



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIO COMPARADO DE LA PREVALENCIA DE PRE-MUTACIONES Y MUTACIONES COMPLETAS EN PACIENTES REFERIDOS POR ESTUDIOS DEL SÍNDROME DE X-FRÁGIL Y EN LA POBLACIÓN GENERAL

Andrea Rodríguez Christiansen

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2021-22

ESTUDIO COMPARADO DE LA PREVALENCIA DE PRE-MUTACIONES Y MUTACIONES COMPLETAS EN PACIENTES REFERIDOS POR ESTUDIOS DEL SÍNDROME DE X-FRÁGIL Y EN LA POBLACIÓN GENERAL

Andrea Rodríguez Christiansen

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2021-22

Palabras clave del trabajo:

Síndrome de X frágil, FMR1, FMRP, FOP, FXTAS, discapacidad intelectual, prevalencia, cribado prenatal

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Laura Torres Juan

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RESUMEN

El Síndrome de X frágil (SXF) es el trastorno hereditario ligado al cromosoma X más común que causa retraso mental. Además, se ha relacionado con el retraso psicomotor (RPM), trastorno del espectro autista (TEA), trastorno de hiperactividad (TDH), insuficiencia ovárica primaria/ fallo ovárico precoz (POI/FOP), síndrome de temblor y ataxia asociado al X frágil (FXTAS), entre otras complicaciones médicas. La mutación que causa este trastorno es la expansión del trinucleótido CGG en el extremo 5' del gen *FMR1*. Según el número de repeticiones se distinguen cuatro formas: la más común contiene entre 6 y 45 repeticiones, la zona gris entre 45 y 54 repeticiones, la premutación entre 55 y 200 repeticiones, y por último la mutación completa que contiene más de 200 repeticiones. Este estudio se basa en comparar la prevalencia de premutaciones y mutaciones completas en 3.742 individuos de la población general y en 2.036 pacientes con diferentes trastornos asociados al SXF. Los resultados ponen de manifiesto que hay una prevalencia mayor de la esperada de personas con la premutación en la población general. Además, al analizar si el motivo por el cual a los pacientes se les realizó la prueba de X frágil está asociado al tipo de alelo, se observó que los trastornos de RPM, TDH y DI presentan el mayor porcentaje de personas con mutaciones completas en el gen *FMR1*; y el TEA únicamente si está asociado a uno de estos tres trastornos. Por otro lado, sorprende que un gran porcentaje de mujeres con FOP presentan el alelo intermedio y ninguna la premutación. También se ha visto que hay diferencias significativas que relacionan el sexo con el tipo de alelo. Con toda esta información y debido a la elevada incidencia de premutaciones en la población general, se plantea si la implantación de un programa de cribado prenatal a las mujeres embarazadas sería favorable en el SXF.

ABSTRACT

Fragile X syndrome (FXS) is the most common X-linked inherited mental retardation disorder. It has also been linked to psychomotor retardation (PMR), autism spectrum disorder (ASD), hyperactivity disorder (HD), primary ovarian insufficiency/premature ovarian failure (POI/POF), fragile X-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS), and other medical complications. The CGG trinucleotide expansion at the 5' end of the *FMR1* gene is the mutation responsible for this illness.

The number of repetitions distinguishes four forms: the most common contains between 6 and 45 repetitions, the grey zone has 45 to 54 repetitions, the premutation has 55 to 200 repetitions, and the complete mutation has more than 200 repetitions. This study compared the prevalence of premutations and full mutations in 3.742 people from the general population and 2.036 patients with different FXS-related disorders. The findings show that the prevalence of people with the premutation in the general population is higher than expected. Furthermore, when analyzing whether the reason for which the patients underwent the Fragile X test is related to the type of allele, it was discovered that PMR, HD and Intellectual disorder (ID) have the highest percentage of people with complete mutations in the *FMR1* gene; and ASD only if it is associated with one of these three disorders. On the other hand, surprisingly, a large percentage of women with FOP have the intermediate allele and none have the premutation. It has also been discovered that there are significant differences between sexes in terms of the type of allele. With all this information and given the high prevalence of premutations in the general population, it is being considered whether the implementing of a prenatal screening program for pregnant women would be beneficial in FXS.

RESUM

La Síndrome de X fràgil (SXF) és el trastorn hereditari lligat al cromosoma X més comú que causa retard mental. A més, s'ha relacionat amb el retard psicomotor (RPM), trastorn de l'espectre autista (TEA), trastorn d'hiperactivitat (TDH), insuficiència ovàrica primària/fallida ovàrica precoç (POI/FOP), síndrome de tremolor i atàxia associada al X fràgil (FXTAS), entre altres complicacions mèdiques. La mutació que causa aquest trastorn és l'expansió del trinucleòtid CGG a l'extrem 5' del gen *FMR1*. Segons el nombre de repeticions es distingeixen quatre formes: la més comuna conté entre 6 i 45 repeticions, la zona grisa entre 45 i 54 repeticions, la premutació entre 55 i 200 repeticions, i finalment la mutació completa que conté més de 200 repeticions. Aquest estudi es basa en comparar la prevalença de premutacions i mutacions completes en 3.742 individus de la població general i en 2.036 pacients amb diferents trastorns associats al SXF. Els resultats posen de manifest que hi ha una prevalença major de l'esperada de persones amb la premutació a la població general. A més, en analitzar si el motiu pel qual als pacients se'ls va realitzar la prova de X fràgil està associat al tipus d'al·lel, es va observar que els trastorns de RPM, TDH i DI presenten el major percentatge de persones amb mutacions completes al gen *FMR1*; i el TEA només si està associat a un d'aquests tres trastorns. D'altra banda, sorprèn que un gran percentatge de dones amb FOP presenten l'al·lel intermedi i cap la premutació. També s'ha vist que hi ha diferències significatives que relacionen el sexe amb el tipus d'al·lel. Amb tota aquesta informació i l'elevada incidència de premutacions a la població general, es planteja si la implantació d'un programa de cribratge prenatal a les dones embarassades seria favorable a l'SXF.

ÍNDICE

Introducción.....	7
Características generales del trastorno.....	7
Antecedentes.....	9
Gen FMR1.....	9
Proteína FMRP.....	11
Trastornos asociados.....	13
Diagnóstico.....	13
Evolución de las pruebas diagnósticas.....	13
Diagnóstico prenatal.....	15
Condiciones para realizar el test genético.....	16
Objetivos e hipótesis del estudio.....	17
Material y métodos.....	17
Procesamiento de muestras.....	17
Determinación del número de repeticiones del triple CGG en el gen FMR1.....	18
Cálculos realizados.....	20
Análisis estadístico.....	20
Búsqueda bibliográfica.....	20
Resultados.....	21
Prevalencia de alelos en la población general y en los pacientes remitidos.....	21
Relación de los alelos en las dos poblaciones.....	23
Relación entre los alelos y el motivo de consulta.....	23
Influencia del sexo en el tipo de alelo.....	24
Discusión.....	25
POI asociado al gen FMR1.....	26
Trastornos asociados a la mutación completa del gen FMR1.....	27
Influencia del sexo.....	28
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29

INTRODUCCIÓN

Características generales del trastorno

El síndrome de X-frágil (SXF) es un trastorno hereditario asociado al cromosoma X con una herencia dominante ligada al sexo. Es considerado la enfermedad genética rara más común, siendo la primera causa de discapacidad intelectual y de autismo en todo el mundo.

Su prevalencia en la población y entre sexos no está exactamente establecida, pero se ve una mayor proporción de afectados en el sexo masculino (1:4000) respecto al femenino (1:6000), con una relación 3:1. En cuanto a las premutaciones, las mujeres presentan una probabilidad de 1:250 y los hombres 1:500.^{1,2}

Los individuos con síndrome de X frágil suelen caracterizarse por presentar discapacidad intelectual, que va de grados más leves a graves. No todos los afectados presentan las mismas características ni son todos iguales fenotípicamente, pero sí tienen muchos rasgos que se van repitiendo entre varios de los afectados.³

Se ha visto que en los individuos con la mutación completa sus síntomas varían en función del sexo y de la edad. Pero suelen diferenciarse porque además presentan:

- Déficit de atención e hiperactividad (TDAH)
- Ansiedad y estado de ánimo inestable
- Problemas de conducta, como rabietas, pataletas y descontrol
- Rasgos característicos del síndrome autista, tales como aleteo de las manos y evita contacto visual
- Retraso en el habla
- Hipersensibles a ruidos fuertes o a luces muy brillantes
- Convulsiones (20%)
- Obesidad, trastorno del sueño y problemas gastrointestinales (30%)

Los afectados suelen presentar fenotipos característicos como: orejas grandes y cara alargada, una frente amplia y una mandíbula prominente, macroorquidismo (testículos grandes), pies planos, hiperlaxitud articular y escoliosis.^{3,4} Sin embargo, no todos los afectados con la enfermedad manifiestan estas características fenotípicas, hay personas con SXF que no presentan nunca ningún rasgo físico.³

Estos signos suelen manifestarse un mayor número de varones afectados que mujeres afectadas, además de ser más pronunciados. Esto se explica porque el sexo femenino inactiva uno de los cromosomas X de manera aleatoria por lo que, si un cromosoma X porta la mutación y afecta a su función, el resto de las células que expresan el alelo normal pueden acabar compensándolo. Por este motivo, los hombres al tener una única copia del cromosoma X, si presentan la mutación manifestarían los efectos de esta.⁵

Figura 1

Características clínicas del SXF

	Características clínicas	Prevalencia
Físicas	Cara alargada	83% más común en adultos
	Macrocefalia	50-81%
	Orejas prominentes	75%
	Mandíbula prominente	80% en adultos
	Pies planos	29-69%
	Macroorquidismo	95% desde la adolescencia
	Hipermovilidad articular	50-70% más común en niños
Psicológicas	TDAH	80% en niños y 40% en niñas
	TEA	50-60% en niños y 40% en niñas
	Ansiedad	58-86%
	Agresividad	40% en niños y 10-15% en niñas
Desarrollo	Discapacidad intelectual	85% en niños y 25-30% en niñas
	Déficit del lenguaje	100% en niños y 60-75% en niñas
Otros	Estrabismo	8-30%
	Otitis recurrente	47-75% en los primero 5 años
	Problemas gastrointestinales	31%
	Obesidad	30-61%
	Convulsiones	15-20%

Nota: TDAH: Trastorno de atención e hiperactividad; TEA: trastorno del espectro autista

Fuente: Adaptación del artículo Síndrome del X frágil: presentación clínica, patología y tratamiento. Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ, Martínez-Cerdeño V. Fragile x syndrome: Clinical presentation, pathology and treatment. Gac Med Mex. 2020;156(1):58-64. doi:10.24875/GMM.M19000322.

El SXF es causado por una alteración en el extremo del brazo largo del cromosoma X, concretamente en la posición Xq27.3, produciendo una alteración en el gen *FMR1* (*Fragil X Mental Retardation 1*) que codifica para la proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*).

A nivel molecular, se produce un aumento en el número de repeticiones de los tripletes CGG en la región no codificante del gen. Además, los afectados con la mutación completa presentan, en las citosinas de estas regiones CpG aguas arriba, metilaciones fuera de lo normal que conducen a una inhibición de la expresión de la proteína codificante.^{2,6}

La proteína FMRP se sintetiza en el citoplasma en la mayoría de los tejidos gracias al proceso de *splicing* alternativo generando diferentes isoformas, aunque desempeñan un papel más importante en las neuronas, linfocitos y testículos. En las neuronas se asocia a una correcta sinapsis, por lo que si se presenta una alteración en la generación de la proteína acaba causando problemas cognitivos.⁴

Antecedentes

El síndrome fue descrito por primera vez por James Purdon Martin y Julia Bell en 1943, estudiando a una familia donde once miembros masculinos presentaban síntomas de retraso mental. Además, tenían fenotipos muy parecidos, llevando a que estos dos investigadores se plantearan que podría ser una afectación hereditaria vinculada al sexo.⁷⁻⁹ Se denominó Síndrome de Martin-Bell, en honor a los descubridores. Un año más tarde, Lehrke estimó que un gran porcentaje de los retrasos mentales se podrían atribuir a mutaciones en el cromosoma X, por lo que estableció el concepto de retraso mental ligado al cromosoma X (XLMR).¹⁰

En 1969, Herbert Lubs estudió a una familia de cuatro varones de tres generaciones distintas que presentaban problemas neuronales y rasgos fenotípicos característicos. Lubs acabó descubriendo el origen genético de la enfermedad, concretamente encontró la existencia de un estrechamiento en la zona distal del brazo largo del cromosoma X de los afectados, al que se le denominó "sitio frágil". Debido a este descubrimiento se acabó cambiando el nombre a síndrome de X frágil (OMIM #300264).¹¹

En 1991 el gen responsable del síndrome fue específicamente identificado en el cromosoma X (región q27.3) y se le denominó "*fragile X mental retardation 1 gene*" (*FMR1*). Este descubrimiento ayudó al desarrollo de diagnóstico prenatal y a estudiar esta patología.^{8,9}

Durante los años posteriores se describieron diferentes fenotipos y patologías asociados a la expansión de los triplete. Algunos ejemplos son el síndrome de temblor/ataxia de X frágil (FXTAS), la Insuficiencia ovárica precoz asociado al X frágil (FXPOI), el trastorno del espectro autista (TEA), entre otros.¹²

Gen *FMR1*

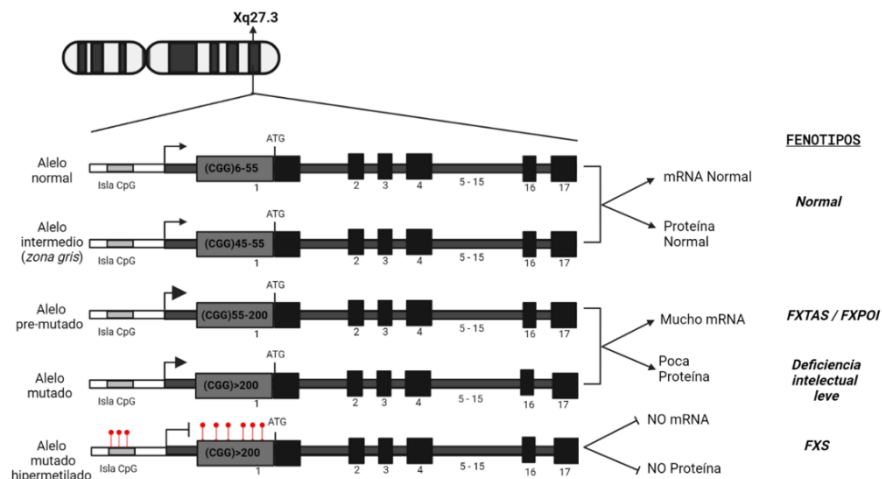
El gen *FMR1*, identificado en 1991, se encuentra en el brazo largo del cromosoma X, concretamente en la posición Xq27.3. Tiene una longitud de 38 kb y está formado por 17 exones.¹¹ Su producto transcripcional es un mRNA de unos 4,4 kb que sufre *splicing* alternativo dando diferentes isoformas de la proteína FMRP, proteína necesaria para el correcto desarrollo del cerebro.^{2,6} Los diferentes tamaños de las múltiples isoformas sugieren que los productos desempeñan funciones claves en la actividad del canal iónico, en la plasticidad sináptica y en las estructuras de los neurotransmisores.¹³

El gen presenta repeticiones del trinucleótido CGG en la región 5' no traducida (5'UTR) y una isla CpG a 250 pb aguas arriba de la repetición. La secuencia de trinucleótidos presenta polimorfismo en la longitud, diferenciando cuatro alelos. En condiciones normales las repeticiones van entre 6 y 45, siendo la más común 30 repeticiones. Después encontramos la zona gris (ZG) con un rango de repeticiones entre 45 y 54. En ocasiones, en algunos individuos estas repeticiones pueden volverse inestables y llegar a tener una longitud de entre

55 y 200 repeticiones del trinucleótido, lo que conlleva a la llamada premutación (PM).¹⁰ Por último, se encuentra la mutación completa (FP) que se debe a una expansión de más de 200 repeticiones de este triplete, provocando una disminución de los niveles del producto proteico y una acumulación del mensajero. Se suele dar una hipermetilación en las citocinas de las repeticiones CGG del gen y de los residuos de citosina en islas CpG, provocando su silenciamiento y disminuyendo los niveles de expresión de la proteína FMRP.⁶

Figura 2

Estructura adaptada del gen *FMR1*



Nota: Representación del alelo normal, del alelo ZG y del premutado, la mutación completa y de la mutación completa metilado. La primera columna de la derecha representa los productos que generan cada tipo de gen *FMR1* y la segunda los consecuentes fenotipos. El tamaño de la flecha representa la cantidad de ARNm que se produce. Los puntos rojos son metilaciones.

Adaptación basada: Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, Neri G. Transcriptional reactivation of the *FMR1* Gene. A possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. *Genes (Basel)*. 2016;7(8). doi:10.3390/genes7080049. Imagen realizada en BioRender.com

En los alelos del gen no mutado únicamente puede estar metilada una región a unos 650 y 800 nucleótidos aguas arriba del tramo de repeticiones CGG, el promotor. Esto parece ser un límite que impide que la metilación se expanda aguas abajo, protegiéndolo de la propagación de la metilación del DNA.⁶ En las mutaciones completas este límite está ausente, como consecuencia se da la metilación tanto del promotor como de la región CGG; esto conlleva a la inhibición de la transcripción del gen *FMR1* provocando una reducción o ausencia de la proteína FMRP.¹¹

Si se da una premutación y el gen *FMR1* no está metilado, es transcripcionalmente activo llegando a una producción excesiva de ARN mensajero (aumentando hasta cinco veces) siendo tóxicos para las neuronas, y presentando unos niveles normales o reducidos de la respectiva proteína.¹¹ Además, tienen un alto riesgo a expandirse a través de la meiosis materna, lo que implica un elevado riesgo de tener descendencia con la mutación completa.⁶ Por otra parte, si hay entre 45 y 54 repeticiones, la denomina zona gris, los alelos se

consideran normales aunque tienen una mayor probabilidad de que sus siguientes generaciones tengan premutaciones y las generaciones lejanas mutaciones completas.¹⁴

En muchas ocasiones, se encuentran individuos con mosaicismo tanto en el tamaño de las repeticiones como en el nivel de metilación.¹¹

En función del número de repeticiones y de la edad de la madre, la transmisión y expansión de los triplete será diferente.^{6,11} Sin embargo, se ha detectado la presencia de trinucleótidos AGG intercalado cada 9-10 repeticiones de CGG en el gen. Estas interrupciones mantienen estable los trinucleótidos durante la replicación del DNA, reduciendo el riesgo a que una premutación materna se expanda y provoque una mutación completa.^{11,15} Se predijo la estructura secundaria de esta región, viendo que todos los alelos que tenían un rango corto de repeticiones CGG no presenta interrupciones AGG y forman una estructura de horquillas perfectamente emparejada. Mientras que en los alelos con interrupciones, las horquillas están ramificadas por la presencia de los AGG y su longitud se reduce considerablemente.⁴⁰

Otras marcas epigenéticas que se dan en los alelos con la mutación completa es la desacetilación de las histonas H3 y H4, una reducción de la metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3-K4) y una hipermetilación de H3-K9. Estos cambios conllevan a una modificación en la configuración de la cromatina, conduciéndola a un estado de heterocromatina que evita la unión de factores de transcripción y desactivación de la transcripción de genes.^{11,16} Además, hay que tener en cuenta la inactivación del cromosoma X en el caso de las mujeres. El silenciamiento aleatorio de uno de los dos cromosomas X puede ser el mutado, inhibiendo el producto genético y acabando en un fenotipo más leve.¹³

Los individuos portadores de una premutación pueden desarrollar alguna alteración a nivel de comportamiento y neuronal.¹¹ Las mujeres con PM tienen un 50% de probabilidades de transmitirla a sus descendientes y que se expandan las repeticiones. Si la mujer es portadora de la mutación completa, también tiene un 50% de probabilidades de transmitírselo a sus hijos (mujeres y hombre). Los hombres con la premutación también pueden expandir las repeticiones, pero únicamente se lo transmitirá a sus hijas, a los hijos varones no; de la misma manera ocurre si el padre se ve afectado con la mutación completa.⁴

Proteína FMRP

La FMRP es una proteína citoplasmática de unión a ARN codificada por el gen *FMR1* que forma parte del complejo *CYFIP1-EIF4E-FMR1* y se encarga de regular la traducción de diferentes ARNm, en especial las presentes en las dendritas de las neuronas que están relacionadas con el desarrollo neuronal. Se expresa en diferentes tejidos como: en la placenta, en los linfocitos, en los testículos y en el cerebro. En estos dos últimos tejidos son en donde

se encuentran los niveles más elevados; concretamente las neuronas diferenciadas del cerebro las encontramos en el hipocampo, encargadas de la memoria, y en el cerebelo.¹⁷

La proteína completa está formada por 632 aminoácidos y contiene diferentes dominios: la señal de exportación nuclear (NES) y el de localización nuclear (NLS), indicando que se mueve entre el citoplasma y el núcleo; y los dominios de unión al mRNA: dos dominios de homología K (KH), el de unión a ARN N-terminal y la caja RGG (arginina-glicina-arginina) en el extremo C-terminal.¹⁸

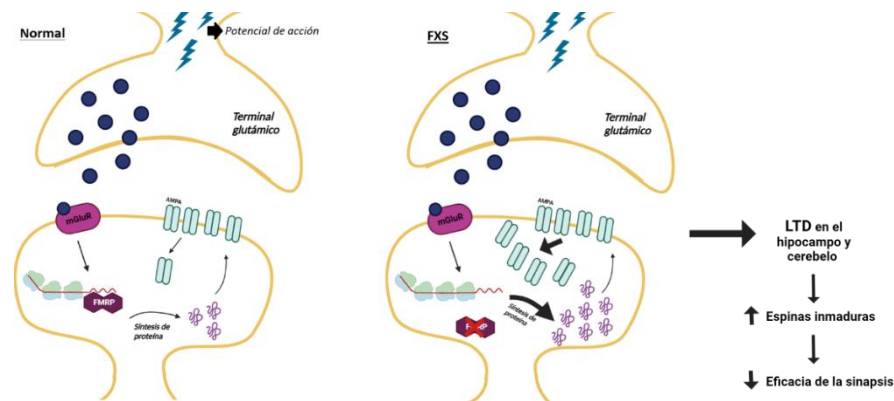
Hay evidencias que demuestran que la falta de FMRP produce una mayor traducción de mRNA, por lo que se considera que podría tener una función de represión traduccional. La proteína transporta el mRNA transcrito a través de las proyecciones neuronales y así regular su traducción en los compartimientos sinápticos, teniendo un papel importante en el funcionamiento de las dendritas y en la sinapsis.^{18,19}

En las dendritas, FMRP controla la traducción de proteínas de membrana y de señales, concretamente regula la traducción de los receptores de glutamato en los astrocitos y la producción de mielina en las oligodendritas.^{5,6} Por lo tanto, al regular la síntesis de proteínas sinápticas coordina la transmisión de la sinapsis, pudiendo afectar a la forma que responde la neurona ante señales.⁵ El mecanismo exacto que produce el síndrome de X frágil no se conoce exactamente, pero se sabe que la falta de FMRP altera las conexiones sinápticas entre neuronas; disminuyendo la cantidad de dendritas y espinas dorsales en los pacientes con SXF y desarrollando síntomas específicos de esta enfermedad.⁵ Además, un exceso de secreción de glutamato estimula la producción de receptores glutamatérgicos y una inhibición de los receptores GABA.

En estudios con modelos de ratones *knockout* para *FMR1* se ha visto como la ausencia de FMRP conduce a una mayor síntesis de proteínas neuronales involucradas en la internalización de los receptores AMPA, que median la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso y su posterior degradación.^{5,11} Al disminuir el número de este receptor ionotrópico en la membrana de las neuronas, aumenta la cantidad de espinas dendríticas inmaduras y de LTD, debilitando la eficiencia sináptica en las neuronas. Este suceso podría explicar la discapacidad intelectual que presentan las personas con el Síndrome de X frágil (Figura 3)^{7,20}

Figura 3

Modelo molecular de la neuropatología de Síndrome de X frágil en neuronas postsinápticas



Nota: Imagen de la izquierda representa la actuación de la proteína FMRP en una situación normal, donde se internalizan los receptores metabotrópicos de manera moderada. En la imagen de la derecha vemos como la persona con SXF tiene una falta de producción de FMRP, llevando a una mayor internalización de los receptores AMPA. Todo esto conlleva a una disminución de la eficacia sináptica. Receptor metabotrópico: son receptores que presentan una actuación relativamente lenta, ya que su activación no genera una apertura inmediata del canal sino que desencadena una serie de procesos que terminan llevando a ella.

Fuente basada en: Pop AS, Gomez-Mancilla B, Neri G, Willemsen R, Gasparini F. Fragile X syndrome: A preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(6):1217-1226. doi:10.1007/s00213-013-3330-3. Imagen realizada mediante BioRender.com

Trastornos asociados

La alteración en el número de repeticiones del trinucleótido CGG en la región 5'UTR del gen *FMR1* se manifiesta con problemas de conducta, neurológicos y cardíacos, pero también se relaciona con otras afecciones como el síndrome de temblor/ataxia (FXTAS), el fallo ovárico precoz (POF), el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), el trastorno del espectro autista (TEA) y otras discapacidades en el desarrollo de la inteligencia y aprendizaje (DI).²⁰

DIAGNÓSTICO

Se determina el número de repeticiones del trinucleótido CGG en la región 5'UTR en el gen *FMR1* cuando se sospecha que el paciente puede padecer del SXF porque presenta algunos de los rasgos descritos anteriormente (deficiencia mental, autismo o retraso en el habla). Sin embargo, detectar estas manifestaciones clínicas no sirve para dar un diagnóstico positivo del trastorno, sino que hay que realizar un diagnóstico genético para que se pueda decir con seguridad que la persona padece de síndrome de X frágil.²¹

Evolución de las pruebas diagnósticas

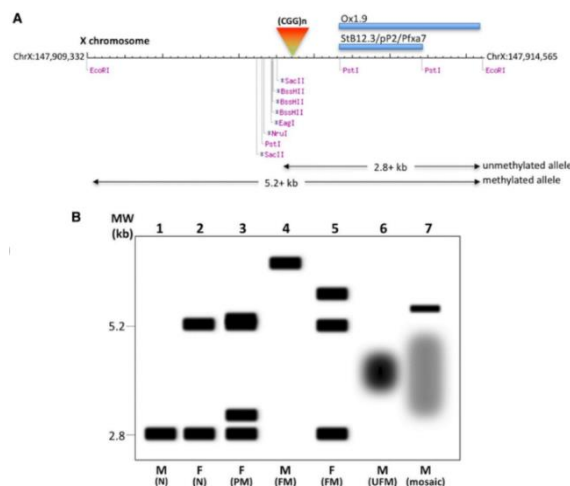
Inicialmente, para el diagnóstico de la enfermedad se basaba en la evaluación citogenética de la presencia del sitio frágil FRAXA en el cromosoma X bajo determinadas condiciones de cultivo. El método consistía en cultivar células del paciente en un medio libre de ácido fólico y

con desoxitimidintrifosfato (dTTP) durante un ciclo celular y analizar el cariotipo.²¹ Pero este procedimiento tenía muchas limitaciones, ya que precisaba de mucho tiempo y su interpretación era complicada. Además, era muy poco sensible, ya que no podía distinguir entre el sitio FRAXA y los otros sitios frágiles cercanos en el mismo brazo cromosómico. El sitio FRAXA fue el primer sitio frágil que se detectó y describió, es el que se da con más frecuencia y contiene el gen FMR1. Para aumentar la sensibilidad, el método se complementó con la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas de ADN.²¹

Más tarde, en 1991, Griffiths y Strachan describieron una nueva técnica más sencilla para poder detectar con una mayor sensibilidad y especificidad las anomalías del DNA asociadas al síndrome de X frágil.²² El análisis de fragmentos polimórficos o *Southern-blot*, es una técnica que utiliza la combinación de dos enzimas de restricción sensibles a la metilación que realizan la digestión del ADN seguido de una electroforesis en gel y transferencia a una membrana de nitrocelulosa y, la posterior hibridación con sondas específicas.²³ De esta manera se determina tanto el tamaño de las repeticiones CGG como el estado de metilación permitiendo distinguir entre una premutación y una mutación completa. Sin embargo, esta técnica requiere de una gran cantidad de ADN y de mucho tiempo; además de ser costosa y difícil de interpretar.

Figura 4

Ensayo de transferencia de Southern para los trastornos del gen FMR1



Nota: A) Representación esquemática del fragmento EcoRI de 5,2 kb que contiene el extremo 5' del gen FMR1. Se muestran varios lugares de reconocimiento de enzimas de restricción sensibles a la metilación, como las repeticiones CGG y dos conjuntos de sondas.

B) Representación de los tamaños de fragmentos al realizar el gel y revelar. 1 y 2 son alelos normales (N) masculino (M) y femenino (F) respectivamente. 3 es una mujer portadora de la premutación. FM es una mutación completa y se representa tanto en hombres como en mujeres (4,5). Además, se incluyen portadores de la mutación completa no metilada (UFM) y un mosaico masculino con el alelo FM metilado y una mezcla heterogénea de alelos FM no metilados. Fuente: Hayward BE, Kumari D, Usdin K. Recent advances in assays for the fragile X-related disorders. *Hum Genet.* 2017;136(10):1313-1327. doi:10.1007/s00439-017-1840-5

Dados estos inconvenientes, desarrollaron otras técnicas de diagnóstico basadas en la combinación de *Southern-blot* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante esta segunda, se realiza una amplificación de las repeticiones CGG usando cantidades menores de ADN. Es una técnica más rápida, menos costosa y muy sensible; capaz de detectar aquellas repeticiones del gen que se encuentran en el rango de lo normal y algunas premutaciones, además del estado de metilación. Sin embargo, no puede amplificar las repeticiones de gran extensión: más de 300 repeticiones en hombres y más de 160 en mujeres; ya que las secuencias CGG pueden hibridarse por complementariedad y formar estructuras secundarias, llegando a una interrupción de la reacción.

También, puede haber casos de falsos negativos ya que en ocasiones es difícil diferenciar las mujeres homocigóticas de las mujeres con mutación completa, ya que el alelo normal se amplifica correctamente, pero el alelo afectado no se amplifica lo suficiente para ser detectado.²³

Estas limitaciones llevaron a desarrollar un procedimiento que pudiera detectar todos los alelos del gen *FMR1*. La TP-PCR (*Triplet Repeat Primed PCR*) fue desarrollada por John P Warner en 1996 y consiste en una amplificación por PCR con tres cebadores.¹²

La TP-PCR pasa a ser el procedimiento que permite amplificar de forma simultánea el gen *FMR1* completo y los tripletes CGG de ambos sexos en la misma reacción de PCR. Además, se han generado diferentes kits que, por ejemplo, permiten detectar las interrupciones de AGG y, por lo tanto, el riesgo a ampliar el número de repeticiones en la siguiente generación. También hay kits que identifican si hay ausencia o presencia del alelo *FMR1* expandido (sistema Amplidex™ *FMR1* PCR de Asuragen²⁶).^{21,23}

Por último, se han desarrollado técnicas para identificar pacientes con el síndrome de X Frágil mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la proteína FMRP, determinando la presencia o ausencia de ésta. Aunque esta técnica puede ser más económica y fácil, no permite detectar portadores de la premutación o de mosaicos; por lo que tiene que ir complementada de una segunda técnica confirmatoria.²⁴

Diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal se realiza en aquellas mujeres embarazadas que son portadoras de la premutación o la mutación completa en el gen *FMR1*, ya que pueden transmitir la mutación a sus hijos. Mediante este servicio, permite a los médicos y a las familias a conocer el estado de salud del feto y proporcionar asesoramiento genético.²¹

Las pruebas prenatales se realizan a partir de las vellosidades coriónicas o líquido amniótico. Tras la recogida de muestra fetal, se extrae el DNA por métodos convenciones.^{27 28}

Para asegurar que no hay contaminación materna y que los resultados de las pruebas anteriores sean fiables se complementa con una QF-PCR, una técnica rápida y sencilla donde se amplifican los microsatélites (SRTs) específicos del cromosoma X.²⁸

Condiciones para realizar el test genético

La prueba genética para el síndrome de X frágil se solicita cuando se observan o se dan algunas de estas condiciones:

- La persona de cualquier sexo con una discapacidad intelectual o retraso en el desarrollo y se acompañe de características fenotípicas típicas, problemas en el aprendizaje o comportamiento, una dificultad en sociabilizar, en mantener el contacto visual, familiares que padecen de síndrome de X frágil o con discapacidad intelectual y no se ha diagnosticado.
Además, también se le realizará si la persona muestra signos y síntomas del trastorno del espectro autista (TEA).
- Adultos mayores de 50 años que manifiestan síntomas de temblor o falta de control en los movimientos y que tienen ataxia cerebelosa progresiva. Especialmente aquellos que tienen antecedentes familiares con alteraciones en el gen *FMR1* o que tienen trastornos del movimiento.
- Mujeres con problemas de fertilidad o reproductivos, que presentan unas altas concentraciones de hormona folículo estimulante (FSH). Sobre todo, aquellas que tienen algún familiar con POI y con SXF, o que presente discapacidad intelectual no diagnosticada.

Si se realiza un diagnóstico con resultado positivo de presencia de SXF en algún miembro de la familia, se debe realizar una prueba genética en cascada a todos los miembros de la familia. Con esto se pretende identificar a aquellas personas que sean portadores de la premutación y puedan expandir la mutación completa a sus descendientes.^{27,29}

OBJETIVOS E HIPOTESIS DEL ESTUDIO

Este trabajo se basa en los datos recogidos por la Unidad de Genética del Hospital de Son Espases en pacientes remitidos para estudio de SXF desde el año 2016 y en población general de mujeres embarazadas.

Los objetivos principales de este estudio son:

1. Comparar la prevalencia de mutaciones, premutaciones y zona gris en pacientes que han sido referidos para el estudio del síndrome de X frágil y en población general.
2. Determinar la prevalencia de casos positivos para grupos de pacientes con DI, epilepsia, FOP, FXTAS, TDH, TEA, RMP y otros.

A partir de aquí se pretenderá:

1. Evaluar la necesidad de incluir el síndrome de X-frágil para un cribaje prenatal.
2. En función de los resultados obtenidos, evaluar la necesidad de revisar los criterios de inclusión de los pacientes para el estudio del síndrome de X-frágil.

Nuestras hipótesis son:

1. La prevalencia de premutaciones y mutación completa en nuestra población y grupo de pacientes se asemeja a los datos descritos en la bibliografía.
2. El grupo de pacientes remitidos para estudio de SXF presentan una mayor frecuencia de premutaciones y mutación completa que la población general.
3. El grupo de pacientes con FOP y FXTAS presenta una mayor frecuencia de premutaciones.

MATERIAL Y METODOS

Procesamiento de las muestras

Los datos para realizar el estudio de la prevalencia del síndrome de X frágil se obtuvieron de la Unidad de Diagnóstico Molecular y Genética Clínica del Hospital Universitario de Son Espases (HUSE), donde utilizaron muestras de sangre periférica de pacientes remitidos en los últimos 6 años por sospecha de padecer SXF (n=2036) y de mujeres embarazadas de población general que entre los años 2012 y 2014 fueron sometidas a un "screening" (n=3742). En el grupo de pacientes sólo se incluyen en el estudio los "casos índice", descartándose los estudios familiares.

Determinar el número de repeticiones del triplete CGG en el gen *FMR1*

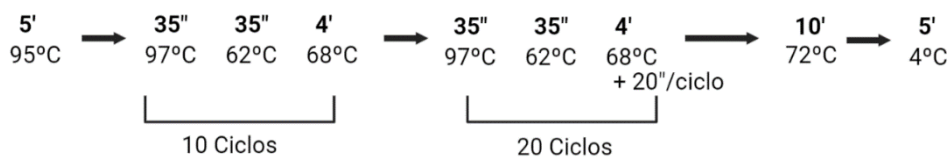
Para conocer el número de repeticiones CGG en el gen *FMR1* se empezó extrayendo el DNA de las muestras de sangre mediante el kit de extracción de *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega).

El siguiente paso es determinar el número de tripletes CGG que presenta el gen *FMR1*. Para ello se utiliza el kit *Amplidex PCR/CE FMR1* de la casa comercial *Asuragen™* que contiene los diferentes reactivos y *primers* para realizar la PCR. Siguiendo el protocolo, se realiza una TP-PCR (*Triplet Repeat Primed PCR*) donde se combinan tres cebadores específicos. Uno marcado con fluorescencia que se coloca de manera complementaria en una región aguas arriba de la repetición CGG (*forward*), el segundo en el extremo 3' contiene 2-5 repeticiones en tándem que se superpone a la repetición CGG y a la región adyacente a ésta (*reverse*), flanquean la región de repeticiones CGG. El último, es un cebador complementario a la región de repeticiones del gen *FMR1*. Después se procede a hacer la técnica de la PCR, donde se generan múltiples amplicones de varios tamaños con una diferencia de 3 pares de bases, que serán determinados por electroforesis capilar. En el caso de que haya una expansión, se generará una imagen de escalera o cola de dragón, donde los picos van disminuyendo de tamaño.¹²

Los tiempos que se programan en el termociclador para la técnica *Asuragen TP-PCR* son los marcados en al Figura 5

Figura 5

Tiempos del termociclador para la técnica Asuragen TP-PCR:



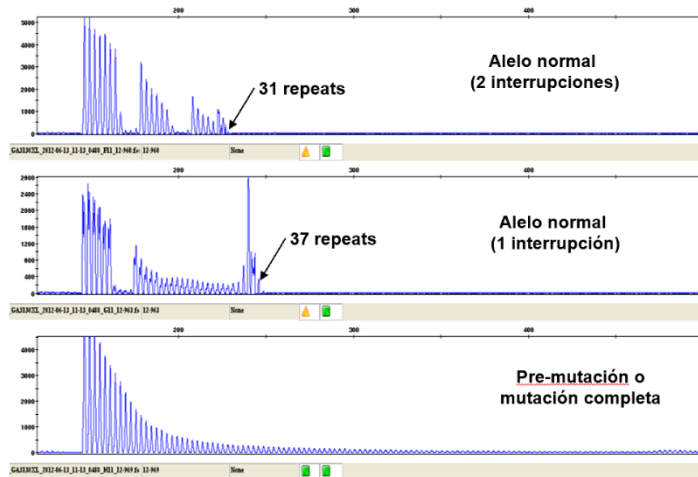
Nota: Los números en negrita representan los tiempos de tienen que debe estar la muestra a sus correspondientes temperaturas. Las cajas representan las secciones que se deben repetir según el número de ciclos marcados. Imagen realizada mediante BioRender.com

Después se procede a realizar una electroforesis capilar, realizado por la Unidad de Secuenciación en el Hospital de Son Espases, donde se mide el tamaño de los amplicones. El electroferograma resultante detecta los productos generados por la PCR; el de longitud completa generados por los *primers* que abarcan la región de repeticiones CGG (*forward* y *reverse*) y los diferentes productos cebados por aquel primer que hibrida con las repeticiones CGG.

El perfil de los picos proporciona información de los genes analizados, donde muestra la cigosidad y la presencia de interrupciones AGG. Los picos pueden dar información del número de repeticiones de CGG. Además, el perfil de los picos también proporcionar una cuantificación de las repeticiones CGG muy precisa al contar el número de picos generados por el primer CGG.¹⁷

Figura 6

TP-PCR en una región de repetición CGG/AGG.



Nota: (A) Patrón de TP-PCR de un alelo normal con 31 repeticiones y 2 interrupciones. (B) TP-PCR de un alelo normal con 37 repeticiones y 1 interrupción. (C) Una TP-PCR de una expansión de tripletes, pudiendo ser una premutación o una mutación completa en función de la longitud de la cola y el número de repeticiones
Fuente: Extraído de una presentación power point propia del HUSE

Los diferentes datos extraídos se añadieron en un Excel, donde se anotó el número y nombre del paciente, su sexo y edad, el motivo por el cual se ha solicitado la prueba de SXF, el resultado de la prueba, el número de bases y el número de repeticiones que presentan (Figura 7). A partir de estos datos se realizan los cálculos.

Figura 7

Representación de la tabla realizada para la presa de datos.

Muestra	Sexo	Edad	Motivo	Resultado	ASSURAGEN 1° REPEAT	ASSURAGEN 2° REPEAT
8815453	V	7	RPM	NORMAL	318	30
88161311	M	33	FOP	NORMAL	283	19
					318	30

Nota: La primera columna representa el número de la muestra, después el sexo y la edad del paciente al que corresponde la muestra, continuamos con el motivo por el cual se le realizó la prueba y el resultado. En la columna de Assuragen informa de los pares de bases que contiene la secuencia leída y la columna que le procede informa del número de repeticiones CGG que presenta. Si es una mujer homocigota se apuntan las repeticiones de los dos cromosomas X.

Cálculos realizados

Para la realización de los cálculos se diferenciaron una serie de grupos: la población general, los pacientes remitidos a la prueba que seguían los criterios marcados y excluyendo los estudios familiares y los que no tenían la información clara para clasificarlo en alguno de los grupos, el motivo por el cual se les remitieron a la prueba (DI, epilepsia, FOP, FXTAS, TDH, TEA, RPM y otros), el tipo de alelo (“normal”, “zona gris”, “premutación” y “mutación completa”) y el sexo.

Se calcularon mediante Excel los diferentes porcentajes:

1. Tasa de resultados de la prueba de X-frágil en población general
2. Tasa de resultados de la prueba de X-frágil en pacientes
3. Tasa de pacientes remitidos según el genotipo y el sexo
4. Tasa de pacientes remitidos según el motivo
5. Tasa de pacientes remitidos según el sexo
6. Tasa de pacientes remitidos según el motivo y el genotipo

Análisis estadístico

Para determinar si los individuos con los diferentes alelos analizados en nuestro estudio se asemejan a los de la población general calculada a partir estudios realizados anteriormente, se utilizó el método de simulaciones de *Monte Carlo* y así determinar si el p-valor es significativo. Del mismo modo se analizaron los datos de los pacientes tramitados la prueba de X frágil.

Además, se comprobó para cada alelo si había relación entre los individuos de la población general y los tramitados a la prueba usando el test de *Fisher*.

Por otra parte, se estudió la independencia entre los diferentes alelos y los motivos por los cuales se les tramitó a los individuos a la prueba de X frágil. De la misma manera, comprobamos si había relación entre el sexo y el tipo de alelo que presentan. En ambos casos se utilizó el método de simulaciones de *Monte Carlo*.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa de *RStudio*.

Todos los resultados se consideran significativos si presentan un p-valor<0,05 con un nivel de confianza del 95%.

Búsqueda bibliográfica

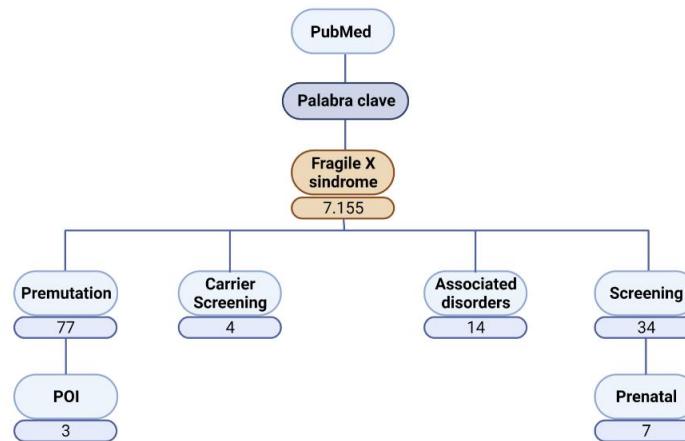
Entre el febrero y el junio de 2022 se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica respecto al síndrome de X frágil. El buscador principal escogido fue el PubMed en los cuales se le aplicó la palabra clave fragile X síndrome. A partir de aquí se fue refinando la búsqueda añadiendo otras palabras claves: *premutation, carrier screening, prevalence, associated disorders, screening*. Se combinaron por una parte las palabras *fragile X síndrome, premutation y POI*;

y por otra parte, *fragile X síndrome, screening y prenatal*. Los resultados de estas búsquedas se filtraron seleccionando que el *abstract* y el texto completo gratis estuviesen disponibles, además de los *reviews* y los libros y documentos. Después de hacer esta primera búsqueda se filtró que únicamente aparecieran los de los años entre 2000 y 2022. (Figura 8)

De manera complementaria, se consultaron diferentes páginas webs como el XFragil.net, Fraxa.org, *Orphanet* entre otras y revistas como el *Nature*. Para algunas aclaraciones de conceptos se buscó en el *MedlinePlus* o *OMIM*.

Figura 8

Diagrama de la búsqueda bibliográfica en el PubMed



Nota: Se ha usado como buscador principal el PubMed. Buscado entre el periodo de febrero y junio de 2022. Los números de abajo de los filtros son los resultados que las diferentes búsquedas.

RESULTADOS

Prevalencia de alelos en la población general y en los pacientes remitidos

Se analizaron un total de 3.742 individuos para la población general y 2.036 para los pacientes remitidos para la prueba. En la población general se identificaron un total de 71 (1,9%) ZG, 34 (0,95%) PM y ninguna (0%) FM. Por otra parte, los pacientes que fueron remitidos a la prueba se identificaron 45 (2,2%) ZG, 6 (0,3%) PM y 8 (0,4%) FM. (Tabla 1)

Tabla 1

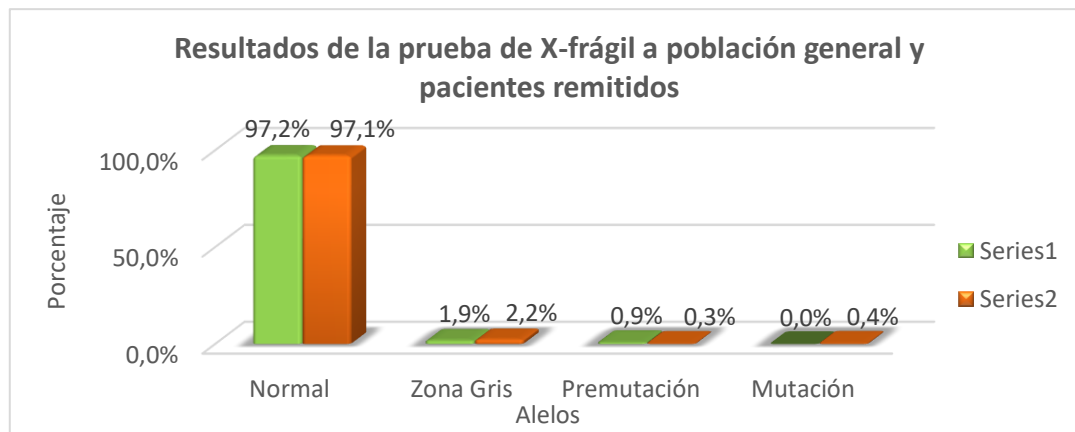
Personas de la población general y los remitidos a la prueba de X frágil clasificadas según el alelo

Tipo de Alelo	Población General	Proporción	XF	Proporción
Normal (<45)	3637	97,2%	1977	97,1%
Zona Gris (45 – 54)	71	1,9%	45	2,2%
Premutación (55 – 200)	34	0,9%	6	0,3%
Mutación (>200)	0	0,0%	8	0,4%

Nota: Contiene la información extraída de la base de datos del Hospital Universitario de Son Espases. Se muestra el número de pacientes de la población general y de los remitidos a la prueba de X frágil, además de sus proporciones. Los números entre paréntesis al lado de los alelos indica el rango de repeticiones.

Gráfica 1

Comparación de las dos poblaciones según el alelo



Nota: En verde se representan el porcentaje de cada alelo en la población general y en naranja los de las personas remitidas a la prueba.

Con estos datos se realiza el test de Bondad de ajuste con el p-valor calculado con el método de simulación *Monte Carlo* en cada población, para ver si los datos de nuestro estudio siguen una distribución de frecuencias esperadas de estudios previos. Para ello se utilizaron los datos de la tablas 1 y 2 de la publicación “*Prevalence of CGG Expansions of the FMR1 Gene in a US Population-Based Sample*”³². Mediante toda la información se extrae una aproximación de la prevalencia de cada alelo en la población siendo el 97% normales; 2,45% ZG; 0,5% PM y 0,05% FM. Realizando esta prueba en *RStudio* se obtiene un p-valor de 0,0012; por lo que los datos de nuestra población general no siguen del todo la distribución esperada de los estudios realizados anteriormente.

Por otro lado, se realiza la misma prueba de simulación *Monte Carlo* para el segundo grupo de pacientes. En este caso no se ha encontrado bibliografía sobre la frecuencia esperada de la enfermedad en aquellas personas con nuestros criterios de selección. De esta manera, se ha realizado una estimación coherente a partir de nuestros datos sobre los pacientes y nuestra población general. Determinamos que la prevalencia de normales es 96%; de ZG un 3,25%, PM un 0,65% y FM un 0,1%. Realizando el test estadístico anteriormente comentado se obtiene un p-valor de 2×10^{-4} . Este valor confirma que proporción de personas tramitadas al estudio no se asemeja a distribución propuesta.

Relación de los alelos en las dos poblaciones

Basándonos en la *Tabla 1*, proseguimos a determinar si hay diferencias significativas de cada alelo entre las dos poblaciones. Utilizamos el método de *Fisher*, con una confianza del 95%, para determinar el p-valor y ver si hay más probabilidades de encontrar el alelo en alguna de las dos poblaciones.

Para el alelo normal obtuvimos un p-valor de 0,6144, por lo que no hay diferencias significativas en el número de individuos normales entre ambas poblaciones, con un intervalo de confianza del 95% entre 0,00 – 1,37. La probabilidad de encontrar este alelo en las dos poblaciones es la misma. Algo parecido pasa con el alelo de zona gris, donde obtuvimos un p-valor de 0,237 y un IC (95%) entre 0,00 – 1,2, con una odds=0,855, esto significa que hay más probabilidades de encontrar este alelo en los pacientes remitidos a la prueba de X frágil. Al realizar la prueba estadística para la premutación, salió un p-valor de 0,999 (95% IC entre 0,00 – 7,58), por lo que no hay diferencias significativas en encontrar el alelo en ambas poblaciones, pero sí que hay una mayor probabilidad de encontrarla en nuestra población general. Por último, sí que encontramos diferencias significativas en encontrar el alelo mutado en la población de personas remitidas (p-valor=0,0002), además obtuvimos un intervalo de confianza del 95% entre 0,00 – 0,246, por lo que hay más probabilidades de encontrar la mutación completa en este grupo.

Relación entre alelos y el motivo de consulta

Al grupo de pacientes remitidos para la prueba de X frágil se les clasificó según el motivo de consulta y el tipo de alelo que presentaban. Una vez obtenidos estos datos, se calculó la prevalencia en cada caso. Quisimos determinar si había alguna relación entre el motivo y el resultado de la prueba, para ello realizamos un test de independencia basado en las simulaciones de *Monte Carlo* con un error del 0,05%. El resultado de la prueba dio un p-valor de 0,103; por lo que no hay dependencia entre el motivo de consulta y el resultado de la prueba. Como se observa en la *Tabla 2* los fenotipos que presentan una mayor probabilidad a estar asociados con la mutación completa son el TDH y RPM. Por otro lado, cabe destacar que un 6,5% de las mujeres que padecen de FOP contienen el alelo ZG mientras que ninguna presenta la premutación; y que ninguna persona con FXTAS presentan el alelo premutado, todos son normales.

Tabla 2

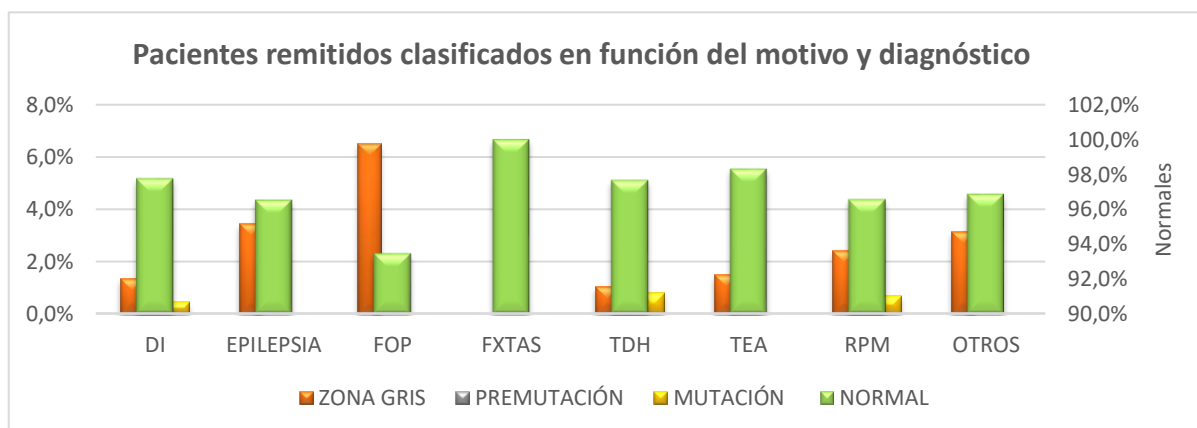
Porcentaje de pacientes en función del motivo y el resultado de la prueba

	NORMAL	ZONA GRIS	PREMUTACIÓN	MUTACIÓN
DI	97,8%	1,3%	0,4%	0,4%
EPILEPSIA	96,6%	3,4%	0,0%	0,0%
FOP	93,5%	6,5%	0,0%	0,0%
FXTAS	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
TDH	97,7%	1,0%	0,5%	0,8%
TEA	98,3%	1,5%	0,2%	0,0%
RPM	96,6%	2,4%	0,3%	0,7%
OTROS	96,9%	3,1%	0,0%	0,0%
TOTAL	1977	45	6	8

Nota: En la columna de la derecha indica el motivo por el cual las personas se realizaron la prueba de X frágil. La primera fila clasifica en función del alelo. La última fila contiene indica el número de pacientes en cada alelo

Gráfica 2

Porcentaje de pacientes remitidos clasificados en función del motivo y el resultado de la prueba



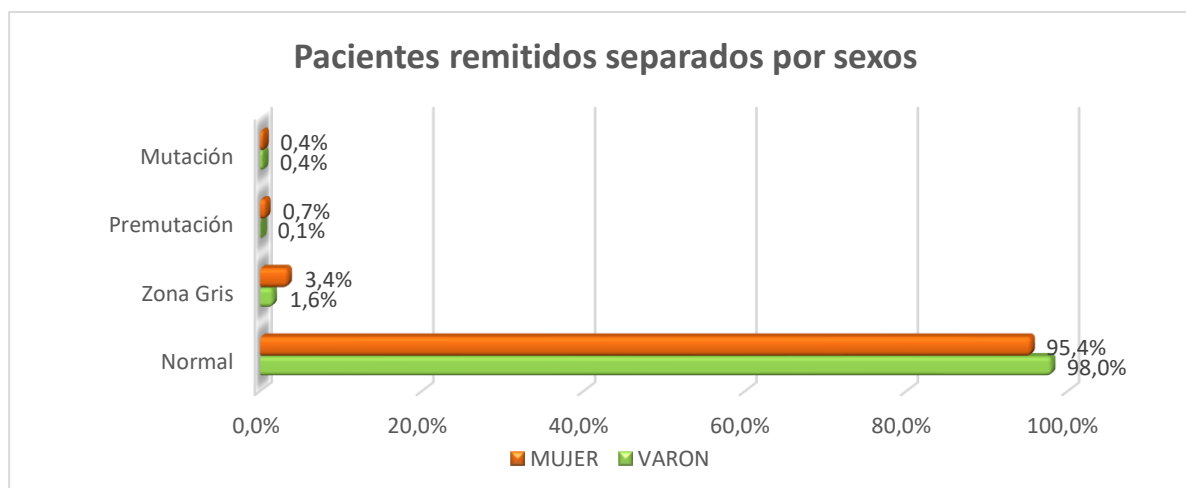
Nota: A la derecha se presentan los porcentaje de valores elevados, que corresponden unicamente a los alelos normales, mientras que a la izquierda son los valores de los alelos con expansión fuera del rango normal

Influencia del sexo en el tipo de alelo

Quisimos comprobar si el sexo de la persona estaba asociado al tipo de fenotipo. Realizamos la proporción de los diferentes alelos en función del sexo en aquellos pacientes que se les hizo la prueba de X frágil porque presentaban una característica típica del síndrome, obtuvimos el siguiente gráfico (Gráfico 3).

Gráfica 3

Porcentaje de pacientes clasificados según el sexo y el alelo



Nuestra muestra de pacientes muestra que la proporción de varones y mujeres con mutación completa es la misma. Sin embargo, 7 veces más mujeres portadoras de la premutación que varones. Las diferencias en los porcentajes de ZG se deben al grupo de mujeres estudiadas por FOP. Para ver si realmente estos datos eran significativos con un nivel de confianza del 95%, realizamos el test de independencia basado en simulaciones del p-valor con el método de Montecarlo. Se obtuvo p-valor de 0,003, concluyendo que hay asociación entre el sexo y el tipo de alelo.

DISCUSIÓN

El presente estudio pretende determinar la prevalencia de mutaciones completas (FM), premutaciones (PM) y la expansión de la zona gris (ZG) tanto en la población general de las Islas Baleares, como los pacientes remitidos a la Unidad de Genética de la HUSE para la prueba de X frágil por alguno de los motivos descritos. Refiriéndonos a la *Tabla 1*, observamos que la proporción de mutaciones y de zona gris es mayor en aquellos pacientes a los que se les realiza la prueba porque presentan uno de los motivos descritos, que en los de la población general. Por el contrario, los resultados indican que hay una mayor probabilidad de encontrar la premutación en la población general que en nuestro grupo de pacientes (0,95% y 0,3%, respectivamente). Este resultado podría estar distorsionado por el hecho de que nuestra población general son todo mujeres por lo que estamos analizando mayor número de cromosomas X. Sin embargo, al comparar nuestros datos de población general con los datos del estudio “*Prevalence of CGG Expansions of the FMR1 Gene in a US Population-Based Sample*”³², vemos que este resultado podría sugerir que la prevalencia de premutación en nuestra población es mayor que lo esperado. Según la bibliografía revisada, se han encontrado una serie de trastornos presentes en personas con la premutación de X frágil:

- Trastorno de ansiedad
- Depresión y bajo estado de ánimo
- Rasgos asociados al autismo, como la dificultad de procesar la información o el uso del lenguaje
- Fatiga y dolor crónico, fibromialgia, trastornos autoinmunes y problemas para dormir.³³

También se ha demostrado que la prevalencia de los diferentes alelos de nuestra muestra de población general no sigue la distribución normal asociada a esta enfermedad; sino que, con un nivel de confianza del 95%, nuestra población general difiere a la estudiada por otros grupos de investigación. Se ha informado que los portadores de la premutación tienen un mayor riesgo a padecer diferentes afecciones difíciles de determinar su asociación con el genotipo, como: enfermedades autoinmunes, fibromialgia, migrañas, etc.³⁴ De esta manera se podría justificar el motivo por el cual, el cálculo realizado para ver si la prevalencia de los diferentes alelos de nuestra población general sigue la distribución normal asociada a esta enfermedad no da un resultado positivo. Se observa que un 0,9% de la población general presenta la PM, mientras que el grupo de pacientes estudiado únicamente el 0,3% son portadores de la premutación. Este motivo de prevalencia y dificultad de diagnóstico podría favorecer la implantación de un cribado neonatal a aquellas mujeres embarazadas para ver si son portadoras de premutación y en caso de serlo poder ofrecer el estudio prenatal del síndrome.

El SXF es una patología bastante común en la sociedad, además de tener consecuencias graves. La prueba para su detección es relativamente fácil de realizar y según diferentes estudios, su coste a nivel universal son aceptables.³⁵ Aunque un inconveniente que podría hacer que no se establezca como detección rutinaria es la falta de tratamiento o la cura de esta enfermedad,² sigue siendo una buena opción para detectar un mayor número de personas con la premutación y poder ofrecer asesoramiento genético.

POI asociado al gen FMR1

El fallo ovárico precoz asociado al cromosoma X frágil es la pérdida de función ovárica antes de los 40 años y se caracteriza por irregularidad menstrual prolongada (amenorrea, oligomenorrea o sangrado uterino disfuncional) y altos niveles séricos de la hormona folicular estimulante (característico de las mujeres menopáusicas). Las bases moleculares no se saben exactamente, pero se sabe que una de las causas para su desarrollo está asociado al gen *FMR1*.^{18,36} En diferentes estudios realizados, se comprobó que las personas portadoras de la premutación y del alelo ZG en el gen *FMR1* tienen una mayor probabilidad a manifestar FOP.³⁷

Esta teoría concuerda con nuestros resultados, ya que a un 6,5% de las mujeres que se les realizó la prueba de X frágil por sospecha de FOP (POI) presentaban la mutación ZG (45 a 54 repeticiones) en el gen *FMR1*. Sin embargo, destacó que no se detectara a ninguna mujer con este problema en la zona de premutación, ya que como se ha comentado anteriormente este rango suele haber bastante prevalencia a desarrollar FOP. No se saben las causas fisiopatológicas exactas de la FOP relacionada con el síndrome de X frágil, se piensa que la ganancia de función de la FMRP en los ovarios de las personas con la premutación conduce a un fallo ovárico precoz.³⁹ Según la bibliografía, algunos estudios demuestran que un número de repeticiones bajo puede tener implicaciones graves a nivel clínico.³⁸ De esta manera, se podría dar explicación a la alta prevalencia de mujeres con FOP que presentan repeticiones en el rango ZG o inferior. Por otra parte, se ha determinado que los portadores de la mutación completa no parece que tengan riesgo a padecer esta condición.³⁵ Con esta información se puede llegar a revisar desde donde empieza el rango de zona gris en este gen. Además, determinar la presencia de zona gris o premutación en aquellas mujeres con FOP ayudaría a la hora de asesoramiento genético, porque estas mujeres tienen riesgo a expandir esta mutación a su prole.

Trastornos asociados a la mutación completa del gen FMR1

La expansión del trinucleótido CGG por encima de 200 repeticiones en la región no codificante del gen *FMR1* es responsable de desarrollar trastornos asociados al cromosoma X.

Según la bibliografía, los principales motivos de sospecha de SXF son la presencia de discapacidad intelectual, retraso psicomotor, TDH y TEA; además de características fenotípicas características.⁴¹

Tanto la discapacidad intelectual (DI) como el TEA como el TDH son las formas más comunes de manifestación de una gran expansión del trinucleótido CGG. La DI es una condición donde los afectados están limitados en el aprendizaje de diferentes habilidades; mientras que el TEA es una condición más compleja que afecta de diferente manera a cada persona. Se caracterizan porque interpretan la información de manera diferente, provocándoles muchas veces problemas sociales y conductuales, además de dificultades al comunicarse.⁴² Por otro lado, las personas con trastorno de hiperactividad les cuesta prestar atención y controlar las conductas impulsivas. Suelen ser muy activos y muchas veces actúan sin pensar en cuáles serán las consecuencias.⁴² Por último, el retraso psicomotor (RPM) se diagnostica a aquellos niños que no han desarrollado los logros que deberían desarrollar a una determinada edad.

Una vez realizado nuestro estudio relacionando los motivos por los cuales se realizó la prueba de X frágil y el resultado de la prueba. Nuestros datos reportados sobre las condiciones asociadas a la mutación completa coinciden con la bibliografía, ésta fueron el RMP (0,7%),

TDH (0,8%) y DI (0,4%). Por el contrario, el TEA por sí solo no, únicamente si está asociado a alguno de estos trastornos. Estos resultados sugieren que únicamente se debería realizar la prueba diagnóstica del SXF a aquellos pacientes con TEA siempre que vaya acompañada de otra de las condiciones anteriormente comentadas.

Relación del sexo

Muchos estudios sobre esta patología han ido enfocados en la investigación por separado de géneros, pudiendo causar problemas a la hora de estimar las prevalencias entre sexos. Se ha visto que hay un mayor número de personas afectadas por la mutación en hombres (1:4000) que en mujeres (1:6000), con una relación 3:1, al igual que las premutaciones 1:500 y 1:250, respectivamente. Respecto a la zona gris, se ha encontrado que en la población de mujeres se encuentran en una mayor proporción (1,2 mujeres a 1 hombre).^{32,43} Esta información corrobora nuestros datos, donde muestra una mayor prevalencia de zona gris y premutación en mujeres respecto a los hombres (3,4% mujeres : 1,6% hombres y 0,7% mujeres : 0,1% hombres, respectivamente). Sin embargo, la proporción de mutaciones completas entre ambos sexos es la misma. Realizando el test estadístico de independencia sobre nuestros datos, se ha observado con un nivel de confianza del 95% (p -valor=0,003) que hay relación entre el sexo y el tipo de alelo que presenta la persona.

CONCLUSIONES

El síndrome de X frágil es la enfermedad hereditaria más común de trastornos neuroconductuales y psicomotor, es por este motivo el interés de este estudio de determinar su prevalencia en la población de las Islas Baleares. Basándonos en los resultados de nuestro estudio, concluimos:

1. La elevada prevalencia de premutaciones en nuestra población general respecto a otras poblaciones podría ser un motivo de la necesidad de implantar un cribado prenatal a mujeres embarazadas.
2. Que la prevalencia de tener la premutación en el gen *FMR1* no está directamente relacionado con ninguno de los diferentes trastornos estudiados (DI, RPM, TEA, TDAH, FXTAS...,etc).
3. Tanto el RPM, TDH y DI son los trastornos que mayor porcentaje de mutaciones completas presentan; y el TEA únicamente si está asociado a uno de estos tres trastornos.
4. Las mujeres con FOP presentan un mayor porcentaje de alelo ZG que del premutado.
5. Hay diferencias significativas que relacionan el sexo con el tipo alelo. Siendo las mujeres las que presentan mayor proporción de ZG y premutaciones. Sin embargo la proporción de mutaciones completas en ambos sexos es la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ, Martínez-Cerdeño V. Fragile x associated tremor/ataxia syndrome: Its clinical presentation, pathology, and treatment. *Rev Neurol*. 2019;68(5):199-206. doi:10.33588/rn.6805.2018457
2. Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genet Med*. 2001;3(5):359-371. doi:10.1097/00125817-200109000-00006
3. ¿Qué es el Síndrome X Frágil? - Asociación Síndrome X Frágil de Madrid. Accedido mayo 24, 2022. <http://www.xfragil.net/x-fragil/>
4. What is Fragile X Syndrome? • Fragile X Research - FRAXA Research Foundation. Accedido mayo 24, 2022. <https://www.fraxa.org/fragile-x-syndrome/cause/>
5. Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ, Martínez-Cerdeño V. Síndrome X frágil: presentación clínica, patología y tratamiento. *Gac Med Mex*. 2020;156(1):60-66. doi:10.24875/GMM.19005275
6. Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, Neri G. Transcriptional reactivation of the FMR1 Gene. A possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. *Genes (Basel)*. 2016;7(8). doi:10.3390/genes7080049
7. Yang D, Ren X, Lu Y, Han J. Current diagnosis and management of rare pediatric diseases in China. *Intractable Rare Dis Res*. 2021;10(4):223-237. doi:10.5582/irdr.2021.01134
8. Glóver-López G, Guillén-Navarro E. Síndrome X frágil. *Rev Neurol*. 2006;42(SUPPL.1). doi:10.33588/rn.42s01.2005735
9. Julia Bell (1879-1979) | The Embryo Project Encyclopedia. Accedido mayo 25, 2022. <https://embryo.asu.edu/pages/julia-bell-1879-1979>
10. Barasoain M, Barrenetxea G, Huerta I, Télez M, Criado B, Arrieta I. Study of the genetic etiology of primary ovarian insufficiency: FMR1 gene. *Genes (Basel)*. 2016;7(12). doi:10.3390/genes7120123
11. Pop AS, Gomez-Mancilla B, Neri G, Willemsen R, Gasparini F. Fragile X syndrome: A preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(6):1217-1226. doi:10.1007/s00213-013-3330-3
12. Warner JP, Barron LH, Goudie D, et al. A general method for the detection of large GAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*. 1996;33(12):1022-1026. doi:10.1136/jmg.33.12.1022
13. Gutiérrez JF, Bajaj K, Klugman SD. Prenatal screening for fragile x: carriers, controversies, and counseling. *Rev Obstet Gynecol*. 2013;6(1):e1-7. doi:10.3909/riog0203
14. Mingarro Castillo M, Ejarque Doménech I, García Moreno A, Aras Portilla LM. Síndrome del cromosoma X frágil. *REV CLÍN MED FAM*. 2017;10(1):54-57. Accedido mayo 25, 2022. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2017000100011
15. Eichler EE, Holden JJA, Popovich BW, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet*. 1994;8(1):88-94. doi:10.1038/ng0994-88
16. Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, Neri G. Transcriptional reactivation of the FMR1 Gene. A possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. *Genes (Basel)*. 2016;7(8):20894. doi:10.3390/genes7080049
17. Pocoví M, José M, González I, Adrián HA, Laleona M. Estudios sobre la población X-frágil en Aragón. Published online 2016.
18. Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genet Med*. 2001;3(5):359-371. doi:10.1097/00125817-200109000-00006
19. (803) Investigación actual y desarrollo de un medicamento huérfano pediátrico para el Síndrome X Frágil. - YouTube. Accedido mayo 25, 2022. <https://www.youtube.com/watch?v=oo0G8T9zB6Q>
20. Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ, Martínez-Cerdeño V. Fragile x associated tremor/ataxia syndrome: Its clinical presentation, pathology, and treatment. *Rev Neurol*. 2019;68(5):199-206. doi:10.33588/rn.6805.2018457
21. Ciaccio C, Fontana L, Milani D, Tabano S, Miozzo M, Esposito S. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Ital J Pediatr*. 2017;43(1). doi:10.1186/s13052-017-0355-y
22. 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*. 1991;325(24):1673-1681. doi:10.1056/nejm199112123252401
23. Lyon E, Laver T, Yu P, et al. A simple, high-throughput assay for fragile X expanded alleles using triple repeat primed PCR and capillary electrophoresis. *J Mol Diagnostics*. 2010;12(4):505-511.

- doi:10.2353/jmoldx.2010.090229
24. Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez JP. Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico del síndrome X-frágil. *Gac Med Mex.* 2003;139(4):413-414.
 25. Hayward BE, Kumari D, Usdin K. Recent advances in assays for the fragile X-related disorders. *Hum Genet.* 2017;136(10):1313-1327. doi:10.1007/s00439-017-1840-5
 26. Diagnóstico X Frágil | RAFER S.L. Accedido mayo 25, 2022. <https://www.rafer.es/diagnostico-clinico-genetica-neurologia/diagnostico-x-fragil>
 27. ¿Cómo diagnostican los médicos el síndrome del X frágil? | NICHD Español. Accedido mayo 25, 2022. <https://espanol.nichd.nih.gov/salud/temas/fragilex/informacion/diagnostica>
 28. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-425. doi:10.1038/ejhg.2014.185
 29. Estudio genético del X frágil | Lab Tests Online-ES. Accedido mayo 25, 2022. <https://labtestsonline.es/tests/estudio-genetico-del-x-fragil>
 30. Whole genome sequencing robustly detects the most common inherited neurological diseases and is adopted by healthcare. <https://www.streetinsider.com/PRNewswire/Whole+genome+sequencing+robustly+detects+the+most+common+inherited+neurological+diseases+and+is+adopted+by+healthcare/19636023.html>. Accedido mayo 25, 2022.
 31. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):234-245. doi:10.1016/S1474-4422(21)00462-2
 32. Seltzer MM, Baker MW, Hong J, Maenner M, Greenberg J, Mandel D. Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2012;159 B(5):589-597. doi:10.1002/ajmg.b.32065
 33. Johnson K, Herring J, Richstein J. Fragile X Premutation Associated Conditions (FXPAC). *Front Pediatr.* 2020;8:266. doi:10.3389/FPED.2020.00266
 34. Movaghar A, Page D, Brilliant M, et al. Data-driven phenotype discovery of FMR1 premutation carriers in a population-based sample. *Sci Adv.* 2019;5(8). doi:10.1126/sciadv.aaw7195
 35. Rousseau F, Labelle Y, Bussièrès J, Lindsay C. The fragile X mental retardation syndrome 20 years after the FMR1 gene discovery: An expanding universe of knowledge. *Clin Biochem Rev.* 2011;32(3):135-162. Accedido junio 7, 2022. [/pmc/articles/PMC3157949/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2157949/)
 36. Napoli E, McLennan YA, Schneider A, Tassone F, Hagerman RJ, Giulivi C. Characterization of the Metabolic, Clinical and Neuropsychological Phenotype of Female Carriers of the Premutation in the X-Linked FMR1 Gene. *Front Mol Biosci.* 2020;7. doi:10.3389/fmolb.2020.578640
 37. Karimov CB, Moragianni VA, Cronister A, et al. Increased frequency of occult fragile X-associated primary ovarian insufficiency in infertile women with evidence of impaired ovarian function. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2077-2083. doi:10.1093/humrep/der168
 38. Ciaccio C, Fontana L, Milani D, Tabano S, Miozzo M, Esposito S. Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Ital J Pediatr.* 2017;43(1). doi:10.1186/s13052-017-0355-y
 39. Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: The international collaborative POF in fragile X study - Preliminary data. *Am J Med Genet.* 1999;83(4):322-325. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19990402)83:4<322::AID-AJMG17>3.0.CO;2-B
 40. Bodega B, Bione S, Dalprà L, et al. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod.* 2006;21(4):952-957. doi:10.1093/humrep/dei432
 41. Ormazábal M, Solari A, Espeche L, Castro T, Buzzalino N. Fragile X syndrome and other entities associated with the FMR1 gene: Study of 28 affected families. *Arch Argent Pediatr.* 2019;117(3):E257-E262. doi:10.5546/aap.2019.e257
 42. Problemas relacionados con el síndrome del cromosoma X frágil | CDC. Accedido junio 8, 2022. <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/fxs/relatedconcerns.html>
 43. Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet Part A.* 2014;164(7):1648-1658. doi:10.1002/ajmg.a.36511