

Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico del síndrome X-frágil

Mónica Alejandra Rosales-Reynoso,* Patricio Barros-Núñez*

Introducción

El síndrome X frágil representa la primera causa de retraso mental hereditario, afecta aproximadamente a uno de cada 4,000 varones y a una de cada seis mil mujeres de la población general. El cuadro clínico de estos pacientes incluye retraso mental, anormalidades físicas y trastornos de la conducta. En 1969, Lubs describió, en varios individuos con retraso mental, una fractura en el extremo distal del brazo largo del cromosoma X, a la que posteriormente se le denominó X frágil. Durante más de 10 años (1979-1991), 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, esta prueba se mostraba menos sensible, y en ocasiones no se encontraba fragilidad en ninguna metafase. Esto, junto con las dificultades técnicas del cultivo celular con medios pobres en ácido fólico, los resultados falsos positivos debido a la presencia de otros sitios frágiles adyacentes a éste, la falta de discriminación entre premutaciones y mutaciones completas y los requerimientos en tiempo y costo, fueron los principales inconvenientes del estudio cromosómico como método de diagnóstico de este padecimiento.¹

En 1991, Verkerk y colaboradores lograron identificar la alteración génica causante del síndrome X frágil. La mutación se encontraba en un gen situado en el sitio X-frágil (Xq27.3) y la denominaron FMRI (Fragile X Mental Retardation 1). Dicha mutación consiste en una expansión del trinucleótido CGG ubicada en la región 5' no traducida del exón 1 de este gen. Estudios posteriores determinaron que el número de repetidos CGG, presente en la población normal, variaba entre 5 y 50; mientras que en portadores el número incrementaba de 50 a 200 repetidos. Los individuos afectados muestran de 200 a 1000 o más repetidos, lo que desencadena un fenómeno de hipermetilación que da lugar al silenciamiento del gen y por ende ausencia de la proteína. Desde el descubrimiento de la mutación

responsable, la detección de la secuencia repetitiva en el gen ha constituido el método de elección para realizar el diagnóstico molecular del síndrome.^{1,2}

En 1993, Verheij y colaboradores identificaron la proteína del gen FMRI, a la que se denominó FMRP (Fragile Mental Retardation Protein), cuya ausencia causa el fenotipo clínico del síndrome.

Estudios iniciales, mediante Western blot en líneas celulares linfoblastoides, demostraron que los individuos con la mutación completa del gen FMRI carecían de la proteína, mientras que aquellos que presentaban la premutación la expresaban en niveles normales. La FMRP es una proteína con afinidad por el ARNR, al que, se une en su subunidad 60S. Aunque la proteína se ha localizado en el nucléolo, fundamentalmente se encuentra en el citoplasma unida a polisomas traduciendo activamente. Su ausencia afecta principalmente cerebro y gónadas.²

Actualmente se ha diseñado una serie de técnicas moleculares que permiten realizar el diagnóstico de estos pacientes, entre las que se incluyen Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis inmunohistoquímico. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas que serán analizadas en esta breve revisión.

Southern blot

Es el procedimiento de diagnóstico molecular más frecuentemente utilizado, permite visualizar en forma directa el tamaño de las secuencias repetitivas tanto en individuos normales como en premutados y mutados. Esta técnica puede usarse asociada o no a PCR y con o sin marcaje radiactivo; sin embargo, su utilización tiene algunos inconvenientes derivados de su complejidad, costo y requerimientos de tiempo y esfuerzo. Por otro lado, no permite determinar en forma precisa secuencias repetitivas de tamaño pequeño, lo que resulta extremadamente importante cuando necesitamos distinguir secuencias normales y premutadas. Además, no es posible identificar deleciones o rearreglos pequeños ubicados en la región que rodea la

División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México. Correspondencia: M. en C. Jaime Patricio Barros-Núñez. Sierra mojada # 800. Col. Independencia, Sector libertad. 44340. Guadalajara, Jalisco, México. Email: pbarrosgd@yahoo.com.mx

secuencia repetitiva. Otro inconveniente en el uso de esta metodología es que, en ocasiones, el sitio de restricción específico de la enzima (EcoRI), se muestra refractario a la digestión, lo cual genera fragmentos adicionales que dan lugar al diagnóstico de falsos positivos para la mutación completa en estos pacientes. De todas maneras, a pesar de su complejidad y de los potenciales riesgos cuando se usa el marcaje radioactivo, este procedimiento sigue siendo utilizado en todos los laboratorios que disponen de la infraestructura adecuada.³

Reacción en cadena de la polimerasa

Debido a que la región del gen FMRI en donde ocurre la mutación es rica en secuencias CG, por apareamiento entre ellas se forman estructuras secundarias que impiden o dificultan su amplificación por PCR simple. Esto ha llevado al uso de aditivos químicos como el dimetilsulfóxido (DMSO) o la formamida, así como de análogos de base como el 7-deaza-dGTP que, sustituyendo al dGTP, evitan la formación de tales estructuras. Este procedimiento presenta, sin embargo, varios problemas en su utilización: 1) El ADN que contiene el análogo de base migra más lento que el ADN intacto, por lo que se requiere de geles de poliacrilamida desnaturalizantes y marcadores de peso 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. Varios autores han propuesto que, sustituyendo parcialmente el análogo de base se logra amplificar y teñir secuencias de tamaño normal; sin embargo, existen varios reportes en los que se ha intentado, sin éxito, reproducir este procedimiento.^{3,4}

Análisis inmunohistoquímico

Gracias a la disponibilidad de anticuerpos dirigidos contra la FMRP, se han desarrollado pruebas de diagnóstico que permiten identificar pacientes con el síndrome X frágil, basadas en la presencia o ausencia de la proteína FMRP. Esta metodología tiene ciertas ventajas sobre otras, pues resulta económica y fácil de realizar; sin embargo, no permite la detección de portadoras de la premutación, ni de individuos mosaicos (mezcla de mutación completa y premutación).¹

PCR en ADN modificado. Actualmente se ha propuesto un procedimiento de diagnóstico molecular del síndrome, basado en la modificación del ADN que permite la amplificación de las secuencias repetitivas por PCR simple. El procedimiento convierte las citosinas no metiladas en uracilo, evitando la formación de las estructuras secundarias que impiden el funcionamiento de la ADN polimerasa en un proceso de PCR normal. Gracias a esta técnica se puede conocer el estado de metilación del gen FMRI, así como establecer el tamaño de la secuencia repetitiva tanto en

individuos normales como en portadores. Muestra gran ventaja en comparación a otras técnicas, ya que resulta fácil, económica y permite obtener resultados mediante la utilización de PCR sin ayuda de aditivos químicos ni de análogos de base. Amplificando, tanto las secuencias repetitivas y las islas CpG adyacentes del gen FMRI, como otros genes que muestran patrones de metilación diferentes, se logra detectar además, deleciones o mutaciones puntuales, mosaicismos y el estado de metilación del gen, lo que nos revela su condición de actividad. La desventaja es que no se puede visualizar la secuencia repetitiva en algunas portadoras y en los individuos afectados.⁵

Conclusiones

Existen varias decenas de padecimientos con retraso mental cuyos genes están ubicados en el cromosoma X, para los que el diagnóstico molecular de la mutación responsable resulta aún impracticable. El diagnóstico clínico del S. X-Frágil, debido a la gran variabilidad de su presentación fenotípica, suele ser difícil y hasta azaroso. En algunas series reportadas, en las que se evalúa el acierto diagnóstico del procedimiento, éste puede ser tan bajo como de sólo el 10%.

La posibilidad de detectar la expansión trinucleotídica responsable del S. X-Frágil, por los métodos moleculares analizados, aunque factible, resulta aún compleja y problemática. La búsqueda de un método de diagnóstico simple, económico y seguro, que permita detectar las pequeñas y grandes amplificaciones de trinucleótidos en el gen FMRI y determinar con certeza el estado mutacional de los individuos afectados así como el de sus familiares, aún no ha encontrado respuesta completa en ninguno de los procedimientos revisados.

El mecanismo de modificación del ADN, que sustituye citosinas por uracilos, evade la presencia de los grandes concentrados de CG y permite la amplificación de las secuencias repetitivas mediante PCR simple. Usado en forma complementaria con la técnica de Southern blot, se muestra como un procedimiento prometedor en el diagnóstico del S. X-Frágil. Interesantemente, se conocen más de una docena de padecimientos cuyo mecanismo mutacional causal es la amplificación de secuencias repetidas de trinucleótidos, y que presentan similares o iguales problemas de diagnóstico.

Referencias

1. **Warren ST and Sherman S.** The Fragile X syndrome. En: *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). Mc Graw Hill. Inc. 8va. Edition New York, 2001. p. 1257-1290
2. **Brow WT.** The molecular biology of the fragile X mutation. En: *Hagerman RJ, Cronister Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 1996. p. 88-113.
3. **Condorelli DF, Dell MG et al.** Routine clinical application of the FRAXA PFU PCR assay: Limits and utility. *Clin Genet.* 1996;50:366-371.
4. **Gold B, Radu D, Balanko A, Chiang CS.** Diagnosis of Fragile X Syndrome by Southern blot Hybridization using a chemiluminescent probe: A Laboratory protocol. *Mol Diag* 2000;5:169-178.
5. **Weinhausel A, Hass OA.** Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum Genet.* 2001;108:450-458.