

Tamizaje clínico y análisis de mutaciones en el gen FMR1 en 99 varones con características clínicas del síndrome de X-frágil

M. Angélica Alliende R.¹, Teresa Aravena C.², Alf Valiente G.³, Bianca Curotto L.⁴, Lorena Santa María V.³, Fanny Cortés M.⁵

Resumen

Introducción: El síndrome de X frágil (SXF) es una causa frecuente de retraso mental (RM), se presenta en 1 de 4 000 hombres y en 1 de 8 000 mujeres. A nivel molecular existen principalmente tres tipos de alteraciones: premutación, mutación completa y mosaicos, todas las cuales corresponden a amplificación del trinucleótido CGG localizado en el primer exón del gen FMR1: las premutaciones presentan entre 52 y 200 repetidos; las mutaciones completas, sobre 200 CGG, presentan hipermetilación de la región promotora del gen FMR1 e inhibición de la expresión de la proteína FMRP, causante del RM y dismorfias características de este síndrome. Los mosaicos presentan mutación completa y premutación o metilación parcial del gen FMR1. Los pacientes con SXF son diagnosticados clínicamente según un protocolo de tamizaje que considera 15 características clínicas que entrega un puntaje máximo de 30 puntos en individuos afectados. **Objetivo:** Definir criterios clínicos específicos para población chilena que ayuden a identificar a los individuos que deban ser sometidos a estudios moleculares confirmatorios de SXF. **Pacientes y Método:** Se consideraron 99 pacientes varones referidos al INTA por presentar retraso mental y características clínicas sugerentes del SXF; a todos se les realizó evaluación clínica utilizando el protocolo descrito por Buttler y estudio molecular con análisis directo del gen FMR1 por Southern blot. **Resultados:** 23 de los 99 pacientes estudiados presentaron una mutación en FMR1 y puntaje clínico entre 16 y 27 puntos; los 76 casos restantes con puntajes clínicos entre 10 y 26 puntos, no presentaron mutación en el gen FMR1. Se evaluaron las características clínicas en ambos grupos y se observó que 4 de ellas se asocian significativamente a la mutación, siendo tres de ellas independientes de la edad de los pacientes. **Conclusiones:** Con estos resultados y a fin de optimizar el estudio molecular directo del gen FMR1, proponemos que el criterio de selección de pacientes sea a través del examen clínico y que todo individuo con puntaje ≥ 15 puntos debe ser sometido al estudio molecular.

(Palabras clave: retraso mental, amplificación de tripletes repetidos, gen FMR1, síndrome Xq frágil).
Rev Chil Pediatr 77 (1); 34-42, 2006

1. Magíster en Ciencias Biológicas c/m en Genética. Unidad de Genética y Enfermedades Metabólicas. INTA, Universidad de Chile.
2. Médico genetista clínico. Servicio Genética Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
3. Bioquímico. Laboratorio de Biología Molecular. INTA, Universidad de Chile.
4. Citogenetista. Laboratorio de Citogenética INTA, Universidad de Chile.
5. Médico genetista clínico, Unidad de Genética y Enfermedades Metabólicas. INTA, Universidad de Chile.

Trabajo recibido el 12 de agosto de 2005, devuelto para corregir el 11 de octubre de 2005, segunda versión el 4 de noviembre de 2005, devuelto segunda versión para corregir el 7 de diciembre de 2005, tercera versión el 6 de enero de 2006.

Correspondencia a: MSc. M. Angélica Alliende R. Unidad de Genética y Enfermedades Metabólicas, INTA., Universidad de Chile. Macul 5540, casilla 138 Santiago 11. Santiago de Chile. E-mail: malliend@inta.cl

Clinical screening and FMR1 gene mutation analysis in male patients with Fragile X syndrome

Background: Fragile X syndrome (FXS) is the most prevalent cause of inherited mental retardation in males, with an incidence of 1/4 000 males and 1/8 000 females. 3 molecular alterations have been identified: permutation, full mutation and mosaics, where expanded CGG repeats in the 5' region surrounding FMR1 gene promoter. Individuals with permutation present between 52 and 200 repeats, whereas full mutations with more than 200 repeats show impaired gene transcription by hypermethylation of FMR1 gene promoter region and absence of FMRP protein, producing mental retardation and specific FXS clinical characteristics. Objective: The FXS clinical diagnosis is performed using a protocol that considers 15 characteristics; however, the phenotypical differences difficult the exact identification. Method: 99 male patients referred to INTA with mental retardation and clinical characteristics suggesting FXS were evaluated. Results: 23 cases present FMR1 full mutation with clinical score 16 to 27 points and 76 cases without mutation with clinical score 10 to 26 points. Comparing both groups, 4 clinical characteristics were significantly different and 3 of them were frequently associated with full mutation, independent of age. Conclusions: In order to optimize the molecular study of FMR1 gene, the selection of patients should include a clinical screening, so that the study is performed in individuals with clinical score ≥ 15 points.

(Key words: mental retardation, triplets amplification, fragile X syndrome).

Rev Chil Pediatr 77 (1); 34-42, 2006

INTRODUCCIÓN

El síndrome de X frágil (SXF) es la causa más frecuente de retraso mental (RM) familiar de origen monogénico, con una incidencia estimada de 1 en 4 000 hombres y 1 en 8 000 mujeres^{1,2}. Este síndrome se transmite como un rasgo dominante ligado al X con penetrancia incompleta (80% en hombres y 30% en mujeres) y es causado por una amplificación del repetido CGG, en la región no transcrita hacia 5' del promotor del gen FMR1 ubicado en el locus FRAXA del cromosoma X, en Xq27,3³.

El clonamiento del gen y el estudio de familias afectadas han permitido identificar la mutación en los individuos afectados con SXF, entender el modelo inusual de herencia y entregar las herramientas para la identificación de pacientes y portadores⁴.

Como parte del locus FRAXA existen amplificaciones inestables del trinucleótido (CGG) n localizadas en el primer exón del gen FMR1. El repetido CGG es polimórfico en la población general; presenta alelos de 6 a 54 CGG interrumpidos en la mayoría de los casos por 1 ó 2 secuencias AGG que le confieren un grado variable de estabilidad⁵.

En la población chilena se ha determinado que el alelo normal más frecuente es de 29 a 30 repetidos CGG⁶.

Las alteraciones hasta ahora descritas en este gen incluyen: a) premutaciones que involucran entre 55 y 200 repetidos CGG, presentan metilación normal del locus FRAXA y no son afectados por el retraso mental asociado al SXF; b) mutaciones completas que involucran más de 200 repetidos CGG y que se asocian a un fenotipo anormal y c) mosaicos que se presentan como mutación completa y premutación o bien mutación completa con metilación parcial en un mismo individuo.

Estas amplificaciones del triplete CGG aumentan de generación en generación de manera que una premutación en la madre puede transformarse en una mutación completa en su descendencia; la amplificación es mayor en generaciones sucesivas especialmente cuando el gen es transmitido desde la madre al hijo hombre^{7,8}.

Los individuos portadores de alelos pre-mutados (de 55 a 200 CGG) y metilación normal, en general no son afectados por el retraso mental, sin embargo, 20 a 25% de ellos tienen orejas prominentes, desórdenes

psiquiátricos y/o falla ovárica prematura en mujeres. Se ha informado recientemente un subgrupo de hombres y mujeres con premutación pueden desarrollar el síndrome de temblor y ataxia asociado a X frágil (FXTAS), después de los 50 años⁹.

Los pacientes con mutación completa presentan grandes expansiones del triplete CGG, entre 230 a más de 1 000 CGG, generalmente asociadas a hipermetilación del locus en la región promotora del gen FMR-1; sin embargo, en alrededor de 15% de los pacientes la mutación se presenta en mosaico, pudiendo ser del tipo premutación y mutación completa o también presentarse como una gran amplificación pero con metilación parcial del locus^{10,11}.

En general, las mutaciones completas coinciden con la metilación de la región promotora del gen FMR1 incluyendo el repetido CGG. Estas alteraciones producen el bloqueo de la transcripción del gen FMR1, ausencia de la proteína FMRP y el consiguiente efecto fenotípico de RM y dismorfias características de este síndrome¹². A partir de casos de mutación completa sin metilación, que expresan la proteína FMRP y que presentan desarrollo mental dentro de límites normales se ha podido establecer que el factor más importante en el origen de la enfermedad y sus manifestaciones fenotípicas es la metilación y no la expansión por sí misma y que el nivel de metilación de la región promotora del gen está directamente relacionado con la expresión de FMRP¹³⁻¹⁵.

Actualmente, los pacientes con SXF son diagnosticados clínicamente siguiendo el protocolo de tamizaje descrito por Buttler et al¹⁶. Este considera las siguientes características clínicas: retraso mental, historia familiar de retraso mental, facies alargada, orejas grandes, prognatismo, hiperactividad, déficit atencional, lenguaje repetitivo con historia familiar de retraso de lenguaje, hiperextensibilidad de las articulaciones metacarpofalángicas, surco simiano, aleteo de manos, morderse las manos, macrorquidismo y pobre contacto ocular. Otros autores han propuesto reducir a 6 los ítems considerados en el tamizaje clínico¹⁷. Sin embargo, en función de la gran variabilidad fenotípica de los pacientes con SXF, se estima que 65% de los casos especialmente en población pediátrica, no han sido diagnosticados incluso en centros especializados de genética de países desarrollados.

OBJETIVOS

Definir criterios clínicos específicos para población chilena que permitan identificar mejor a los individuos que deberían ser considerados al momento de aplicar los estudios diagnósticos confirmatorios del SXF. En este estudio presentamos las características clínicas más relevantes que difieren significativamente al comparar un grupo de pacientes chilenos con mutación completa en el gen FMR1 y pacientes con características clínicas sugerentes del síndrome de X frágil según el protocolo de Butler, normales para la mutación. En todos ellos se realizó análisis directo de las mutaciones en el gen FMR1.

PACIENTES Y MÉTODO

Muestra

La muestra incluye un total de 99 probandos hombres derivados al policlínico de Neurogenética del INTA desde diferentes centros del país para evaluación genética, por presentar retardo mental y características clínicas sugerentes del SXF; algunos de ellos con fundadas sospechas por presentar estudios citogenéticos previos. Todos ellos fueron re-evaluados clínicamente utilizando el protocolo de tamizaje descrito por Butler et al¹⁶. El puntaje se completó por antecedentes entregados por los padres y por el examen físico. Cada ítem recibió un puntaje de 2 si la característica estaba presente, 1 si había estado presente, o si era parcial o dudosa y 0 si nunca había estado presente. De esta forma el puntaje máximo a obtener si todas las características estuvieran presentes es de 30 puntos.

Análisis directo del gen FMR1 por southern blot

A todos los pacientes se les extrajo el ADN genómico a partir de una muestra de 5 ml de sangre y se aplicó el método de Southern blot para el análisis de amplificados CGG en el gen FMR1, según protocolos establecidos en el laboratorio de citogenética molecular del INTA¹⁸. Brevemente el método consiste en la doble digestión de 20 µg de ADN con las endonucleasas de restricción EcoR1 y EagI, esta última es sensible a la metilación es decir que no corta cuando el DNA está metilado. Posteriormente, el gel es sometido a electroforesis y transferencia a una

membrana de nylon Hybond N+ (Amersham). Las membranas son hibridadas con la sonda StB 12,3 proporcionada por JL Mandel (INSERM, Francia), marcada con ^{32}P dCTP y visualizadas por autoradiografía¹⁹⁻²¹. El cálculo del tamaño de los fragmentos detectados por la sonda es determinado mediante el programa DNA FRAG²² y expresado en kilo pares de bases (Kpb).

El número de repeticiones CGG se determina a partir de la diferencia de tamaño entre la banda normal y la banda con amplificación. Para el cálculo se considera como normal 30 repeticiones CGG, correspondiente al alelo más frecuente encontrado en población chilena⁶.

Análisis estadístico

Para el análisis comparativo de las características clínicas se aplicó el test de Fisher corregido por comparaciones múltiples²³. Se calculó la especificidad y sensibilidad de los diferentes puntos de corte obtenidos con el protocolo de tamizaje de Butler aplicado a pacientes chilenos²⁴, realizándose un análisis del área bajo la curva de ROC²⁵. Para el análisis de la relación entre el tamaño del triplete CGG [(CGG)n] y el puntaje clínico de los pacientes con mutación completa se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la distribución de pacientes con mutación completa (MC) e

hipermetilación del locus FRAXA, mosaicos y normales para la mutación, según rango de edad y puntaje clínico de los probandos estudiados. En resumen se encontró 76 pacientes normales y 23 con una mutación en el gen FMR-1.

La aplicación del protocolo de Butler¹⁶ como tamizaje clínico en este estudio confirmó ser un test efectivo también para pacientes chilenos; permitiendo discriminar entre pacientes mutados y no mutados. Al comparar ambos grupos se determinó que el protocolo de tamizaje utilizado es útil para la detección de pacientes con SXF según el análisis del área bajo la curva de ROC = 0,88 (IC 95%: 0,80-0,95). El examen visual de la curva ROC indica que para un punto de corte de 16 puntos la sensibilidad es 100% y la especificidad 44,7%; mientras que en un punto de corte de 17 puntos, sería 86,9% y 57,9% respectivamente; y para 12 puntos (señalados por la literatura como el punto de corte más indicado para la selección de pacientes con SXF), muestra una sensibilidad del 100% y especificidad de 5%.

En los casos de MC, el tamaño del fragmento observado en la autorradiografía varió entre 6,2 y 12 kpb lo que corresponde a una amplificación de 224 a 2 330 CGG repetidos (figura 1a). En el mosaico se observaron fragmentos de 7,1 y 6,6 Kpb, correspondientes a 747 y 293 triplete CGG para la MC y un fragmento de 2,9 Kpb correspondiente a una premutación de 113 repetidos CGG. (figura 1b). En el caso de metilación parcial se observan fragmentos de tamaño entre 6,2 y 7,2 Kpb correspondientes a una

Tabla 1. Distribución de pacientes mutados y no mutados según rango de edad y puntaje clínico

	Mutación completa n = 21	Mosaicos* n = 2	No mutados n = 76
Rango edad			
1 - 14 años	17	0	73
15 - 27 años	4	2	3
Promedio (años)	9,7 ± 5,8	24,5 ± 2,1	7,6 ± 4,0 ns
Tamizaje clínico (puntos)			
Rango	16 - 27	23 - 26	10 - 26
Promedio	21,9 ± 3,1	17	16,1 ± 3,5**

* Incluye mosaico mutación completa/premutación y mosaico mutación completa y metilación parcial.

** p < 0,0001

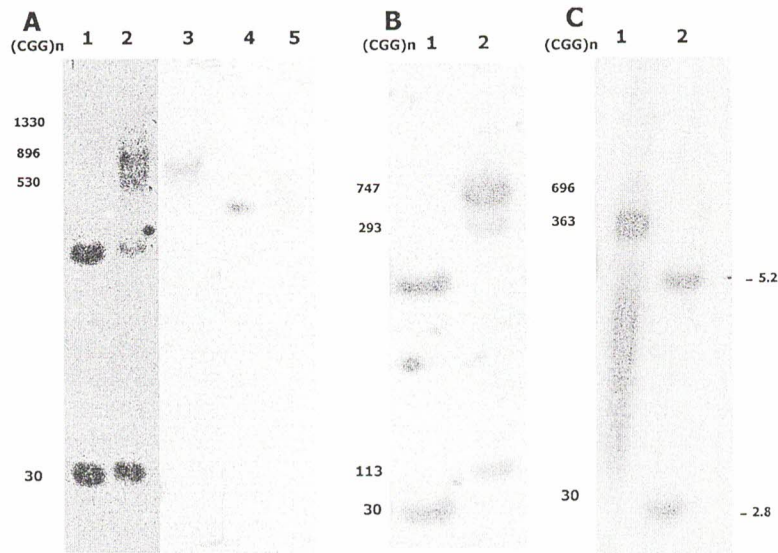


Figura 1. Autorradiografía de Southern blot e hibridación con la sonda StB 12,3 marcada con α -32P [dCTP].
1A) Carril 1: Mujer normal. Carriles 2, 3 y 4: Probando hombre con mutación completa.
1B) Carril 1: Mujer normal. Carril 2: Probando con mutación completa y premutación (mosaico).
1C) Carril 1: Probando con mutación completa y metilación parcial. Carril 2: Mujer normal.

Tabla 2. Análisis estadístico de las características clínicas en los 23 pacientes con Síndrome de X frágil que presentan la mutación (mutados) en relación a los 76 pacientes no afectados al análisis molecular (no mutados)

Características clínicas*	Mutados		No mutados		Valor p**
	n/n total	%	(n/n total)	%	
RDSM/RM	23/23	100	75/76	99	NS
Orejas grandes	22/23	93	57/76	75	0,44
Macroorquidismo	11/23	50	14/74	19	0,45
Prognatismo	16/23	72	17/76	22	0,01 #
Historia familiar de RM	19/23	85	24/76	32	0,01 #
Hiperactividad	17/23	74	64/76	84	NS
Historia familiar de retraso de lenguaje	16/23	72	17/74	23	0,01 #
Déficit atencional	23/23	100	69/76	91	NS
Hiperextensión articular	20/23	87	60/75	80	NS
Trastorno de lenguaje	22/23	98	72/74	97	NS
Aleteo de manos	15/23	67	44/76	58	NS
Fascie alargada	19/23	85	29/75	39	0,01 #
Surco simiano	4/23	17	16/75	21	NS
Se muerde las manos	8/23	37	34/76	45	NS
Pobre contacto ocular	13/23	57	40/75	53	NS

* Según el protocolo de tamizaje clínico descrito por Butler et al. 1991 (14)

** P-value Test de Fisher (NS valor p no significativo)

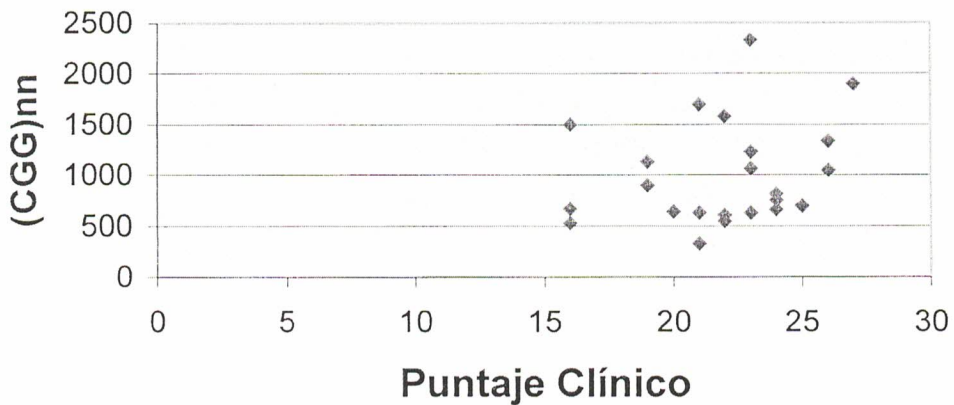


Figura 2. Análisis de la relación entre el tamaño del repetido CGG ((CGG)n) del gen FMR1 y el puntaje clínico de 23 pacientes con mutación.

amplificación de 363 a 696 repeticiones CGG con metilación del locus y fragmentos entre 2,8 y 5,2 kpb correspondientes a amplificación entre 30 y 830 repetidos CGG, no metilados (figura 1C).

En la tabla 2 se aprecian las 15 características clínicas determinadas en los pacientes mutados y no mutados. En el análisis comparativo de cada una de las características, 4 de ellas difieren significativamente entre los dos grupos; destacando 2 de ellas que tienen relación con la existencia de otros familiares afectados (tabla 2).

Al hacer la correlación entre el tamaño del triplete CGG [(CGG)n] y el puntaje clínico de los pacientes con mutación completa se observa una tendencia a relacionar un puntaje clínico alto con una mayor amplificación; sin embargo, esta relación no alcanza a ser significativa con un coeficiente de correlación no-paramétrico de Spearman $Rho = 0,26$ y valor $p = 0,23$ (figura 2).

DISCUSIÓN

En el SXF el diagnóstico molecular directo por Southern blot e hibridación con la sonda específica del gen FMR1 ha demostrado ser un método inequívoco para evaluar tanto el tamaño de la mutación como el estado de metilación del locus FRAXA y un método de alta sensibilidad y especificidad para descartar o confirmar la condición de afectado en pacientes en los que la clínica

así lo sugiere, especialmente en los casos de mosaico²⁶.

La literatura no es concluyente con respecto a la clínica de los casos de SXF en mosaico y/o metilación parcial, por un lado se ha mostrado que los individuos que presentan, en un porcentaje elevado de sus células, una mutación completa sin hipermetilación serían "altamente funcionales" con un mejor desarrollo cognitivo, sin embargo, recientemente se ha informado de retraso mental más grave en individuos con mutación completa en mosaico^{27,28}. En esta muestra de pacientes chilenos afectados con SXF se identificaron mutaciones completas, una mutación en mosaico y una mutación completa con metilación parcial del gen, similar a lo descrito para otras poblaciones²⁸. Al igual que en otros estudios estos dos casos presentan puntajes especialmente altos en el tamizaje clínico (tabla 1), lo que es concordante con lo descrito por la literatura más reciente y obliga su estudio a través del análisis directo del gen. Además ambas condiciones deben ser consideradas en el consejo genético que se entregue, especialmente a los casos de diagnóstico precoz²⁹.

Al igual que en otros estudios, el protocolo de tamizaje clínico descrito por Butler, mostró ser una herramienta útil para seleccionar mejor los pacientes con riesgo de presentar un SXF, independientemente de la edad. Los pacientes que no tenían la mutación presentaron en promedio un puntaje clínico significativamente menor que los pa-

cientes con mutación (16,1 vs 21,9). Además como se observa en la tabla 1 no se encontró diferencia significativa entre las edades de los dos grupos estudiados por lo que se podría decir que el menor puntaje detectado entre los no mutados no estaría influenciado por la edad³⁰.

La literatura sugiere que 12 puntos sería el punto de corte adecuado para la selección de pacientes con SXF, sin embargo, dado que en nuestro estudio en ningún paciente portador de la mutación se encontró un puntaje clínico menor de 16 puntos, que el punto de corte de 17 puntos tendría una sensibilidad de 86,9% y especificidad de 57,9%, quizás el punto de corte se podría aumentar a 16 puntos lo que circunscribiría aún más la población a evaluar molecularmente. Sin embargo, sugerimos que sería adecuado bajar el punto de corte a 15 puntos para no correr riesgo de subdiagnóstico.

Es importante equilibrar la importancia de la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de pacientes con SXF usando las herramientas que hemos descrito. En este sentido, creemos que es más importante obtener una herramienta clínica de alta sensibilidad, para predecir la posible presencia de la mutación, dado que es menos grave sospechar la presencia de mutación y encontrar un resultado normal en el estudio molecular que dejar sin estudio a un individuo con mutación completa. En este estudio, es importante destacar que no fue posible el cálculo de valores predictivos positivos dado que se tomó un número fijo de pacientes en los que había fundadas sospechas por estudios citogenéticos previos de que existía la mutación, y se comparó con pacientes con retardo mental, algunos de ellos con citogenética normal. Por ello, tampoco es posible calcular en este estudio la prevalencia de la mutación en la población de pacientes con retardo mental. Además, debido al límite poco preciso entre normalidad y enfermedad si se consideran sólo los parámetros clínicos actuales y estimando que existiría un 60% de los pacientes con SXF sub-diagnosticados, se ha establecido en el laboratorio del INTA la detección por PCR de mutaciones y premutaciones como método de tamizaje en niños con retraso mental de etiología no precisada, tal como ha sido sugerido para otras poblaciones^{31,32}.

Otros autores han descrito que características como macroorquidismo, frente pro-

minente y orejas grandes son más frecuentes en pacientes con SXF sólo en edades post puberales; sin embargo, pobre contacto ocular e historia familiar de RM son variables independientes de la edad del paciente³⁰. En la tabla 2 se muestran todas las características clínicas evaluadas de acuerdo al protocolo de tamizaje de Butler, tanto en los pacientes portadores de la mutación como en aquellos cuyo estudio molecular fue negativo.

De las 15 características clínicas consideradas, cuatro muestran diferencias significativas al comparar los dos grupos; éstas son: historia familiar de RM, historia familiar de retraso de lenguaje, prognatismo y facies alargada. De éstas, la última tendría relación con la edad de los individuos ya que se observa especialmente en individuos de mayor edad, sin embargo, las otras tres características: historia familiar de RM, historia familiar de retraso de lenguaje y prognatismo no se relacionan con la edad y son significativamente más frecuentes en el grupo de pacientes con mutación que en los individuos sin mutación. Estas tres características estarían entonces asociadas con mayor frecuencia a la mutación, independientemente de la edad de los pacientes. Es importante considerar que el antecedente de que existan otros individuos con RM o trastorno de lenguaje en la familia, confirma el hecho de que esta afección es habitualmente heredada y por lo tanto tiene un riesgo aumentado de recurrencia.

Además, el macroorquidismo tradicionalmente considerado como una de las características más relevantes al hacer el diagnóstico clínico de este síndrome, a la luz de los resultados moleculares y al estudiar un número mayor de casos, aparece relacionado sólo a pacientes en edad post puberal, tal como había sido descrito previamente^{17,30}.

En esta muestra se observa una tendencia a relacionar puntajes clínicos altos con repetidos CGG amplificados de tamaños más grandes (figura 2). Sin embargo, el análisis estadístico no muestra una correlación significativa entre ambas variables ($Rho = 0,26$, $p\text{ value} = 0,23$). Esta situación descrita en otro estudio³³ confirma nuevamente que el tamaño del repetido CGG *per se* no es un marcador predictivo de la evolución clínica del paciente; es más bien la presencia de otras variables del tipo manejo y estimulación precoz así como características genéticas

propias de cada individuo las que influirían en un mejor desarrollo de algunos pacientes afectados por el SXF²⁸.

Por otra parte, dado que estudios recientes muestran que pacientes con premutación, que habían sido considerados clínicamente normales, han desarrollado en la edad adulta un síndrome de temblor y ataxia que estaría directamente relacionado con el número de repetidos de su premutación³⁴⁻³⁶, se justifica el estudio molecular de todos los individuos que eventualmente podrían estar afectados con esta condición.

CONCLUSIONES

Considerando que el diagnóstico precoz de esta afección ayuda considerablemente al mejor manejo y evolución de los pacientes, pero también que el estudio molecular que define el diagnóstico es de alto costo y no está disponible en todos los servicios de salud del país, proponemos que el criterio de selección de pacientes incluya un tamizaje clínico y que en todos los casos de individuos con retardo mental con un puntaje ≥ 15 puntos se realice estudio molecular por PCR. Los pacientes que presenten PCR alterado, lo que significa que el gen FMR-1 es anormal, deberán ser refrendados por el estudio molecular directo, a través de Southern blot, del gen FMR-1, lo cual permitirá determinar con exactitud el número de repetidos y el status de metilación del locus.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. JL. Santos por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados; a la Corporación Síndrome X frágil - Chile, a los Drs. L. Troncoso y A. Barrios por la derivación de pacientes y apoyo permanente al desarrollo de este estudio y a la Dra. C. Mellado por la revisión crítica del manuscrito.

REFERENCIAS

- 1.- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H: Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196-7.
- 2.- Morton J, Bunday S, Webb T, Macdonald F,

- Rindl PM, Bullock S: Fragile X syndrome is less common than previously estimated. *J Med Genet* 1997; 34: 1-5.
- 3.- Oberlé I, Rosseau F, Heitz D, et al: Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
- 4.- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al: Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-14.
- 5.- Yu S, Pritchard E, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E: Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252: 1179-81.
- 6.- Jara L, Aspillaga M, Avendaño I, Obreque V, Blanco R, Valenzuela CY: Distribution of (CGG)_n and FMR-1 Associated Microsatellites Alleles in a Normal Chilean Population. *Am J Med Genet* 1998; 75: 277-82.
- 7.- Murray J, Cuckle H, Taylor G, Hewison J: Screening for fragile X syndrome: information needs for health planners. *J Med Screening* 1997; 4: 60-94.
- 8.- Rosseau F, Heitz D, Biancalana V, et al: Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673-81.
- 9.- Hagerman RJ, Leavitt BR, Farzin F, et al: Fragile-X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) in Females with the FMR1 Premutation. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1051-6.
- 10.- Nolin SL, Brown WT, Glicksman GE, et al: Expansion of the fragile x CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 454-64.
- 11.- Mingroni-Netto R, Haddad L, Vianna-Morgante A: The number of repeats of the FMR1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism *Am J Med Genet* 1996; 64: 270-3.
- 12.- Eberhart D, Malter H, Feng Y, Warren S: The fragile X mental retardation protein is a ribonucleo-protein containing nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1083-91.
- 13.- Mc Conkie-Rosell A, Lachiewicz AM, Spiridigliozzi GA, et al: Evidence that methylation of FMR1 locus is responsable for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 800-9.
- 14.- Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, et al: High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. *Am J Med*

- Genet 1994; 51: 298-308.
- 15.- Tassone F, Hagerman R, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ: Elevated levels of FMR1 messenger RNA in carriers males: a new mechanism of involvement in the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 6-15.
 - 16.- Butler M, Mangrum T, Gupta R, Singh D: A 15 item check-list for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. *Clin Genet* 1991; 39: 347-54.
 - 17.- Giangreco CA, Steele MW, Aston CE, Cummins JH, Wenger SL: A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J Pediatr* 1996; 129: 611-4.
 - 18.- Alliende MA, Urzúa B, Valiente A, Curotto B, Cortés F, Rojas C: Análisis molecular directo de mutaciones en el gen FMR-1 en pacientes con síndrome Xq frágil y sus familias. *Rev Méd Chile* 1998; 126: 1435-46.
 - 19.- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Oberlé I, Mandel JL: On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1992; 43: 197-207.
 - 20.- Feinberg A, Vogelstein B: A technique for radio labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
 - 21.- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - 22.- Schaffer H, Sederoff R: Least squares fit of DNA fragment length to gel mobility. *Anal Biochem* 1981; 115: 113-22.
 - 23.- Bland JM, Altman DG: Multiple significance tests: the Bonferroni method *BMJ* 1995; 310: 170.
 - 24.- Altman DG, Bland JM: Diagnostic test 3: sensitivity and specificity. 1994; 308: 1552.
 - 25.- Altman DG, Bland JM: Diagnostic test 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 1994; 309: 188.
 - 26.- Bardoní B, Mandel JL, Fisch G: FMR1 gene and fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 97: 153-63.
 - 27.- Wöhrle D, Salat U, Gläser D, et al: Unusual mutations in high functioning fragile X males: apparent instability of expanded unmethylated CGG repeats. *J Med Genet* 1998; 35: 103-11.
 - 28.- Mandel JL, Biacalana V: Fragile mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Hormone & IGF Research* 2004; 14: 158-65.
 - 29.- Murray J, Cuckle H, Taylor G, Hewison J: Screening for fragile X syndrome: information needs for health planners. *J Med Screening* 1997; 4: 60-94.
 - 30.- Boy R, Santana P, Clinton J, Machado-Ferreira MC, Mattos M: Estudo caso-controle envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2001; 59: 1-12.
 - 31.- Condorelli DF, Milana G, Dell'Albani P, et al: Routine Clinical application of the FRAXA Pfu PCR assay: limits and utility. *Clin Genet* 1996; 50: 366-71.
 - 32.- Gerard B, Le Heuzey MF, Brunie G, et al: Systematic screening for fragile X syndrome in a cohort of 574 mentally retarded children. *Ann Genet* 1997; 40: 139-40.
 - 33.- Steyaert J, Borghgraef M, Legius E, Fryns JP: Molecular-intelligence correlations in young fragile X males with a mild CGG repeat expansion in the FMR1 gene. *Am J Med Genet* 1996; 64: 274-7.
 - 34.- Rogers C, Partington MW, Turner GM: Tremor, ataxia and dementia in older men may indicate a carrier of a fragile X syndrome. *Clin Genet* 2003; 64: 54-6.
 - 35.- Hagerman PJ, Hagerman RJ: Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004; 10: 25-30.
 - 36.- Hagerman PJ, Greco CM, Hagerman RJ: A cerebellar tremor/ataxia syndrome among Fragile X permutations carriers. *Cytogenet Genome Res* 2003; 100: 206-12.