

**SINDROME X FRAGIL: Genética,
Fisiopatología y Diagnóstico.**

**M^a Isabel TEJADA
Dra. en Biología Humana
Genetista
UNIDAD DE GENETICA
HOSPITAL DE BASURTO
BILBAO**

INTRODUCCION

Cuando, en el año 80, recibí una beca del Gobierno francés para hacer una Tesis Doctoral en Biología Humana, el que fuera mi jefe y director de la Tesis, el Profesor André Boué, puso unos papeles encima de mi mesa pidiéndome que los estudiara porque ése iba a ser el tema de mi Tesis. Era la primera vez que leía algo sobre el Síndrome X Frágil (SXF).

Han pasado más de 20 años y todavía actualmente mucha gente desconoce este Síndrome. Sin embargo, **el SXF es la causa más común de Retraso Mental (RM) hereditario y una de las enfermedades genéticas más frecuentes**. Su detección precoz es por ello muy necesaria, no sólo para el propio paciente, sino también para prevenir la aparición de más casos en una misma familia. Como se puede ver, he empezado hace 20 años y lo he hecho, porque quiero presentar esta ponencia desde un punto de vista histórico, para ver como ha ido evolucionando el tema a lo largo de los años y darnos cuenta de los grandes logros obtenidos.

1.- El Retraso Mental y sus causas.

En atención primaria, el pediatra está acostumbrado a ver niños con RM, porque, aproximadamente, **el 3% de los niños lo presentan** (1) y, en general, un total del 10% tiene dificultades en su aprendizaje. Entre las causas que originan RM se encuentran las genéticas, las infecciosas, las ambientales y las traumáticas. En realidad, se considera que existe RM cuando el Coeficiente de Inteligencia (CI) es menor o igual que 70 y por ello, el diagnóstico del RM requiere realizar este Test, que, por otra parte, no siempre es fácil en niños pequeños. Pues bien, con el CI realizado, sólo el 0.3-0.4% de todos los niños presentan un RM de moderado a profundo y, en estos, las causas genéticas se encuentran en más del 50% de los casos. Sin embargo, entre el 0.9-2.7% de los niños con RM ligero y/o moderado, no se puede identificar una causa genética más que en el 13% de los casos. Entre estos se encuentran la mayoría de los casos con SXF (2).

Ya desde los primeros estudios realizados en personas con RM, se observó que había un exceso de varones, lo que hacía pensar en **genes ligados al cromosoma X** responsables de esta entidad (3). La identificación del Síndrome X Frágil en el año 1977 (4) supuso la primera comprobación de esta teoría. Hoy día, los recientes avances en el desciframiento del Genoma Humano y el estudio de ligamiento de numerosas familias que presentan RM ligado al X por el árbol familiar, han demostrado la presencia de más de 200 genes en el cromosoma X causantes de RM, entre los cuales, 33 de ellos han sido ya identificados (5).

2.- Clínica del SXF.

No vamos a entrar en este tema por corresponder a la anterior ponencia, pero sí creo importante remarcar en este foro que **la clínica clásica del SXF**, descrita ya en 1943 por Martin y Bell (6) y que asocia básicamente el RM en varones con la cara alargada, las

orejas grandes y despegadas y el macroorquidismo o aumento del tamaño testicular, **es la clínica del varón postpuberal** Pero en el niño por debajo de 14 años, las manifestaciones clínicas están muy atenuadas, no pudiéndose diagnosticar clínicamente por el fenotipo y mucho menos al nacimiento. El Pediatra deberá fijarse por lo tanto en que **existe siempre un RM orgánico**, de leve a moderado (muy raras veces severo), con un cierto retraso en las adquisiciones (sedestación hacia los 9 meses, deambulación hacia los 18 meses, lenguaje hacia los dos años y medio o tres, muy pobre y repetitivo) y sobre todo, **con una hiperactividad que podríamos decir es el signo más constante**. Por último, no hay que olvidar además, que **el SXF puede manifestarse también en las niñas y mujeres**, pero con una gran variabilidad. Son raros pero existen, los casos con fenotipo semejantes a los niños (7), pero lo más frecuente es que no haya ningún rasgo físico característico, manifestando sólo un RM ligero, con trastornos de conducta (aislamiento, angustia social, timidez) y problemas sobre todo en el lenguaje y en el área de las matemáticas.

3.- La Citogenética o el estudio del cariotipo en el SXF.

Los estudios citogenéticos en el SXF tienen su origen en el hallazgo que hizo Lubs en 1969, quien observó en una familia que los chicos con RM presentaban una posible alteración citogenética, que él llamó un " **cromosoma marcador**" (8). No fue hasta casi 10 años más tarde cuando, los estudios de Sutherland sobre los "**sitios frágiles**" de los cromosomas, demostraron que el sitio frágil situado en la banda q27.3 del cromosoma X, sólo se obtenía en chicos con un RM semejante al descrito por Martín y Bell y por Lubs y que además, **este sitio frágil no se observaba en el cariotipo convencional**, sino empleando cultivos de linfocitos en medios deficientes en ácido fólico (4). La asociación del Síndrome previamente descrito por Martín y Bell, con esa especie de "fragilidad" en el cromosoma X, dio el nombre al Síndrome X Frágil. Esta asociación supuso además la primera e importante herramienta para el diagnóstico del mismo y todos los laboratorios de citogenética del mundo se lanzaron a la búsqueda de familias transmisoras del SXF.

El estudio del cariotipo (no el convencional insisto, sino el especial en medios pobres de ácido fólico como ya hemos visto) fue el método de diagnóstico del Síndrome X Frágil entre los años 80 y 90 hasta que, en el año 91 se descubre el gen responsable del Síndrome. En esa década, los análisis pusieron de manifiesto:

- Una gran dificultad técnica con la imposibilidad de superar el 50% de células con la fragilidad.
- La laboriosidad y coste del cariotipo por la necesidad de tener que contar hasta unas 100 mitosis en muchos casos.
- La dificultad de la interpretación de los porcentajes entre el 1 y el 5%, sabiendo que por lo tanto, se debían estar dando falsos positivos y negativos.
- La imposibilidad de poner de manifiesto la fragilidad en mujeres que eran portadoras obligatorias por tener hijos con el Síndrome.
- En fin, la imposibilidad por todo ello de poder ofertar Diagnósticos Prenatales fiables.

Hoy día, **el estudio del cariotipo para el SXF está en desuso y es desaconsejable**. Desde hace diez años, hemos pasado al nivel molecular.

LA ALTERACION MOLECULAR EN EL SXF: SU TRANSMISION.

1.- El gen FMR1.

En 1991, tres grupos simultáneamente (9,10,11) describen el defecto molecular que origina el SXF: Se trata de una alteración en **el gen FMR1**, situado en el locus FRAXA, en la parte distal del brazo largo del cromosoma X. Este gen codifica en individuos normales **una proteína, llamada FMRP** que en cambio, se encuentra ausente o muy disminuida en los individuos afectados. Esto es debido a esa alteración molecular, que consiste en **la expansión anómala de un triplete CGG**, acompañada de una hipermetilación de una isla CpG adyacente al gen FMR-1, lo que a su vez produce **la inactivación del gen** y por lo tanto **la falta de síntesis de la proteína**.

El mecanismo mutacional del SXF supuso, en el inicio de la década de los 90, un gran descubrimiento, ya que fue la primera -de toda una serie de enfermedades genéticas que hoy día ya conocemos- en la que se observó la inestabilidad de tripletes. Pero esto que nos puede parecer tan complejo, explicó sin embargo la mayoría de las lagunas que se tenían sobre su modo de transmisión.

2.- Su herencia.

Inicialmente se consideraba que el SXF era una enfermedad recesiva ligada al X, o sea con varones afectos y mujeres transmisoras. Sin embargo, pronto se observaron árboles familiares en los que parecía que había hombres transmisores, así como mujeres que padecían en mayor o menor grado la enfermedad. Pues bien, esto es debido a que la expansión anómala del triplete CGG se desarrolla en dos etapas: Una primera que se denomina "**Premutación**", en la que tanto mujeres como hombres son transmisores con inteligencia normal, y una segunda denominada "**Mutación completa**", en la que todos los varones presentan RM, y aproximadamente un 59% de las mujeres (12). Por ello, hoy día se considera al SXF como **una enfermedad dominante con penetrancia incompleta**.

Vamos a explicar esto con mas detalle: ya de entrada, el número de repeticiones del triplete CGG es polimórfico, es decir no siempre es el mismo en todos los individuos de la población general, pudiéndose hacer tres grupos de individuos:

- En **las personas normales**, ese número se encuentra dentro de ciertos límites, **entre 6 y unas 50-60 repeticiones**, entre los cuales el gen se comporta normalmente y expresa proteína.
- Cuando el número de repeticiones se sitúa **entre 50-60 y unas 200**, la isla CpG adyacente no se altera todavía, por lo que se sigue transcribiendo la proteína y el individuo no manifiesta alteraciones fenotípicas. Sin embargo, ese número de repeticiones adquiere una gran inestabilidad tanto a nivel meiótico como mitótico, de forma que, cada vez que las células se dividen, el número de repeticiones CGG va aumentando. Este es el caso de los "premutados/as" o portadores que, siendo sanos por producir proteína, tienen en cambio riesgo de tener descendencia con el Síndrome. Pero **hay una gran diferencia entre los hombres premutados (o varones transmisores) y las mujeres premutadas**: los hombres, al tener un sólo cromosoma X no presentan casi inestabilidad meiótica por lo que todas sus hijas serán también portadoras premutadas y por lo tanto sanas, pero éstas, por tener dos

cromosomas X que se aparean en meiosis, el X con la premutación sufre una gran inestabilidad y pasa a su descendencia un número de repeticiones del triplete CGG muy superior, pudiendo tener hijos/as que manifiesten el Síndrome.

- **A partir de las 200 repeticiones**, el gen pasa al estado de **mutación completa**, sin producir proteína y con las características fenotípicas, tal como se ha explicado en el primer párrafo de este apartado.

No podemos dejar de decir que, como en cualquier gen, también existen en el gen FMR1 mutaciones puntuales y deleciones, que producen asimismo la ausencia de proteína o una proteína anómala, y por lo tanto el Síndrome. Pero esto sucede sólo en un 5% de los casos. **En el 90-95% de los casos de SXF, la causa ha sido la amplificación anómala del triplete CGG.**

3.- La fisiopatología del SXF.

¿Qué función tiene esa proteína para que su ausencia produzca tan importantes manifestaciones clínicas? Pues bien, la FMRP es una proteína ubicuitaria, que se expresa en diferentes tejidos, y, dentro de la célula, se localiza sobre todo en su citoplasma. Su función es el transporte del ARN y de otras proteínas desde el núcleo de la célula al citoplasma.(13). De ahí que su ausencia logrará que otras proteínas no lleguen a actuar en su sitio adecuado por lo que, aunque el gen mutado es uno sólo, las manifestaciones fenotípicas son diversas, variadas y heterogéneas.

Por último, sólo nos queda añadir en este apartado cómo explicamos el que haya mujeres con la mutación completa que estén afectadas, cuando, además del gen mutado, tienen un cromosoma X normal que expresa proteína. Pues bien ello se debe a que, en la mujer, de los dos cromosomas X tan sólo uno de ellos está activo y por lo tanto funcionando, y el otro se inactiva, inactivación que se produce al azar. Dependiendo por lo tanto de cual sea el cromosoma X que quede inactivo en los tejidos diana (por ejemplo en el cerebro) la afectación será mayor o menor.

DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL SXF.

En la Unidad de Genética del Hospital de Basurto, tuvimos la oportunidad de conseguir la sonda para el estudio del locus FRAXA nada más se descubrió el gen (9) y, desde finales de 1991 hasta la actualidad, se chequea rutinariamente la mutación del triplete CGG en todos los varones con RM no filiado que llegan a nuestro laboratorio. Gracias inicialmente a diversas subvenciones de investigación (FIS, Gobierno Vasco) recibimos la mayoría de las peticiones para estudio molecular del SXF que se generan en el Norte de España (**Asturias, Cantabria, La Rioja, Navarra y el País Vasco**), y hemos podido abordar además el estudio sistemático del Retraso Mental no filiado en dos asociaciones de discapacitados mentales: GORABIDE en Bizkaia y ULIAZPI en Guipúzcoa.

Al inicio, la única técnica molecular diagnóstica utilizada, era el estudio directo de la región del gen en donde se encuentra el triplete CGG por medio de la extracción del ADN seguida de una digestión del mismo, **Southern Blot, hibridación** con la sonda StB12.3 cedida por el Prof. Mandel (14) y detección por métodos quimioluminiscentes. El análisis de Southern consigue estudiar a la vez el tamaño de la expansión (CGG)_n y

el estado de metilación de la isla CpG adyacente al gen FMR1, permitiendo caracterizar todas las clases de individuos relacionados con el síndrome que se han visto en el anterior apartado (12,15). Esta técnica sigue siendo hoy en día la más precisa y exacta, y es de obligada aplicación para verificar los posibles casos positivos de SXF así como sus familiares y para el Consejo Genético y el Diagnóstico Prenatal.

Pero el estudio por Southern es largo, costoso y laborioso, así que para la rutina diagnóstica había que buscar otros métodos. Gracias nuevamente a subvenciones de investigación del FIS y del Gobierno Vasco, estudiamos la puesta a punto de técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (16), que son mucho más rápidas y sencillas. Fruto de estas investigaciones se leyó una Tesis Doctoral, cuyo resumen ha sido recientemente publicado (17).

Básicamente, **nuestro Protocolo de trabajo** consta de tres partes o etapas con diferentes indicaciones:

- **La 1ª técnica o de screening** es una PCR que se utiliza sólo en varones y cuyo producto amplificado lo visualizamos directamente en un transiluminador. Tiene la característica de que sólo amplifica bien en los individuos que no tienen la expansión del SXF. En una palabra, descartamos rápidamente el SXF debido a la expansión anómala del triplete CGG. **Sus indicaciones son por lo tanto: a) niños con RM no filiado (insisto, niños con CI<70) y b) varones postpuberales que además tengan el fenotipo del Síndrome asociado.**
- **La 2ª técnica, también por PCR, la llamamos de cuantificación**, porque con ella obtenemos información sobre el número exacto de repeticiones de un individuo. Es algo más compleja que la anterior porque se hace correr el producto amplificado en un gel de poliacrilamida, pero es **la técnica de elección en el diagnóstico de mujeres** porque discrimina bien los dos cromosomas X (salvo en el caso de homocigosis). Además, tiene una gran importancia para el consejo genético de **las portadoras premutadas**, ya que existe una relación directa entre el número de repeticiones y la probabilidad de que se produzca el paso de premutación a mutación completa en la siguiente generación y por lo tanto la probabilidad de tener hijos afectos. Pero es importante remarcar también, que debido a su laboriosidad y a la menor incidencia de niñas con el SXF, **no se puede ofrecer indiscriminadamente a cualquier niña con RM no filiado, sino que se necesita siempre la sospecha clínica del SXF.**
- **La 3ª técnica es finalmente la del Southern**, que se aplica directamente a las Familias transmisoras del SXF, en el Diagnóstico Prenatal y a todos los casos dudosos de las dos técnicas anteriores.

NUESTROS RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

He empezado esta ponencia diciendo que el SXF es la causa más común de RM hereditario y una de las enfermedades genéticas más frecuentes. Lógicamente, deberíamos ilustrar ahora esta afirmación con nuestros propios datos.

La **Tabla 1** muestra nuestros hallazgos en estos 10 años, desde mediados del 91 hasta el 30 de junio de 2001, y la **Tabla 2** muestra la clasificación de todos los individuos estudiados en las familias X Frágil. Vemos por lo tanto que llevamos estudiadas **72 Familias y, en ellas, 570 individuos**, lo que nos da una media de casi 8 familiares estudiados por familia.

Uno de los datos más importantes a añadir en este foro de Peditras y que no aparece en esas tablas, es **la media de edad de detección de los casos índice (C.I.) con SXF, porque es nada menos que 16,34 años**. Esto quiere decir que la mayoría de estas familias se han detectado por los adultos con RM, bien en los estudios que hemos realizado en las Instituciones para discapacitados, bien en la Consulta de Consejo Genético cuando las hermanas se asesoran para sus futuros embarazos, etc., **pero en menor proporción (20/72) en las consultas de Pediatría**. Pero al observar la **Tabla 2**, vemos que hay más de 2 individuos con la mutación completa por familia (160/72), lo que quiere decir que, si hubiéramos diagnosticado esos C.I. antes, hubiéramos podido prevenir la aparición de más casos familiares.

Pero además, la Consulta de Pediatría va a tomar cada vez más, un papel protagonista en la detección del SXF: Si nos fijamos en la **Tabla 1** en los porcentajes de detección a lo largo de los años, vemos que, con oscilaciones debidas a nuestros estudios en Instituciones, actualmente en los dos últimos años, cada vez tenemos más demanda de este diagnóstico, pero a su vez, **baja bruscamente el porcentaje de detección**, incluso este año llevamos sólo el 1,86%. Esto podría ser debido a que estemos casi "tocando techo" en el diagnóstico, es decir, con la mayoría de las familias ya estudiadas y que por lo tanto **sólo nos quedarán siempre los casos nuevos, que lo ideal es que se detecten precozmente en la Consulta de Pediatría**. Sin embargo, los datos de Prevalencia no corroboran el que estemos en el límite del número de diagnósticos.

Obviamente no se ha realizado en nuestra zona un estudio de Prevalencia, ni la podemos estimar, porque incluso en las 5 Comunidades Autónomas que estudiamos hemos tenido grandes diferencias de cobertura; pero universalmente se acepta desde hace unos años que el SXF afecta a 1 sobre 4000 o 5000 varones (18). Un excelente estudio realizado en Valencia (19) estima **la prevalencia en España entre 1/5000 y 1/6800 varones**. Según esto, sobre unos dos millones de varones que existen en las 5 Comunidades del Norte de España, debería haber unos 300 con el SXF y sin embargo, **llevamos estudiados 86 (Tabla 2) , o sea la tercera parte**. No hay duda que por lo tanto nos queda todavía un largo camino por recorrer, en el que, **el papel de los Peditras es esencial para el pronto diagnóstico, la mejora de estos niños y la Prevención**.

BIBLIOGRAFIA.

1. Penrose LS. *The Biology of Mental Defect*. Revised Edition. New York. Grune and Stratton Ed. 1963.
2. Tejada MI. *Expression du site fragile du chromosome X dans différents systèmes cellulaires*. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle. Université René Descartes. Paris V. 1983.
3. Turner G and Turner B. *X-linked mental retardation*. J Med Genet 11, 103-113. 1974.
4. Southerland GR. *Marker X chromosomes and mental retardation*. N Engl J Med 296, 1415. 1977.
5. Chiurazzi P, Hamel BCJ and Neri G. *XLMR genes: update 2000*. Eur J Hum Genet 9, 71-81. 2001.
6. Martin JP and Bell J. *A pedigree of mental defect showing sex-linkage*. J Neurol Psychiatr 6, 154-157. 1943.

7. Tejada MI, Fernández-Rivas A, Durán M, et al. *Hallazgo atípico del Síndrome del X frágil en una familia con caso índice niña y ningún varón con retraso mental*. Revista de Psiquiatría Infanto-Juvenil 2, 127-130. 1998.
8. Lubs HA. *A marker X chromosome*. Am J Hum Genet 21, 231-244. 1969.
9. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, et al. *Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in Fragile X syndrome*. Science 252, 1097-102. 1991.
10. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. *Identification of a Gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a Breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome*. Cell 65, 906-914. 1991.
11. Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. *Fragile X syndrome characterized by an unstable region of DNA*. Science 252, 1179-1181. 1991.
12. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, et al. *A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the Fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: The first 2.253 cases*. Am J Hum Genet 55, 225-237. 1994.
13. Khandjian EW. *Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein*. Biochem Cell Biol, 77, 331-342. 1999.
14. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, et al. *Direct diagnosis by DNA analysis of the Fragile X syndrome of mental retardation*. N Engl J Med 325, 1673-81. 1991.
15. Tejada MI, Mornet E, Biancalana V, et al. *Direct DNA analysis of Fragile X Syndrome in Spanish pedigrees*. Am J Med Genet 43, 282-290. 1992.
16. Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A, et al. *Rapid Fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test*. JAMA 270, 1569-75. 1993.
17. Durán M, Molina M, Fernández Toral J, et al. *Diagnóstico molecular por reacción en cadena de la polimerasa del Síndrome X frágil: Aplicación de un Protocolo diagnóstico en 50 familias del Norte de España*. An Esp Pediatr 54, 331-339. 2001.
18. Turner G, Webb T, Wake S, et al. *Prevalence of the Fragile X Syndrome*. Am J Med Genet 64, 196-197. 1996.
19. Millán JM, Martínez F, Cadroy A, et al. *Screening for FMR1 mutations among the mentally retarded: prevalence of the Fragile X Syndrome in Spain*. Clinical Genetics 56, 98-99. 1999.

TABLAS.

TABLA 1: Distribución por años del número de casos índices estudiados y del número de Familias X Frágil encontradas.

<u>AÑOS</u>	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	TO TAL
Nº de C.I. sin expansión	4	14	54	90	84	79	58	46	48	73	105	655
Nº de C.I. con SXF(Familias)	11	4	9	9	11	3	6	4	8	5	2	72
Nº TOTAL DE C.I. estudiados	15	18	63	99	95	82	64	50	56	78	107	727
% de SXF sobre el TOTAL	73.3	22.2	14.2	9	11.5	3.6	9.3	8	14.2	6.4	1.86	9.9

TABLA 2: Clasificación de los 570 individuos estudiados de las 72 familias transmisoras del SXF en función de la expansión del triplete CGG.

	FM	PM	Mos	Total portadores	Familiares Normales	TOTA L	
Varones	86	15	19		120	119	239
Mujeres	74	115	6		195	136	331
TOTAL	160	130	25		315	255	570