita al citoplasma cuando este presente la proteína.
6. Se enjuagan las laminillas en PBS+ tres veces por 5 min.
7. La primera inmunoincubación se realiza con un anticuerpo monoclonal (T1A DAKO), agregando 100 µL por laminilla durante una hora a temperatura ambiente o a 4 °C por toda la noche.
8. Se enjuagan las laminillas en PBS+ tres veces por 5 min.

9. La segunda inmunoincubación se realiza con un anticuerpo de amplio espectro con biotina (ZYMED Histostain Plus-Kit "Reactivo B", 8596-43), no diluido, usando 100 μ L por portaobjeto durante 10 min.
10. Se enjuagan las laminillas en PBS+ tres veces por 5 min.
11. La tercera inmunoincubación se realiza con la enzima conjugada que consiste en un complejo estreptavidina-peroxidasa biotinilada (ZYMED Histostain Plus-Kit, "Reactivo C", 8596-43), no diluida, usando 100 μ L por portaobjeto durante 10 min; si esta etapa no ocurre, se bloquea la cascada de reacciones antígeno-anticuerpo, no visualizándose el halo carmelita.
12. Se enjuagan las laminillas en PBS+ cuatro veces por 5 min (mientras tanto se saca el buffer sustrato DAB y se deja templar).
13. Se enjuagan las laminillas en PBS 0.1 M por 5 min.
14. La cuarta inmunoincubación se realiza con el sustrato cromógeno DAB (ZYMED Histostain Plus-Kit "Reactivo D1,D2 y D3", 8596-43), tres veces por 15 min usando 100 μ L por portaobjeto; esto garantizará la coloración de la proteína en el citoplasma.
15. Se enjuagan las laminillas en agua destilada por 5 min.
16. Se realiza la contratinción con el Nuclear Fast Red (FLUKA Nuclear Fast Red Kernechtrot, 60700) por 7 min; esto permite la coloración del núcleo lo que facilita la distinción del resto de los elementos formes de la sangre y a su vez visualizar el halo carmelita cuando está presente la proteína.
17. Posteriormente las laminillas se deshidratan procesándose con alcohol etílico que se encuentran en diferentes concentraciones: 80%, 96%, 100% y 100%, seguido de alcohol etílico limpio al 100% por 20 s; siguiendo también la deshidratación en xilol por 20 s.
18. Una vez que se escurre el exceso de xilol, se deposita una gota de Entellan o bálsamo de Canadá sobre un cubreobjetos, dejándolo caer sobre la lámina procesada, evitando la formación de burbujas de aire; se deja secar toda la noche a 37°C. Este paso tiene por objetivo fijar la preparación y permitir su conservación, durabilidad y visualización.

Durante el proceso se efectuaron varios lavados, estos lavados tienen la función de ir eliminando sustancias o partículas no deseadas que puedan interferir con la calidad del estudio.

12. Observación de laminillas al microscopio y conteo de linfocitos

Una vez concluida la técnica inmunohistoquímica, se procede al análisis microscópico de la lámina para el cual se observa la reacción antígeno-anticuerpo de 100 linfocitos, en donde se observa la presencia o ausencia de la proteína citoplasmática.

13. Análisis y comparación de resultados

Efectuado una vez el diagnóstico molecular del gen *FMR1* y el diagnóstico inmunohistoquímico de la FMRP, se procedió al análisis y comparación de resultados.

TESIS/CUCBA

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se lleva a cabo mediante la utilización de tablas de contingencia de 2X2, para determinar la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo del procedimiento.

Se calculan los parámetros siguiendo las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c} \times 100 = \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d} \times 100 = \%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{a}{a + b} \times 100 = \%$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{d}{c + d} \times 100 = \%$$

En donde:

a = Es el número de individuos que tienen un resultado positivo para el diagnóstico molecular y un resultado negativo en la prueba de detección de la expresión de la FMRP.

b = Es el número de individuos que tienen un resultado negativo para el diagnóstico molecular y un resultado negativo en la prueba de detección de la expresión de la FMRP.

c = Es el número de individuos que tienen un resultado positivo para el diagnóstico molecular y un resultado positivo en la prueba de detección de la expresión de la FMRP.

d = Es el número de individuos que tienen un resultado negativo para el diagnóstico molecular y un resultado positivo en la prueba de detección de la expresión de la FMRP.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

A los padres o tutores de los pacientes con síndrome X-frágil, así como de los controles, se les solicitó la firma de una carta de consentimiento informado, de acuerdo a las normas internacionales establecidas (Anexo 2).

RESULTADOS

De cada una de las muestras analizadas (22 muestras) en este estudio, se logró la extracción de ADN de suficiente cantidad y calidad para el diagnóstico molecular del gen *FMR1*, que incluyó: 1) la identificación del tamaño de la secuencia repetitiva CGG, y 2) la determinación del estado de metilación de las islas CpG adyacentes al promotor del gen. Ambos procesos mediante PCR simple en ADN modificado con bisulfito de sodio. Esta etapa permitió identificar inicialmente dos grupos de individuos, un grupo control y un grupo de pacientes con síndrome X-frágil presentando mutación completa. Posteriormente se realizó diagnóstico inmunohistoquímico del producto génico para determinar la expresión de la FMRP en linfocitos de sangre periférica.

En todos los pacientes se observó e identificó la mutación completa y la metilación de las islas CpG adyacentes al promotor del gen *FMR1*. Los controles mostraron, en todos los casos, menos de 34 repeticiones CGG y no presentaron metilación de las islas CpG adyacentes al promotor del gen *FMR1* (Figuras 7 y 8).

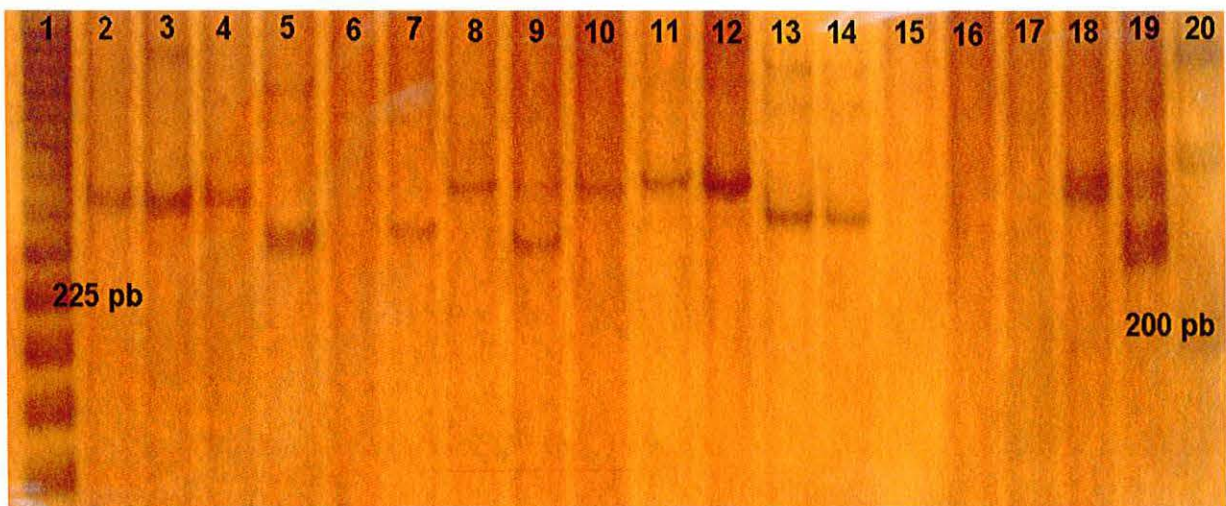


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de los productos amplificados de la secuencia repetitiva CGG del gen *FMR1*. Carril 1: marcador de 25 pb, carriles 2-5, 7-8, 10-14 y 18: varones sanos, carriles 9 y 19: mujeres sanas, carriles 6, 15-17: varones afectados, carril 20: marcador de 100 pb.

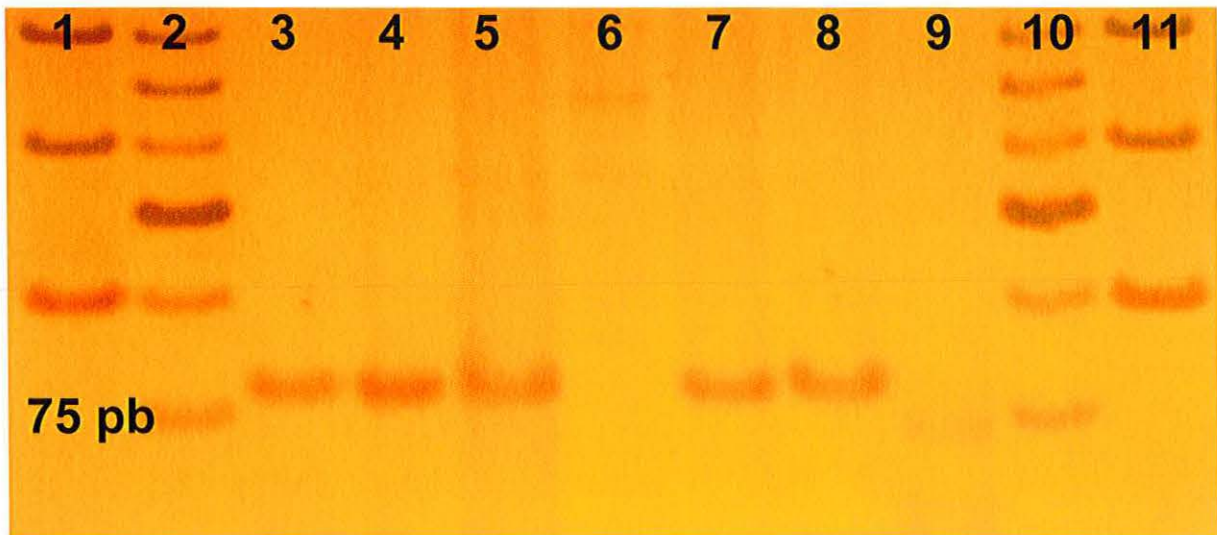


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de los productos amplificados de las islas CpG del gen *FMRI*. Carriles 1 y 10: marcador de 50 pb, carriles 2 y 11: marcador de 25 pb, carriles 3-5 y 7-8 varones afectados, carriles 6 y 9: varones sanos.

En cuanto al diagnóstico inmunohistoquímico, las laminillas fueron analizadas independientemente por dos observadores en una prueba de doble ciego, y los resultados presentados muestran en porcentajes los valores promedios obtenidos para cada muestra. En general se encontró que todos los pacientes con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-frágil mostraron poca o nula expresión de la FMRP (Figura 9).

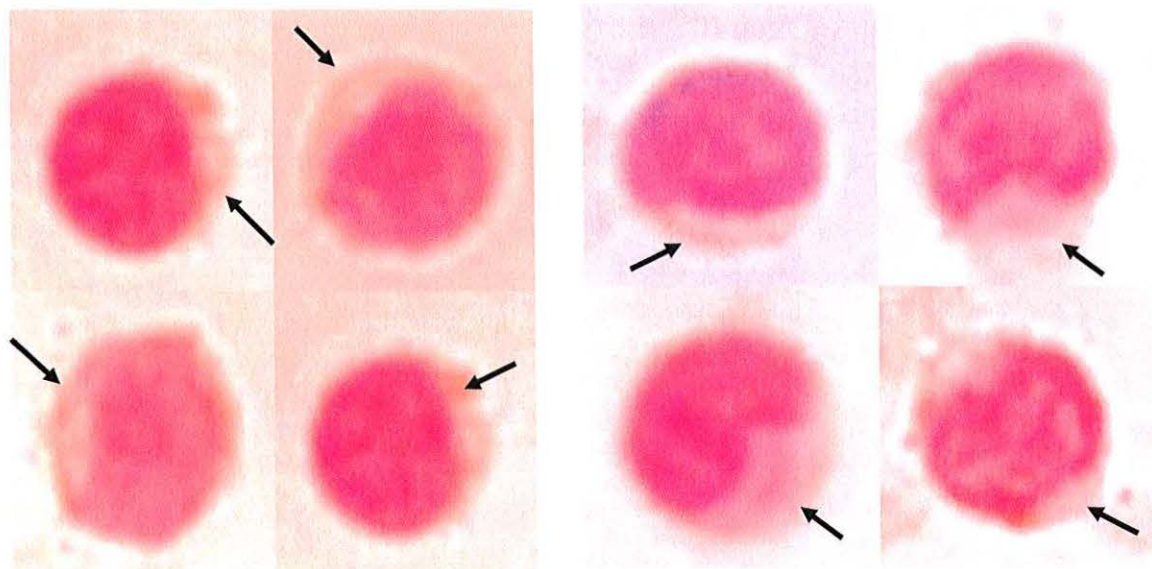


Figura 9. Linfocitos de pacientes con síndrome X-frágil, muestran citoplasma claro en ausencia de la FMRP (flechas).

Los controles mostraron en cambio, que todos sus linfocitos expresaban la FMRP en diferentes porcentajes (Figura 10).

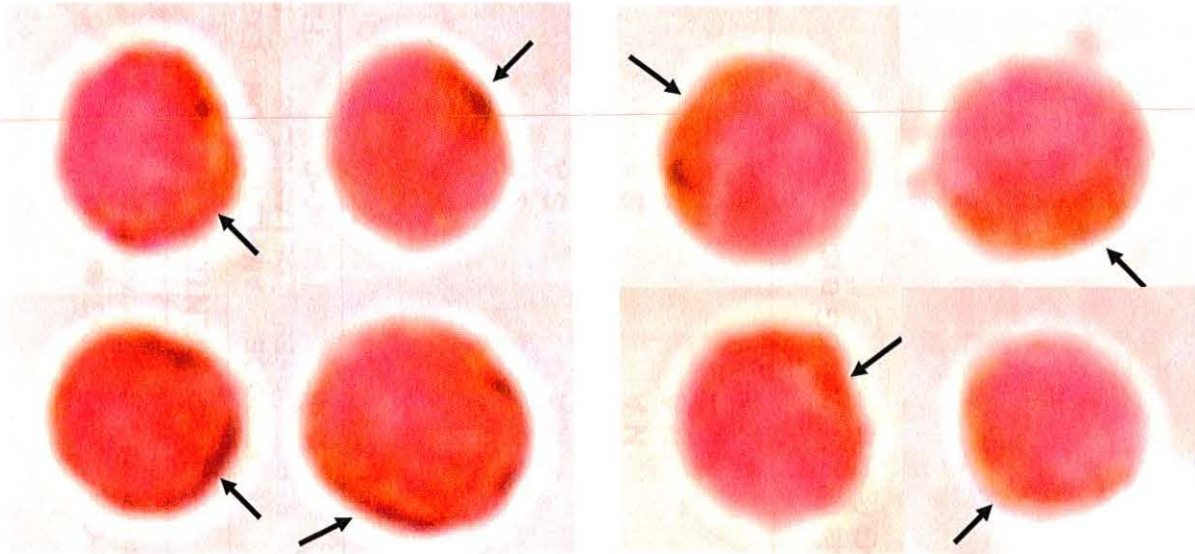


Figura 10. Linfocitos de controles que muestran en su citoplasma la FMRP (flechas).

Se observan las diferencias en la amplificación de las repeticiones CGG, las islas CpG del gen *FMR1*, y los porcentajes de expresión de la FMRP en los pacientes X-frágil y controles en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados de la amplificación de las repeticiones CGG, las islas CpG del gen FMR1, y expresión de la FMRP en linfocitos de pacientes con síndrome X-frágil y en controles.

CONTROLES				PACIENTES			
MUESTRA	NÚMERO DE REPETICIONES CGG	AMPLIFICACIÓN DE LAS ISLAS CpG	EXPRESIÓN DE LA FMRP (%)	MUESTRA	NÚMERO DE REPETICIONES CGG	AMPLIFICACIÓN DE LAS ISLAS CpG	EXPRESIÓN DE LA FMRP (%)
1	32	*N A	83	1	*N A	**S A	7
2	32	N A	90	2	N A	S A	5
3	32	N A	94	3	N A	S A	0
4	22	N A	94	4	N A	S A	10
5	32	N A	92	5	N A	S A	5
6	30	N A	87	6	N A	S A	1
7	32	N A	87.5	7	N A	S A	0
8	30	N A	88.5	8	N A	S A	0
9	22	N A	93	9	N A	S A	5
10	25	N A	90	10	N A	S A	0
11	34	N A	72.5	11	N A	S A	0

* N A = No existe amplificación de la secuencia repetitiva CGG e islas CpG.

** S A = Si existe amplificación de las islas CpG (afectados).

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante aplicación de la tabla de contingencia 2X2 a los resultados obtenidos a partir de los dos grupos de estudio (pacientes y controles), y con los procedimientos realizados. Los resultados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Comparación de los resultados obtenidos por PCR simple en ADN modificado de la secuencia repetitiva del gen FMRI, metilación de las islas CpG y detección de la expresión de la FMRP en linfocitos por inmunohistoquímica.

		PCR EN ADN MODIFICADO		
		**Mutado	*Normal	TOTAL
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA FMRP	Ausencia	11	0	11
	Presencia	0	11	11
		11	11	22

** No amplifica la secuencia repetitiva CGG, pero si las islas CpG: (Afectados).

* Amplifica la secuencia repetitiva CGG pero no las islas CpG: (Sanos).

La sensibilidad de la prueba, calculada en base a esta tabla de contingencia es del 100%, al igual que la especificidad. Consecuentemente, los valores predictivos positivo y negativo fueron también del 100%.

DISCUSIÓN

Se conoce que la mutación que causa el síndrome X-frágil es un incremento de la secuencia repetitiva CGG a más de 200 tripletes, lo que desencadena un proceso de hipermetilación que da lugar a la inactivación del promotor del gen *FMR1* e impide el proceso de transcripción y la síntesis de la FMRP. Por otro lado, se ha reportado que el tamaño de la secuencia repetitiva CGG no siempre está directamente relacionado con la expresión de la FMRP. Así, existen individuos con grandes premutaciones y pequeñas mutaciones en los que el gen *FMR1* se encuentra metilado en la mayoría de sus células, por lo que no hay expresión de la FMRP; o individuos con mutación completa en la que el gen *FMR1* no se encuentra metilado y expresan la FMRP, o que son mosaicos para la mutación y muestran células con el gen *FMR1* no metilado, permitiendo la expresión parcial de la FMRP. Además está el hecho bien demostrado que todos los varones con síndrome X-frágil presentan mosaicismo, ya que tienen diferentes tamaños de la secuencia repetitiva CGG en las diferentes células, por lo que expresan en algún grado un porcentaje disminuido de la FMRP.

En este estudio se analizaron 22 individuos mexicanos (hijos de padres mexicanos), que incluyeron 11 pacientes con diagnóstico clínico y molecular de síndrome X-frágil presentando mutación completa, y 11 controles sanos en los que se verificó molecularmente el estado normal del gen *FMR1*. Los resultados obtenidos a partir de los 22 individuos estudiados mediante PCR simple en ADN modificado con bisulfito de sodio, se compararon con los resultados obtenidos de estas mismas muestras mediante el proceso inmunohistoquímico. El análisis muestra una relación establecida como esperada, entre el estado mutacional del gen, el estado de metilación de las islas CpG adyacentes al promotor del gen y la expresión de la FMRP, tanto en pacientes con síndrome X-frágil como en los controles. No encontramos pacientes con mutación completa en los que el promotor del gen *FMR1* se encuentre activo y expresando la FMRP; sin embargo, se observa expresión parcial de la FMRP en algunos pacientes, lo cual podría explicarse por el hecho bien demostrado de que todos los varones con síndrome X-frágil presentan algún grado de mosaicismo (de Vries et al., 2003). También se encontró diferencias en la

expresión de la FMRP en los controles, lo cual puede ser debido a: 1) errores técnicos en el procedimiento inmunohistoquímico, y 2) error subjetivo del observador para el conteo de los linfocitos con o sin expresión de la FMRP.

El proceso para establecer la expresión de la proteína FMRP a nivel del citoplasma de los linfocitos, no deja de ser un proceso cualitativo, con poca injerencia de la subjetividad y la experiencia del observador. La presencia o no de la proteína citoplasmática no es un fenómeno del todo o nada, pues existen una serie de situaciones intermedias en las que es difícil determinar, sin duda alguna, que el linfocito que se está observando muestra realmente la FMRP. El análisis de las laminillas mediante dos observadores que no tenían la información respecto a la procedencia de las mismas (paciente o control) permitió establecer una diferencia en la calificación de los linfocitos (expresando o no FMRP) de hasta 14%, con una media de 4.6%. Tal diferencia, sin embargo, no logró poner en duda el diagnóstico inmunohistoquímico en ninguno de los casos estudiados.

Willemsen y colaboradores, mediante estudios poblacionales, establecieron que el porcentaje de corte para el nivel de expresión de la proteína en varones era de 42%; por debajo de este límite se considera que existe disminución de la expresión de FMRP. Para obtener dicho valor debe examinarse un mínimo de 80 linfocitos en varones. En mujeres el porcentaje de corte para el nivel de expresión de la proteína es de 83% (<83: afectada; >83: no afectada); para obtener este valor es necesario un mínimo de 50 linfocitos. Dichos valores poseen una sensibilidad del 100% en ambos sexos y una especificidad del 100% en varones y 41% en mujeres (Willemsen et al., 1997).

Los resultados observados en este estudio muestran una expresión de FMRP que supera ampliamente este límite, con porcentajes de expresión en linfocitos de individuos controles que sobrepasan el 72.5% y en afectados que en ningún caso es superior al 10%. El promedio de expresión de la proteína FMRP en linfocitos fue de 3% para el grupo de pacientes y de 88.3% para el grupo de individuos controles.

Los resultados de este estudio demuestran que:

- Se logró con éxito la determinación de la expresión de la FMRP en linfocitos de sangre por inmunohistoquímica de los pacientes X-frágil y los controles.

- Existe correlación directa entre el tamaño de la secuencia repetitiva CGG, el estado de metilación de las islas CpG adyacentes al promotor del gen *FMR1* y la expresión de la FMRP en linfocitos de sangre periférica tanto en pacientes positivos X-fragil como en los controles.
- El diagnóstico inmunohistoquímico mostró ser una prueba confiable con el 100% de sensibilidad y especificidad en relación a nuestro principal estándar (diagnóstico molecular por PCR simple en ADN modificado con bisulfito de sodio).

CONCLUSIONES

- La sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos positivo y negativo obtenidos en este estudio, demuestran que la detección de la expresión de la proteína se puede lograr en forma eficiente y confiable por inmunohistoquímica.
- La expresión del gen *FMR1*, mediante la identificación de la FMRP por medio de inmunohistoquímica es un procedimiento sencillo que se puede realizar para un número relativamente grande de individuos, lo cual facilita la elaboración de procedimientos de tamizaje en subpoblaciones de riesgo.
- El método resulta además económico, fácil y rápido.
- El diagnóstico inmunohistoquímico para el síndrome X-frágil constituye un instrumento mediador y complementario entre la evidencia clínica y la confirmación molecular directa de la mutación, el cual permite esclarecer algunos casos en los que los diagnósticos molecular y clínico parecen incongruentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. 2001. The fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull.* 56: 375-382.

Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U. 1991. Physical mapping across the fragile X: Hypermethylation and clinical expresion of the fragile X syndrome. *Cell.* 64: 861-866.

Condorelli DF, Milana G, Dell AP, Roccazzello AM, Insirello E, Pavone I, Mollica F. 1996. Routine clinical application of the FRAXA PFU PCR assay: Limits and utility. *Clin Genet.* 50: 366-371.

Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW. 1997. The fragile X mental retardation protein is associated with poliA mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet.* 6: 1465-1472.

Coy J, Sedlacek Z, Bächner D, Hameister H, Joos S, Lichter P, Delius H, Poustka A. 1995. Highly conserved 3'UTR and expression pattern of FXR1 points to a divergent gene regulation of FXR1 and FXR2. *Hum Mol Genet.* 4: 2209-2218.

de Vries B, Jansen C, Duits A, Verheij C, Willemsen R, van Hemel JO, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, Oostra B, Halley DJ. 1996. Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *J Med Genet.* 33: 1007-1010.

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

de Vries B, Halley D, Oostra B, Niermeijer M. 1998. The Fragile X syndrome. *J Med Genet.* 35: 579-589.

de Vries B, Severijnen L, Jacobs A, Olmer R, Halley D, Oostra B, Willemsen R. 2003. FMRP expression studies in blood and hairs roots in a fragile X family with methylation mosaics. *J Med Genet.* 40: 535-539.

Eichler E, Richards S, Gibbs R, Nelson D. 1993. Fine estructura of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 2: 1147-1153.

Ferrari E, Petit PG, Bastus B. 1992. Importancia del diagnóstico molecular en la detección de varones sanos transmisores de síndrome del X frágil. *An Esp Pediatr.* 36: 272-276.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability: Resolution of the Sherman Paradox. *Cell*. 67: 1047-1058.

Glóver-López G, Guillén-Navarro E. 2006. Síndrome X frágil. *Rev Neurol*. 42 (Supl 1): S51-4.

Godde JS, Kass SU, Hirst MC, Wolffe AP. 1996. Nucleosome Assembly on methylated CGG triplet repeats in the fragile X mental retardation gene 1 promoter. *Hum Genet*. 271: 24325- 24328.

Hagerman JP. 1996. Fragile X syndrome. Diagnosis treatment and Research. Second Edition. Jonh Hopkins.

Hoogeveen AT, Oostra B. 1997. The fragile X syndrome. *J Inher Metab Dis*. 20: 139-151.

Jin P, Warren ST. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 9: 901-908.

Knight JL, Hirts MC, Roche A. 1992. Molecular Studies of the Fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 43: 217-223.

Kooy RF, Willensen R, Oostra BA. 2000. Fragile X Syndrome at the turn of the century. *Mol Med today*. 6: 193-198.

Kunst CB, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux M, Holden JJ, Torroni A, Nelson DL, Warren ST. 1996. FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet*. 58: 513-522.

Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck- Lederer A, Fischer Utz. 2001. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet*. 10: 329-338.

Lambiris N, Peters H, Bollmann R, Leschik G, Leisti J, Salonen R, Cobet G, Oostra B, Willemsen R. 1999. Rapid FMR-1 protein analysis of fetal blood: an enhancement of prenatal diagnostics. *Hum Genet*. 105: 258-260.

Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. 2001. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucl Acid Res*. 29: 2276-2283.

McConkie-Rosell A, Lachiewicz AM, Spiridigliozzi GA, Tarleton J, Schoenwald S, Phelan MC, Goonewardena P, Ding X, Brown WT. 1993. Evidence that methylation of the FMR-1 locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. 53: 800-809.

Milá M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Barceló A, Badenas C, Mallolas J, Estivill X. 2000. Rare variants in the promotor of the fragile X syndrome gene FMR1. *Mol Cell Probes*. 14: 115-119.

Miller SA, Duker DD, Polesky HI. 1988. A simple salting out procedure from human nucleated cell. *Nucl Acid Res*. 16: 215.

Nussbaum RL, Ledbetter DH. 1995. 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. Edition New York.

Oostra B, Chiurazzi P. 2001. The fragile X gene and its function. Department of Clinical Genetics, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands.

Panagopoulos I, Lassen C, Kristoffersson U, Aman P. 1999. Methylation PCR approach for detection of fragile X syndrome. *Hum Mut*. 14: 71-79.

Peng J, Warren ST. 2000. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 9: 901-908.

Ramos-Fuentes F. 2001. Nuevos métodos de diagnóstico del Síndrome X Frágil: estudio de la FMRP en sangre y pelo. *Rev Neurol*. 33 (supl 1): S9-S13.

Rickwoooo D, Hames BD. 1988. Gel electrophoresis of nucleic acids, a practical approach. 5a. edition, IRL press Limited, Oxford, England. pp16.

Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Kretz C, Boué J, Tommerup N, Van der Hagen C, Delozier-Blanchet C, Croquette MF, GilgenKrantz S, Jalbert P, Voelckel MA, Oberlé I, Mandel JL. 1991. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med*. 325: 1673-1681.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Preparation and analysis of eukariotic genomic DNA. Commonly used techniques in molecular cloning. En: "Molecular cloning". Cold Spring Harbor. New York. Tercera edición. Capítulo 6 y apéndice 8.

Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJG. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques*. 17: 915-918.

Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE. 1973. Nucleic acid reactivity and conformation: Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem*. 248: 4060-4064.

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1993. The protein Product of the fragile X Gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*. 74: 291-298.

Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, Hoogeveen AT, Oosterwijk JC, Oostra BA. 1995. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum Mol Genet.* 4: 2103-2108.

Stetler A, Winograd C, Sayegh J, Cheever A, Patton E, Zhang X, Clarke S, Ceman S. 2006. Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein FMRP. *Hum Mol Genet.* 15: 87-96.

Tassone F, Hagerman RJ, Iklé DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, Oostra BA, Taylor AK. 1999. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 84: 250-261.

Taylor AK, Safanda JF, Fall MZ, Quince C, Lang KA, Hull CE, Carpenter I, Staley LW, Hagerman RJ. 1994. Molecular predictors of cognitive involvement in female carriers of fragile X syndrome. *JAMA.* 271: 507-14.

Tejada I, Mornet E, Biancalana V, Oberlé I, Boué J, Mandel JL, Boué A. 1992. Direct DNA analysis of fragile X syndrome in spanish pedigrees. *Am J Med Genet.* 43: 282-290.

Verheij C, de Graaff E, Bakker CE, Willensem R, Willems PJ, Meijer N, Galjaard H, Reuser AJ, Oostra B, Hoogeveen A. 1995. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet.* 4: 895-901.

Wang YH, Griffith J. 1996. Methylation of expanded CGG triplet repeat DNA from fragile X syndrome patients enhances nucleosome exclusion. *Am J Med Genet.* 271: 22937-22940.

Warren ST, Sherman SL. 2006. The Fragile X Syndrome. En: The metabolic basis of inherited disease. Scriver CR, Beaudet. AL., Sly Ws. Valle D. (Eds). Mc Graw-Hill. Inc. 8a. Ed. New York. pp 1257-1289.

Warren ST. 1997. Trinucleotide repetition and fragile X syndrome. *Hospital practice.* pp 73-98.

Wells RD. 1996. Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *J Biol Chem.* 271: 2875-2878.

Willemsen R, Mohkamsing S, de Vries B, Devys D, van den Ouweland A, Mandel J, Galjaard H, Oostra B. 1995. Rapid antibody test for fragile X syndrome. *Lancet.* 345: 1147-48.

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

Willemsen R, Anar B, De Diego Otero Y, de Vries BBA, Hilhorst-Hofstee Y, Smits A, van Looveren E, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA. 1999. Noninvasive Test for Fragile X Syndrome, Using Hair Root Analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 98–103.

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. Preparación de reactivos para purificación de ADN

1. Buffer de lisis de eritrocitos

Reactivo	Peso molecular	Cantidad	Concentración final
NH ₄ Cl	53.49 g	7.703 g /1 L	0.144 M
NH ₄ HCO ₃	79.06 g	0.0791 g/100 mL	0.01 M

Diluciones: Buffer 10:1: 500 mL NH₄Cl 0.144M+ 50 mL NH₄HCO₃ 0.01 M

Buffer 9:1: 450 mL NH₄Cl 0.144M+ 50 mL NH₄HCO₃ 0.01 M

- Esterilizar por autoclave.

2. Solución B (Proteínasa K)

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 500 mL	Concentración final
Tris	121.1 g	0.610 g	10 mM
NaCl	58.44 g	11.688 g	400 mM
EDTA	372.2 g	0.372 g	2 mM

- Ajustar a pH 8.2

3. Buffer TE

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 500 mL	Concentración final
Tris	121.1 g	0.0605 g	0.1 M
EDTA	372.2 g	0.0186 g	0.001 M

- Disolver en agua desionizada, ajustar a pH 7.5 con HCl 1 N y esterilizar en autoclave.

4. Solución de NaCl 6M

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 250 mL	Concentración
NaCl	58.44 g	87.66 g	6 M

- Esterilizar por autoclave.

5. Proteínasa K (Stock)

- Disolver 100 mg de proteínasa K en 25 mL de agua grado HPLC. La concentración final es de 4 mg / mL.
- Hacer alícuotas de 1.25 mL.
- Adicionar por muestra 125 μ L quedando una concentración final de 500 μ g por muestra.

6. Solución de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10%

- Disolver 50 g de SDS en 500 mL de agua destilada.

B. Preparación de reactivos para electroforesis

1. Buffer TBE 10X

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 1000 mL	Concentración final
Tris	121.1 g	108.0 g	0.89 M
EDTA	372.2 g	9.4 g	0.02 M
Ácido bórico	61.844 g	55.04 g	0.89 M

- Disolver primero el EDTA y Tris, posteriormente agregar el ácido bórico. La concentración del buffer es 10X, y se diluye 10 veces en agua destilada para la solución de trabajo (1X).

2. Buffer de carga o jugo azul 6X

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 10 mL	Concentración
Azul de bromofenol	691.9 g	25 mg	0.25 %
Xilencianol	538.6 g	25 mg	0.25 %
Glicerol	92.09 g	3 mL	30 %

- Mezclar ambos colorantes con el glicerol y aforar a 10 mL con agua desionizada.

3. Persulfato de Amonio al 10% (PSA)

- Disolver 5 g de persulfato de amonio en 50 mL de agua bidestilada.

4. Poliacrilamida (30%) 29:1

- Pesar 145 g de acrilamida, disolver y agregar 5 g de bis acrilamida, disolver y aforar a 500 mL con agua bidestilada.

C. Preparación de reactivos para la modificación del ADN

1. Bisulfito de sodio / Hidroquinona

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 10 mL	Concentración final
Bisulfito de sodio	104.06 g	4.0 g	3.1 M
Hidroquinona	110.11 g	0.068 g	0.5 M

○ Pesar y disolver primero el bisulfito de sodio, posteriormente ajustar el pH a 5.0, y por último incorporar la hidroquinona; aforar a un volumen de 10 mL con agua grado HPLC.

2. Acetato de Amonio

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 50 mL	Concentración
Acetato de Amonio	77.08 g	38.54 g	10 M

○ Ajustar a pH 7.0.

3. NaOH 1M

Reactivo	Peso molecular	Cantidad / 50 mL	Concentración
NaOH	40.0 g	2 g	1 M

○ Disolver 2 g de NaOH en 50 mL de agua destilada.

D. Preparación de reactivos para la PCR

1. Mezcla de dNTP's 10 mM

Concentración Inicial (100 mM)	1 μ L	H ₂ O μ L	Total	Concentración Final
dATP	5	45	50 μ L	10 mM
dCTP	5	45	50 μ L	10 mM
dGTP	5	45	50 μ L	10 mM
dTTP	5	45	50 μ L	10 mM

E. Preparación de soluciones para tinción con nitrato de plata

1. Solución fijadora

- Mezclar 100 mL de etanol absoluto con 5 mL de ácido acético.
- Aforar a 1 L con agua desionizada.

2. Solución con nitrato de plata al 0.2%

- Pesar 0.2 g de AgNO_3 y aforar a 100 mL con solución fijadora.

3. Solución reveladora

- Pesar 30 g de NaOH, agregar 5 mL de formaldehído y aforar a 1 L con agua desionizada.

F. Preparación de las muestras amplificadas

A cada producto amplificado se le adicionan 5 μL de buffer de carga 6X. Posteriormente se aplicaron las muestras en un gel de poliacrilamida al 6 y 12% (relación 29:1).

G. Marcadores de peso molecular

Se utilizaron 3 marcadores de peso molecular de diferentes tamaños para determinar el tamaño de las muestras:

- 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™) Cat No. 115628-019.
- 50 pb DNA Ladder (Invitrogen™) Cat No. 10416-014.
- 25 pb DNA Ladder (Invitrogen™) Cat No. 10597-011.

H. Preparación de los geles 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 100 mL).
- 4.6 mL de buffer TBE 10X (EDTA 0.02 M, Tris 0.89 M, ácido bórico 0.89 M) pH 8.0.
- 22.50 mL de agua destilada.
- 460 μL de persulfato de amonio al 10%.
- 46 μL de Temed.
- Se deja polimerizar por 30 minutos, y se coloca buffer de corrimiento (TBE 1X) dejándolo pre-correr por 15 min a 100 volts, se aplican las muestras. Se deja correr por 16 horas y media a 67 volts / 14 mA.

Gel de poliacrilamida al 6%

Relación 29:1

- 9.2 mL de poliacrilamida 29:1 (29 g de acrilamida, 1 g de bis acrilamida en 100 mL).
 - 4.6 mL de buffer TBE 10X (EDTA 0.02 M, Tris 0.89 M, ácido bórico 0.89 M) pH 8.0.
 - 31.6 mL de agua destilada.
 - 460 μ L de persulfato de amonio al 10%.
 - 46 μ L de Temed.
- Se deja polimerizar por 30 minutos, y se coloca buffer de corrimiento (TBE 1X) dejándolo pre-correr por 15 min a 100 volts, se aplican las muestras. Se deja correr por 16 horas y media a 67 volts / 14 mA.

I. Preparación de reactivos para técnica inmunohistoquímica

1. Buffer fosfato Sörrensen (PBS 0.1M, pH 7.4)

Reactivo	Concentración
Fosfato de sodio monobásico	0.2 M
Fosfato de sodio dibásico	0.2 M
hidróxido de sodio	10 M

- Disolver 120 g de fosfato de sodio monobásico anhidro (NaH_2PO_4) en 1 L de agua destilada (solución stock A).
- Disolver 142 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) en 1 L de agua destilada (solución stock B).
- Mezclar 210 mL de la solución stock A y 790 mL de la solución stock B.
- Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 10 M.
- Añadir 1 L de agua destilada, para tener un volumen de 2 L.

2. Paraformaldehído al 4%

Reactivo	Cantidad	Concentración
Paraformaldehído	4 g	-----
Buffer fosfato Sörrensen	-----	0.1 M

- Disolver 40 g de paraformaldehído en 1 L de buffer fosfato Sörrensen.
- Esterilizar la solución a 63 °C y almacenarla a -20 °C.

3. Buffer PBS-BLOCK

Reactivo	Concentración
PBS	0.2 M
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	30%
Azida de sodio	12.5%

- Disolver 0.125 g de azida de sodio en 1 mL de agua grado HPLC.
- Mezclar 100 mL de PBS 0.1 M con 2 mL de H₂O₂ al 30% y 1 mL de azida de sodio al 12.5%.

4. Buffer PBS +

Reactivo	Concentración
PBS	0.2 M
BSA (albúmina sérica bovina)	0.5%
Glicina	0.15%

- Disolver 5 g de BSA y 1.5 g de glicina en 1 L de PBS.

5. Substrato Cromógeno DAB (componente que forma parte del kit no. 85-9643, Histostain Plus Broad Spectrum DAB, ZYMED)

Reactivo	Concentración
D1 (tampón-sustrato concentrado)	20X
D2 (solución de cromógeno concentrado, DAB)	20X
D3 (peróxido de hidrógeno al 0.6%)	20X

- Añadir una gota del reactivo D1, una gota del reactivo D2 y una gota del reactivo D3 a 1 mL de agua grado HPLC.
- Mezclar bien, y proteger de la luz.
- Usar durante la hora siguiente.

6. Colorante Nuclear Fast Red (kit no. 15939, Nuclear Fast Red, MERCK)

Reactivo	Cantidad / 3 L
Nuclear Fast Red	3 g
Sulfato de aluminio $Al_2(SO_4)$	150 g

- Mezclar 3 g de Nuclear Fast Red y 150 g de $Al_2(SO_4)$ en 3 L de agua destilada.

ANEXO 2



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE

DIVISIÓN DE GENÉTICA

Fecha: _____

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente autorizo al Dr. Patricio Barros Núñez y colaboradores de la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica del IMSS, a extraerme una muestra de sangre venosa que será usada en el laboratorio de Bioquímica III, de la división de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO, IMSS) para realizar pruebas de tipo genético molecular e inmunohistoquímico que permitirán identificar **“La expresión de la proteína FMR1 en pacientes con Síndrome X-Frágil”**.

El Dr. Barros y sus colaboradores, no podrán hacer uso comercial ni lucrativo de los resultados obtenidos mediante el análisis genético de la muestra que se me va a tomar. Mi firma (o la de mi tutor) en este documento manifiesta mi participación voluntaria en este proyecto de investigación y no me obliga a la toma de nuevas muestras de sangre.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del representante o tutor

TESIS/CUCBA

Dirección y teléfono.....