

GENETICA Y EPIDEMIOLOGÍA **DEL SINDROME X FRAGIL.**

M^a Isabel TEJADA MINGUEZ

Dra. en Biología Humana.

Genetista Clínico.

**Asesora Científica y Consejera de la
Federación Española del Síndrome
X Frágil.**

**Coordinadora de la Red Estatal de
Investigación en Retraso Mental de
Origen Genético.**

**HOSPITAL DE BASURTO
BILBAO**

PONENCIA PRESENTADA EN:

**2^a JORNADA DE LA ASOCIACION SINDROME X
FRAGIL DEL PAIS VASCO**

Y

**1^a JORNADA DEL SINDROME X FRAGIL EN LA
RIOJA.**

INTRODUCCION

Han pasado casi 25 años desde que se descubriera por métodos citogenéticos el **SÍNDROME X FRAGIL (SXF)** (1) 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.**

1.- ¿Por qué se llama así?

En realidad el tema es todavía más antiguo que 25 años: En los años 60 se desarrollaron las técnicas citogenéticas para estudiar **los cromosomas ordenados**, lo que llamamos **cariotipo**. Pues bien, en 1969, Lubs observó en una familia con chicos con RM, que éstos presentaban en su cariotipo lo que él llamó un "**cromosoma X marcador**" (2), pero no supo asociarlo a la clínica de esos pacientes. Diez años más tarde un australiano, Sutherland, descubre lo que llamó "**sitios frágiles de los cromosomas**", que son pequeñas roturas - que no llegan a serlo, de ahí el nombre "frágil"- que se obtienen no en el cariotipo convencional, sino empleando cultivos de linfocitos en medios deficientes en ácido fólico (1). Entre ellos, el sitio frágil situado en la banda q27.3 del cromosoma X sólo se obtenía en chicos con un RM semejante al descrito previamente por Martin y Bell (3) y que presentaban los varones de la familia de Lubs. Esta asociación entre un Síndrome previamente descrito con ese sitio frágil en el cromosoma X, dio el nombre al **Síndrome X Frágil**.

El estudio del cariotipo (no el convencional insisto, sino el especial en medios pobres de ácido fólico como ya hemos dicho) 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, numerosos estudios como mi propia Tesis Doctoral (4) pusieron de manifiesto:

- Que existía una gran dificultad técnica con esos métodos, por 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 esta técnica de una forma fiable y segura para el Diagnóstico Prenatal.

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

2.- ¿Cuál es la Clínica o Fenotipo del SXF?

No voy a entrar a fondo en este tema porque mi campo no es el clínico, pero sí creo importante remarcar que **la clínica ya clásica del SXF**, descrita en 1943 por Martin y Bell (3) y que asocia básicamente el RM en varones con cara alargada, orejas grandes y despegadas y macroorquidia o aumento del tamaño testicular, **es la clínica del varón**

postpuberal. En el niño por debajo de 12 años, las manifestaciones clínicas están muy atenuadas, no pudiéndose diagnosticar por el fenotipo físico y mucho menos al nacimiento. Un 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, deambulaci3n hacia los 18 meses, lenguaje hacia los dos a3os 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 (5), 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.

La siguiente Tabla nos resume las principales características del SXF:

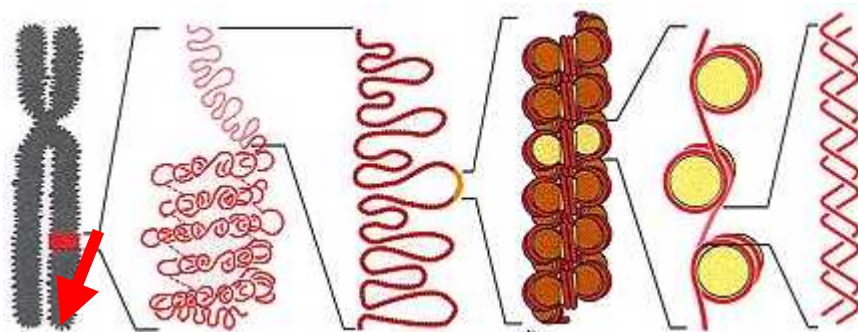
<u>HALLAZGOS FÍSICOS</u>	<u>DISCAPACIDAD PSÍQUICA</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Macrocefalia • Frente amplia • Cara alargada • Orejas despegadas • Ment3n prominente • Paladar ojival • Hiperlaxitud articular • Macroorquidia 	<ul style="list-style-type: none"> • Retraso de lenguaje • Hiperactividad • Déficit de atenci3n • Dificultad de aprendizaje • Conductas autistas • Timidez • Aleteo de manos • RETRASO MENTAL

3.- La alteraci3n molecular en el SXF: El gen FMR1.

A finales de la d3cada de los 80, el inicio del Proyecto Genoma Humano supuso un hito en el descubrimiento de los genes de las enfermedades hereditarias más frecuentes. Y así, en 1991, tres grupos simultáneamente (6,7,8) describen el defecto molecular que origina el SXF, que es **una alteraci3n en el gen FMR1, situado en el locus FRAXA, en la parte distal del brazo largo del cromosoma X.**

¿C3mo explicamos todo esto? Pues bien, la mol3cula de la herencia o **ADN** est3 enrollada o condensada en los cromosomas. De los 46 que tenemos, dos son los llamados sexuales, **el X y el Y**: la mujer tiene dos cromosomas X morfol3gicamente iguales y el hombre un X y un Y. En el ADN est3n los **genes**, que por lo tanto estar3n

distribuidos a lo largo de todos los cromosomas. Pues bien, en el extremo terminal del cromosoma X en un sitio que llamamos “locus FRAXA” se encuentra el gen cuya alteración produce el SXF: **el gen FMR1**.



ESQUEMA DE DONDE SE SITUA, Y DE CÓMO SE ENROLLAN EL ADN Y UN GEN EN UN CROMOSOMA (Para el gen FMR1 sería igual, sólo que situado en el extremo que señala la flecha del cromosoma X)

La mutación o alteración molecular del gen FMR1 responsable del SXF, consiste en **una expansión anómala de un triplete CGG** situado al inicio del gen FMR1, que se acompaña a partir de un cierto número de repeticiones de una hipermetilación de una isla CpG adyacente al gen FMR-1, que a su vez produce **la inactivación del gen**. Este mecanismo mutacional supuso, en el inicio de la década de los 90, un gran descubrimiento, ya que fue la primera enfermedad genética 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.

Inicialmente se consideraba que el SXF era una enfermedad recesiva ligada al X, o sea con varones afectados 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. Hoy día se sabe que 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 (9). Por ello, hoy día se considera al SXF como **una enfermedad dominante con penetrancia incompleta**.

Vamos a explicar esto con mas detalle: hay que empezar diciendo que 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.
- Cuando el número de repeticiones se sitúa **entre 50-60 y unas 200** el individuo no manifiesta alteraciones fenotípicas pero 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, tienen en cambio riesgo

de tener descendencia con el Síndrome. Es importante aquí señalar que **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 y el cromosoma X se transmite igual a su descendencia, por lo que todas las hijas serán también portadoras premutadas y por lo tanto sanas. En las mujeres premutadas en cambio, al 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 se inactiva y pasa al estado de **mutación completa**, con las características fenotípicas del SXF descritas en los hombres, más atenuadas en mujeres.

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 menos del 5% de los casos. **En más del 95% de los casos de SXF, la causa ha sido la amplificación anómala del triplete CGG.**

4.- La Fisiopatología del SXF.

El gran dogma de la Genética es que **un GEN produce una PROTEÍNA** y será ésta la que provea al organismo de la función o de la estructura necesaria para su buen funcionamiento. Pues bien, EL gen FMR1 codifica en individuos normales **una proteína, llamada FMRP** que se encuentra ausente o muy disminuida en los individuos afectados, debido a la hipermetilación o inactivación del gen.

¿Qué función tiene esa proteína para que su ausencia produzca manifestaciones clínicas tan diversas? Hoy día se sabe que la FMRP es una proteína ubicuitaria, que se expresa en diferentes tejidos, y que, 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 (10), de ahí que su ausencia provoque que otras proteínas no lleguen a su sitio adecuado y por lo tanto no funcionen. Podríamos compararlo a un camión de transporte que se avería y su cargamento no llega al mercado: la avería es sólo una, pero el mercado se queda sin varios productos; de la misma manera, el gen mutado FMR1 es uno sólo, pero 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 todas las mujeres, de los dos cromosomas X que tenemos tan sólo uno de ellos funciona y está activo; el segundo cromosoma X se inactiva al azar. Lo mismo pasa en las mujeres con la mutación completa y, en ellas, la afectación será mayor o menor dependiendo por lo tanto de cual sea el cromosoma X que quede activo en los tejidos diana (por ejemplo en el cerebro).

5.- Nuestra experiencia a lo largo de 12 años de trabajo.

En la Unidad de Genética del Hospital de Basurto, tuvimos la oportunidad de conseguir la sonda necesaria para el estudio molecular directo del gen FMR1 nada más se descubrió el mismo en el año 1991, por lo que, desde esa fecha y hasta la actualidad, chequeamos rutinariamente la mutación del triplete CGG en todos los pacientes con RM no filiado que llegan a nuestro laboratorio. Todo nuestro trabajo se ha realizado fundamentalmente a partir de diversas subvenciones de investigación, tanto del FIS (Ministerio de Sanidad y Consumo) como del Gobierno Vasco, con lo que hemos conseguido poner a punto y extender el diagnóstico a casi todo el Norte de España, así como abordar el estudio sistemático del Retraso Mental no filiado en dos asociaciones de discapacitados mentales: GORABIDE en Bizkaia y ULIAZPI en Guipúzcoa. Ahora además, para los próximos tres años hemos conseguido un nuevo Proyecto del FIS para estudiar la fisiopatología del Síndrome en mujeres. Desde el punto de vista asistencial, desde 1999 y hasta la actualidad, es Osakidetza quien asume el costo del diagnóstico del SXF como rutina, recibiendo la mayoría de las peticiones para estudio molecular del SXF que se generan en las Comunidades Autónomas de **Cantabria, La Rioja, y el País Vasco**, y siendo centro de referencia para **Asturias y Navarra**.

Desde el punto de vista técnico del diagnóstico, inicialmente la única técnica molecular 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 y detección por métodos quimioluminiscentes (11). Con esta técnica publicamos ya en el año 92 nuestras primeras 11 familias estudiadas (12). 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 que hemos descrito previamente. 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 como el estudio por Southern es largo costoso y laborioso, para la rutina diagnóstica había que buscar e investigar otros métodos, lo que hicimos gracias a una de esas subvenciones de investigación mencionadas. A lo largo de cuatro años estudiamos la puesta a punto de técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que son mucho más rápidas y sencillas y fruto de estas investigaciones se leyó una Tesis Doctoral (13).

6.- Epidemiología.

Si todo lo que hemos explicado hasta aquí se refiriera a una enfermedad poco frecuente, sería muy interesante pero quizás, de no mucha incidencia social y sanitaria. Pero hemos empezado diciendo que el SXF es el más frecuente de RM hereditario, y vamos a ver numéricamente cómo nuestros resultados corroboran tal afirmación.

La **Tabla 1** muestra nuestros hallazgos en estos 12 años, desde el 91 hasta el 2002, ambos incluidos; la **Tabla 2** nos muestra la distribución de la demanda y Resultados por Comunidades Autónomas. Y la **Tabla 3** muestra la clasificación de todos los individuos estudiados en las familias X Frágil. Vemos por la tanto que llevamos estudiadas **86**

Familias y, en ellas 675 individuos, lo que nos da una media de casi 8 familiares estudiados por familia.

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

AÑOS	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Casos sin SXF	4	14	55	90	85	80	58	46	48	73	189	220
Casos con SXF	11	4	9	9	11	3	6	4	8	5	8	8
TOTAL de Casos	15	18	64	99	96	83	64	50	56	78	197	228
% de SXF sobre el TOTAL	73.3	22.2	14.1	9.1	11.4	3.6	9.3	8	14.2	6.4	4.1	3.5

TABLA 2: Distribución de la demanda y Resultados por Comunidades Autónomas.

Comunidades Autónomas	Nº Total de casos estudiados	Nº de Familias SXF	%
Guipúzcoa	139	11	7.91
Basurto	242	23	9.50
Txagorritxu	63	4	6.34
Cruces	186	7	3.76
<u>País Vasco</u>	<u>630</u>	<u>45</u>	<u>7.14</u>
Navarra	62	9	14.5
Asturias	97	19	19.6
Cantabria	133	8	6.01
La Rioja	109	5	4.58
Otros	17	0	0
<u>Total</u>	<u>1.048</u>	<u>86</u>	<u>8.20</u>

TABLA 3: Clasificación de los 675 individuos estudiados de las 86 familias transmisoras del SXF en función de la expansión del triplete CGG.

	<i>FM</i>	<i>PM</i>	<i>Mos</i>	<i>Total portadores</i>	<i>Familiares Normales</i>	<i>TOTAL</i>
<i>Varones</i>	98	17	22	137	146	283
<i>Mujeres</i>	83	148	8	239	153	392
<i>TOTAL</i>	181	165	30	376	299	675

Otro dato importante a resaltar, además de lo que ya se ve en las Tablas, es **la media de edad de detección de los casos índice (C.I.) con SXF, porque es nada menos que 15 años**. Esto quiere decir que muchas 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 aparecen familiares que se asesoran para futuros embarazos, etc., pero en menor proporción en las consultas de Pediatría. Al observar la **Tabla 3**, vemos que hay más de 2 individuos con la mutación completa por familia (181/86), lo que quiere decir que, si hubiéramos diagnosticado esos C.I. antes, hubiéramos podido prevenir la aparición de otros casos familiares.

Si nos fijamos en la **Tabla 1**, vemos que en los dos últimos años hemos tenido **un aumento importante de la demanda del diagnóstico del SXF**, debido con toda seguridad a las diversas Jornadas y campañas de divulgación organizadas por las diversas Asociaciones Síndrome X Frágil, aunque a su vez con ello se ha **bajado el porcentaje de detección**. Esto podría ser debido a que estamos casi "tocando techo" en el diagnóstico, es decir, con la mayoría de las familias ya estudiadas y detectando por lo tanto **los casos nuevos**, de niños pequeños que vienen de los Pediatras. Sin embargo, ni nuestra propia experiencia (el último caso que hemos diagnosticado tiene 3 chicos con RM en la familia que nadie había detectado) ni los datos de Prevalencia corroboran el que se esté en el límite del número de diagnósticos.

No se ha realizado en nuestra zona un estudio de Prevalencia, ni la podemos estimar debido a las grandes diferencias de cobertura en las Comunidades Autónomas que estudiamos, pero se acepta desde hace unos años que universalmente el SXF afecta a 1 sobre 4000 o 5000 varones (14). Un excelente estudio realizado en Valencia (15) 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 que estudiamos (Tabla 2), debería haber unos 350 con el SXF. Sin embargo, **llevamos estudiados 120 (Tabla 3, contando FM o mutación completa + Mosaicos), o sea la tercera parte**. No hay duda por lo tanto de que nos queda todavía un largo camino por recorrer, en el que, **el papel del Diagnóstico Precoz es esencial para, la estimulación y mejora de estos niños y para la Prevención**. Esperamos que Jornadas como estas sirvan para cumplir con estos fines.

7.- Bibliografía.

1. Southerland GR. *Marker X chromosomes and mental retardation*. N Engl J Med 296, 1415. 1977.
2. Lubs HA. *A marker X chromosome*. Am J Hum Genet 21, 231-244. 1969.
3. Martin JP and Bell J. *A pedigree of mental defect showing sex-linkage*. J Neurol Psychiatr 6, 154-157. 1943.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Yu S, Pritchard M, Kremer E, et al. *Fragile X syndrome characterized by an unstable region of DNA*. Science 252, 1179-1181. 1991.
9. 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.
10. Khandjian EW. *Biology of the fragile X mental retardation protein, an RNA-binding protein*. Biochem Cell Biol, 77, 331-342. 1999.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Turner G, Webb T, Wake S, et al. *Prevalence of the Fragile X Syndrome*. Am J Med Genet 64, 196-197. 1996.
15. 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.