

DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME X FRÁGIL

Resumen. El síndrome X frágil (SXF) constituye la mayor causa de retraso mental hereditario. Hasta fechas recientes se han diagnosticado síndromes X frágil sólo en pacientes con afectación clínica, sin que haya sido posible detectar los portadores asintomáticos. Una vez resueltos los problemas de la inducción específica de la fragilidad cromosómica, fue posible confirmar el diagnóstico clínico de los pacientes así como detectar portadores asintomáticos. Pero el descubrimiento del gen FMR1 ha llevado al conocimiento, de manera fidedigna, del estado genético de cualquier individuo respecto al síndrome X frágil, independientemente de que pertenezca a una familia de afectados o no. A este respecto se puede utilizar una combinación de técnicas moleculares y citogenéticas para detectar expansiones en la región repetitiva del gen FMR1. Se encuentran tres clases de alelos: normal con 5-60 repeticiones premutado con 60-200 repeticiones CGG, y mutaciones completas con expansiones mayores de 200 repeticiones. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S6-9]

Palabras clave. Cariotipo. Gen FMR1. PCR. Repetición del triplete CGG. Síndrome X frágil. Sitio Xq27.3. Southern blot.

DIAGNÓSTICO DA SÍNDROMA X FRÁGIL

Resumo. A síndrome X frágil (SXF) constitui a principal causa de atraso mental hereditário. Historicamente, a síndrome do X frágil (SXF) foi diagnosticada primeiro em doentes sintomáticos apenas, não sendo possível diagnosticar portadores assintomáticos. Depois de resolvido o problema de induzir especificamente a fragilidade cromossômica, também foi possível confirmar doentes diagnosticados clinicamente e detectar alguns dos portadores assintomáticos. Mas a descoberta do gene FMR1 permitiu conhecer, com confiança, o status genético de qualquer um respeito à síndrome do X frágil, independentemente de pertencer ou não a uma família portadora de X frágil. A este respeito, deve ser utilizada a combinação de técnicas moleculares e citogenéticas para detectar a expansão na região de repetição do gene FMR1. Foram encontradas três classes de alelos: normais com 5-60 repetições, pré-mutados com repetições entre 60 e 200 repetições CGG e completamente mutados com uma expansão superior às 200 repetições. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S6-9]

Palavras chave. Cariotipo. Gene FMR1. PCR. Síndrome X frágil. Repetição do triplete CGG. Sítio frágil Xq27.3. Southern blot.

Nuevos métodos de diagnóstico del síndrome X frágil: estudio de la FMRP en sangre y pelo

F.J. Ramos-Fuentes

NEW METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF FRAGILE X SYNDROME: A STUDY OF THE FMRP IN BLOOD AND HAIR

Summary. Introduction. Fragile X syndrome (FXS) is the commonest cause of hereditary mental retardation. Although most affected patients, especially males, have a typical phenotype, molecular studies of the FMR1 gene are necessary to confirm the diagnosis, depending on the number of repeats of the CGG triplet of the gene. Development. In recent years an immunohistochemical technique has been developed which permits the study of the expression of the protein codified by the FMR1 gene, known as FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein). This was done initially in peripheral blood lymphocytes and more recently in hair roots, thus permitting definite identification of males affected by FXS. The advantages of this technique compared with conventional molecular studies are speed (results available in a few hours), lower cost and ease of sample obtention, that in the case of hair roots is non-invasive. The affected males had significant lower levels of FMRP expression than normal or non fragile X males, without overlapping. This finding was observed in blood and hair roots. In females, interpretation is more difficult due to random inactivation of one of the X chromosomes. However, preliminary studies have shown that the level of FMRP expression in hair roots of females with the full mutation (usually with some degree of mental retardation) is significantly lower when compared to premutation carriers or normal females. Conclusion. The FMRP test, either in blood or hair, is an easy, cost-effective method for screening FXS in males with idiopathic mental retardation. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S9-13]

Key words. Blood. FMRP expression. Fragile X syndrome. Hair roots.

INTRODUCCIÓN

El síndrome X frágil (SXF) es actualmente la primera causa de retraso mental hereditario, que afecta aproximadamente a uno de cada 4.000 varones y a una de cada 6.000 mujeres de la población general [1]. Su descubrimiento como entidad nosológica independiente se debió al Dr. Lubs, quien en 1969 describió la existencia de una anomalía cromosómica en varios individuos con retraso mental pertenecientes a una misma familia [2]. La anomalía, similar en todos los afectados, consistía en la 'rotura' del extremo distal del brazo largo del cromosoma X, al cual denominó 'marcador X',

nombre inicial de lo que posteriormente se transformó en 'fragilidad X' o su apócope 'frágil X', que finalmente se consolidó dando nombre al síndrome que todos conocemos hoy.

Durante más de 10 años (1979-1991), el estudio cromosómico (cariotipo) fue la prueba de laboratorio de elección para confirmar el diagnóstico clínico [3]. La existencia de <4% de metafases con un cromosoma X frágil se consideraba un test positivo en varones (afectados); en las mujeres portadoras, este último se mostraba menos sensible y en ocasiones no se encontraba fragilidad en ninguna metafase. Esto, junto con las dificultades técnicas del cultivo celular con medios pobres en ácido fólico, eran los dos principales inconvenientes del estudio cromosómico como método de diagnóstico del SXF.

En mayo de 1991, varios grupos de investigadores consiguieron identificar la mutación génica causante del SXF. La mutación se encontraba en un gen situado en la región Xq27.3, la misma donde se localizaba la fragilidad del cromosoma X en el cariotipo, que denominaron FMR1 (del inglés, *Fragile-X Mental Retarda-*

Recibido: 07.09.01. Aceptado: 08.10.01.

Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.

Correspondencia: Dr. Feliciano J. Ramos Fuentes. Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza. Domingo Miral, s/n. E-50009 Zaragoza. E-mail: f.ramos@posta.unizar.es

© 2001, REVISTADENEUROLOGÍA

tion 1) [4]. La mutación consistía en la expansión anómala (excesiva) de un trinucleótido repetitivo –CGG– en el primer exón del gen [5]. Los estudios posteriores en poblaciones de riesgo y controles confirmaron que los alelos de individuos normales contenían <50 CGG; los de portadores y portadoras, entre 50 y 200 CGG (premutación), y los de afectados, >200 CGG (mutación completa). En estos últimos, el grado de afectación físico y mental no guardaba correlación con el número de repeticiones del gen [6]. La mutación completa se encuentra en todos los varones con SXF y retraso mental, mientras que sólo alrededor de un 65% de mujeres con mutación completa presentan déficit intelectual. Otro dato interesante es que aproximadamente un 40% de individuos con mutación completa son también portadores de células con premutación, es decir, son mosaicos [7]. Desde su descubrimiento y hasta la fecha, el estudio molecular del ADN constituye el método de elección para el diagnóstico del SXF, empleándose las técnicas de *Southern Blot* o PCR, con las que se cuantifica el número de CGG y el estado de metilación del gen *FMR1* [8]. La metilación da lugar a una inactivación completa del gen que impide la síntesis de la proteína correspondiente.

En 1993 se identificó la proteína del gen *FMR1*, denominada FMRP (del inglés, *Fragile X Mental Retardation Protein*), cuya ausencia es la causa del cuadro clínico del SXF [9]. Los estudios iniciales de la FMRP con *Western Blot* en líneas celulares linfoblastoides demostraron que los individuos con mutación completa del gen *FMR1* carecían de FMRP, mientras que los varones con premutación expresaban niveles normales de FMRP [10].

La FMRP es una proteína con afinidad por el ARN, al que se une en su subunidad ribosomal de 60S. Se localiza fundamentalmente en el citoplasma celular, pero también se ha localizado en el nucléolo. Aunque la función de la FMRP no se ha aclarado completamente, parece que su ausencia altera los mecanismos de traslación de otras proteínas presuntamente implicadas en el complejo fenotipo del SXF.

En individuos con mutación completa, la presencia de células con el gen *FMR1* no metilado permite la expresión parcial de la FMRP. En varones, esta situación la presentan los que son mosaicos (con un pequeño porcentaje de células portadoras de premutación) o los que tienen una mutación completa parcialmente metilada. En las mujeres con mutación completa, el alelo con el gen *FMR1* normal da lugar a que se exprese la FMRP en las células en las que dicho gen normal está en el cromosoma X activo [11].

FMRP EN SANGRE

En 1995, Willemsen et al, de la Universidad de Erasmus, en Rotterdam, publicaron un primer trabajo en el que describieron una nueva y sencilla técnica inmunohistoquímica para estudiar la expresión de la FMRP en células sanguíneas [12]. En dicho trabajo se empleó anticuerpo monoclonal de ratón (1A1) contra la FMRP. La muestra biológica para estudio consistía en una o dos gotas de sangre que se extendían en un portaobjetos. Las células que se cuantificaban eran los linfocitos mononucleares y los resultados podían obtenerse en pocas horas, lo que suponía un importante ahorro de tiempo respecto a las técnicas con ADN. Los autores estudiaron a un grupo control de 100 individuos (70 varones y 30 mujeres) y todos ellos expresaron FMRP. En cada individuo se estudiaron 50 células y todos tenían >96% (48 de 50) de células que expresaban la FMRP [13]. Respecto a los afectados, la expresión oscilaba entre la muy baja (<10%) en los varones con mutación, un 12% de células con FMRP en un varón mosaico y un 60% (30 de 50) en una mujer con mutación completa [12].

Según estos resultados preliminares, no existía superposición entre los varones afectados mosaicos con baja expresión de FMRP y los varones controles normales. En las mujeres, la situación era más compleja debido a la presencia de dos cromosomas X y su inactivación al azar. Las mujeres con mutación completa a menudo muestran un patrón de inactivación alterado en sus linfocitos, en los que el cromosoma X normal está activo. Esos linfocitos expresarían FMRP con el consiguiente riesgo de falsos negativos [12]. El test inmunohistoquímico con anticuerpos no resulta válido para detectar individuos con premutación, ya que el alelo portador tiene una transcripción normal a proteína. En estos casos deben seguir empleándose las técnicas convencionales, como la PCR.

En un estudio posterior, los resultados se confirmaron al estudiar a un mayor número de individuos afectados. Se evaluó a un total de 102 varones, de ellos 69 con mutación completa y retraso mental que mostraron un nivel muy bajo de expresión ($7\% \pm 7$), mientras que los varones normales tenían unos niveles del $89\% \pm 9$. También se incluyó en el estudio a 71 mujeres, 27 normales con un porcentaje de expresión del $80\% \pm 6$, y 44 mujeres con mutación completa y retraso mental que mostraron unos niveles de expresión del $39\% \pm 19$ [14].

Las conclusiones de este estudio confirmaron que el test FMRP en sangre es 'ideal' para el diagnóstico en varones porque discrimina sin ningún solapamiento entre varones normales y afectados (mutación completa y retraso mental). Sin embargo, en mujeres existía un cierto solapamiento entre los porcentajes de los grupos control y las afectadas, aunque ello no invalidará la utilidad diagnóstica intrínseca del test.

Con el fin de utilizar de forma práctica (en la clínica) el test FMRP era útil establecer unos puntos (porcentajes) de corte en el nivel de expresión de la proteína. En varones se estableció en 42% (por debajo, afectado; por encima, no afectado) y en mujeres, 83% (por debajo, afectada; por encima, no afectada). Dichos valores poseen una sensibilidad del 100% en ambos sexos y una especificidad del 100% en varones y 41% en mujeres [14]. Para obtener dichos niveles de sensibilidad y especificidad deben examinarse un mínimo de 80 linfocitos en varones y 50 en mujeres.

Según sus descubridores, la principal aplicación del test FMRP en sangre es el cribado (*screening*) del SXF (varones) en poblaciones de riesgo o incluso en la población general (por ejemplo, recién nacidos). Siguiendo esta premisa, De Vries et al [15] estudiaron a 412 varones con retraso mental de causa no conocida. Todos fueron evaluados clínicamente y a todos se les realizó el estudio molecular del gen *FMR1* para detectar el grado de expansión de CGG. En un primer test FMRP 380 varones (92%) mostraron $\geq 60\%$ células con FMRP, considerándose negativos. Un total de 32 (8%) varones presentaron niveles de expresión <60%, a los cuales se les realizó un segundo test FMRP que demostró similares resultados (>60%) en 28 varones. Los dos varones restantes mostraron un 2 y 3% de expresión, respectivamente. Estos resultados se confirmaron con el estudio molecular, ya que ambos varones tenían >200 CGG en el *FMR1*. Los autores justifican los falsos negativos (n=29) del primer test FMRP con diversos factores tales como almacenamiento de las muestras a -80 °C, problemas con la técnica, experiencia del observador, etc.

La concordancia del test FMRP con los datos clínicos (puntuación Hagerman) y moleculares (*Southern*/PCR) de los individuos estudiados sugiere una muy baja frecuencia (<1%) de otro tipo de mutaciones, aparte de la expansión de CGG en el gen *FMR1* conducentes a una baja o ausente expresión de FMRP [15].

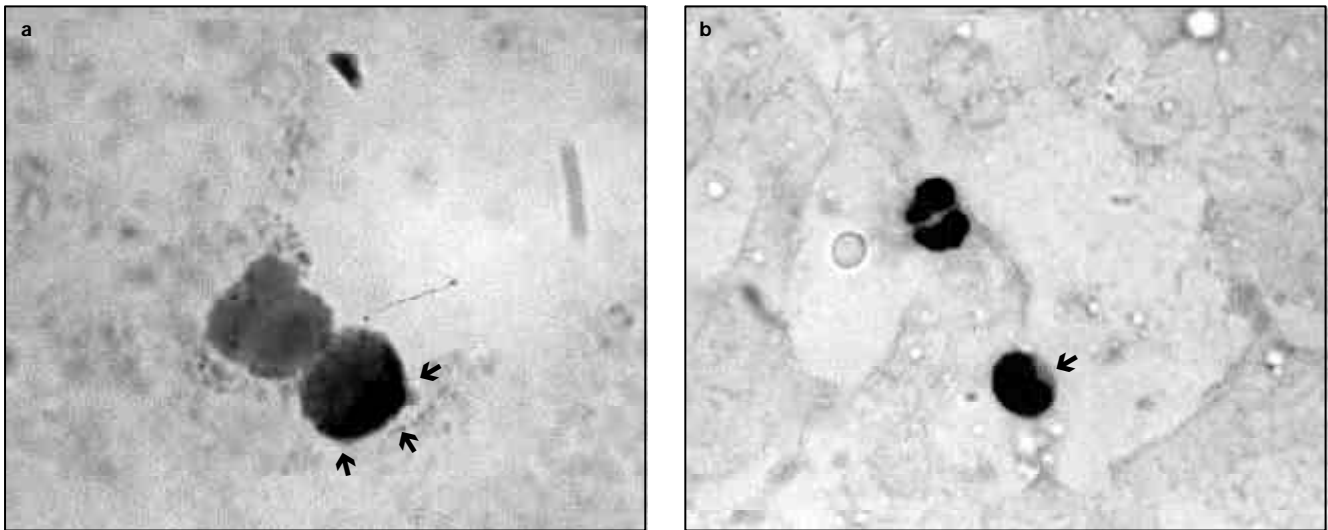


Figura 1. a) Linfocito mononuclear que expresa la FMRP en su citoplasma (color oscuro –color original rojo–) (flechas); b) Linfocito mononuclear de un paciente con SXF en el que la FMRP está ausente del citoplasma (flecha).

Nosotros estudiamos prospectivamente a 70 pacientes varones con retraso mental no aclarado: 68 mostraron un nivel de expresión de FMRP normal (media, 89%) y dos mostraron niveles <1% (hermanos). Los resultados fueron confirmados con *Southern Blot*. También evaluamos a 90 controles varones normales (expresión media, 91%) y 10 varones con SXF (expresión media, 12,5%) [16]. Estos resultados confirman la utilidad del test FMRP como técnica fiable y económica para el cribado del SXF en varones con retraso mental de causa no aclarada (Fig. 1).

Tassone et al estudiaron la expresión de la FMRP en sangre periférica como potencial indicador ‘pronóstico’ en el SXF [13]. Para ello estudiaron a 80 individuos con SXF (61 varones y 19 mujeres). Los resultados del test se compararon con el fenotipo y el CI (cociente intelectual) de cada individuo. Los resultados demostraron la correlación entre el grado de expresión de la FMRP y el CI en varones con mosaico (mutación completa más premutación), varones con mutación completa parcialmente metilada y mujeres con mutación completa. En las mujeres, el grado de expresión FMRP también se correlacionó con el número de hallazgos positivos del fenotipo SXF. Los autores concluyen que el estudio de la expresión de la FMRP en sangre periférica puede tener cierto valor pronóstico en varones con SXF [13].

FMRP EN OTROS TEJIDOS

También la expresión de la FMRP se ha podido estudiar en otros tejidos, lo cual ha servido para añadir conocimiento a la fisiopatología del SXF. Willemsen et al emplearon el test FMRP en tejido fetal (vellosidades coriales) en cuatro embarazos de fetos afectados y en un control [17]. Las muestras se tomaron en la semana 12,5 de gestación y se estudiaron las células citotrofoblásticas. Los fetos afectados carecían de FMRP, mientras que el feto normal la expresaba claramente. Los resultados se confirmaron con el estudio del ADN fetal. Una puntualización importante es que el gen *FMR1* de las vellosidades coriales puede estar infra-metilado en la 11.ª semana de gestación, a diferencia de otros tejidos del feto, que estarían ya completamente metilados [8]. Dado que la no metilación del gen *FMR1* permitiría la expresión de la FMRP, no es recomendable la realización del test FMRP en el feto antes de la 12,5.ª semana de embarazo. Para compensar, los

resultados del test FMRP estarían disponibles el mismo día, con el consiguiente ‘ahorro’ de ansiedad por parte de los padres.

Taylor et al estudiaron la expresión de la FMRP en diversos tejidos de un varón adulto afectado fallecido [18]. Este individuo no tenía retraso mental y manifestaba pocas características del síndrome, como problemas de aprendizaje y falta de atención. El estudio con *Southern* demostró en linfocitos una mutación no metilada con un amplio margen de expansiones, desde premutación hasta mutación completa. El estudio del cerebro demostró resultados similares en la mayor parte de las zonas estudiadas. Sin embargo, en el lóbulo parietal y en otros tejidos del organismo estudiados (corazón, pulmón, riñones, etc.) se encontró una única mutación completa metilada. El test FMRP se realizó en cuatro regiones cerebrales (corteza frontal, parietal, temporal y en hipocampo). En todas, excepto en la corteza parietal, la expresión de la FMRP en las neuronas se encontraba dentro de los límites normales, resultados coincidentes con el nivel de expansión CGG y metilación encontrado en el estudio *Southern* [18]. Desgraciadamente, no fue posible estudiar la FMRP en la sangre periférica de este paciente.

De Graaf et al [19] estudiaron la expresión de la FMRP en diversos tejidos de otro varón afectado de SXF y fallecido a causa de un cáncer de pulmón. En este caso, el cuadro clínico era completo, con retraso mental y fenotipo característico del síndrome. Se estudió la inestabilidad del triplete CGG y el nivel de expresión de FMRP en diferentes tejidos. La mutación completa se detectó en nueve de los 11 tejidos examinados. En espermatozoos se detectó expresión normal de FMRP que mostraban una premutación metilada en dicho tejido, confirmando la ausencia de células con mutación completa en el testículo de varones que la presentan en sangre periférica.

Helderman-van der Eden et al estudiaron la FMRP en sangre de dos gemelos monocigóticos-biamnióticos con SXF y con un grado diferente de expansión de CGG y de retraso mental [20]. La madre era portadora de una premutación. El hermano más retrasado tenía una mutación completa y carecía de expresión FMRP en sus linfocitos, mientras que el otro hermano, con menor grado de retraso intelectual y un mosaicismo 50/50% (premutación/mutación completa), tenía un 26% de linfocitos que expresaban FMRP. De nuevo existía concordancia entre el resultado del estudio molecular (ADN) y el estudio de la FMRP.

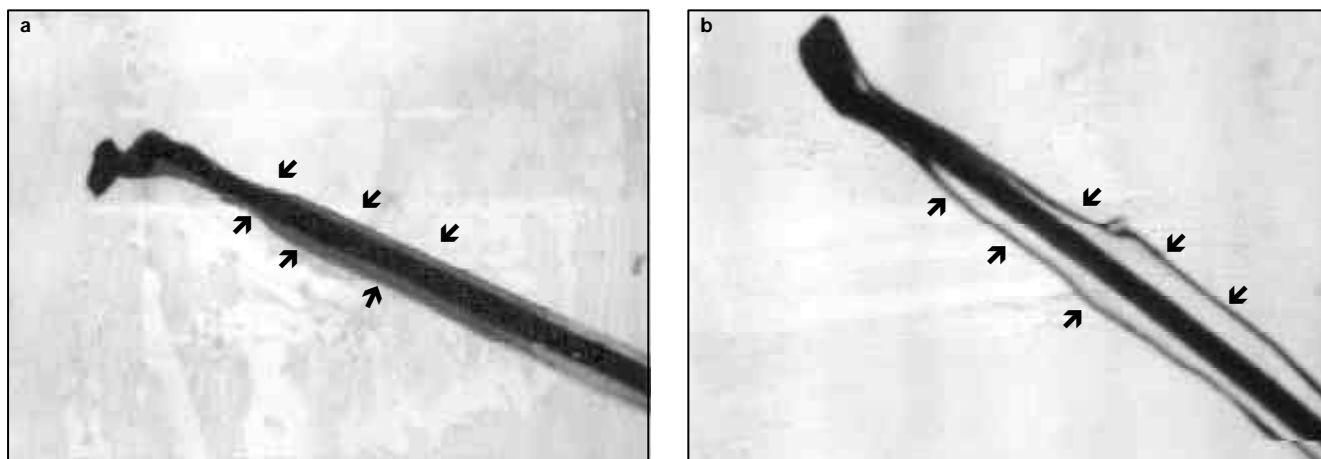


Figura 2. a) Cabello de individuo normal en el que se ve (zona oscura periférica –fechas–) la FMRP en la raíz y tallo (funda) del cabello; b) Cabello de individuo con SXF en el que no hay expresión de la FMRP (tallo claro –flechas–).

FMRP EN RAÍCES DE CABELLO

En 1999, de nuevo Willemssen et al introdujeron una nueva forma de análisis de la expresión de la FMRP en el SXF: se trataba de su estudio en las raíces de cabello. En su primera publicación [21] estudiaron la expresión de la proteína en dos niños varones con retraso psicomotor y portadores de una premutación de 60 y 190 CCG, respectivamente. Dado que su premutación no podía explicar su retraso, y ante la imposibilidad de estudiar el tejido cerebral para identificar una mutación completa, los investigadores optaron por estudiar la expresión de la FMRP en un tejido anatómico y embriológicamente próximo al cerebro: eligieron las raíces del cabello. Para ello estudiaron inicialmente a 130 controles (varones) normales, en los que el porcentaje de cabellos que expresaban FMRP oscilaba entre el 77 y 100%. Aproximadamente un 40% de dichos controles mostraban un 10-20% de cabellos sin FMRP, lo que los autores explicaban que podía deberse a problemas técnicos del protocolo (fijación, permeabilización, tinción, etc.). La mayoría de los cabellos de los varones control con SXF ($n=34$, 22 varones y 12 mujeres) carecían de expresión de FMRP. Diez de ellos eran mosaicos que expresaron la proteína en $\leq 30\%$ de los cabellos estudiados [21]. Las mujeres afectadas con mutación completa y cierto grado de retraso intelectual mostraron un nivel variable de expresión, que osciló entre el 0-55% de cabellos. También se analizó el cabello de 15 pacientes con retraso mental y sin SXF, mostrando todos ellos unos niveles de expresión en el intervalo normal ($<77\%$). Todos los individuos (pacientes y controles) se sometieron al estudio molecular convencional, y los resultados concordaron con los niveles de expresión de FMRP.

Respecto a los dos niños mencionados al principio del apartado, que en el estudio molecular presentaban sendas premutaciones, el resultado del test FMRP mostró en el primero (premutación de 60 CCG en sangre) un 27% de cabellos positivos, y en el segundo (premutación de 160 CCG en sangre), un 11%. Ambos porcentajes se encuentran en el margen de los individuos mosaicos [21].

Los autores establecen que un 77% es el intervalo mínimo en varones no afectados de SXF, mientras que los afectados mostrarían un nivel de expresión máxima del 33% de cabellos, cifras claramente separables y que no ofrecen ningún problema de solapamiento ni de resultados ambiguos. Para validar los resultados se recomienda estudiar un mínimo de 10 cabellos, y asegurarse de que todos poseen la raíz en uno de sus extremos.

Las ventajas de este procedimiento con respecto al estudio convencional son equiparables a las del test FMRP en sangre,

pero hay que añadir, además, la mejor conservación de las muestras (permite enviarlas por correo normal), la ausencia del peligro de infecciones y el hecho de que no es preciso personal cualificado (ATS) para la obtención de la muestra, aunque sí resulta necesario cierto entrenamiento para la obtención adecuada de cabellos sin causar demasiadas molestias al paciente. Por último, y quizás la ventaja más interesante, es que existe una mejor correlación entre el nivel de expresión de la FMRP en raíces de cabello y el grado de retraso mental, lo cual todavía debe confirmarse.

La interpretación del estudio de la FMRP en raíces de cabello en mujeres afectadas es más complicado, debido a la presencia de dos cromosomas X y su inactivación al azar. Dado que los cabellos humanos son de origen clonal, las mujeres con mutación completa tendrán cabellos con expresión normal de FMRP (alelo *FMR1* mutado inactivado) o con ausencia de FMRP (alelo normal inactivado). Willemssen et al estudiaron sólo a mujeres con mutación completa y diferentes grados de retraso intelectual, y no encontraron solapamiento entre ellas y el grupo control normal. Esta diferencia supondría una ventaja respecto al test FMRP en sangre (y al ADN convencional), que es incapaz de discriminar entre mujeres con mutación completa normales y las que tienen algún grado de déficit intelectual. Para explicar este fenómeno, los autores se basaron en la posibilidad de un patrón diferente de inactivación del tejido cerebral (ectodérmico) frente al tejido sanguíneo (mesodérmico). Por proximidad anatómica argumentaron que el patrón de inactivación en el cabello (de origen ectodérmico) sería similar al del tejido neuronal del cerebro [21].

Un reciente trabajo de Tuncbilek et al confirma la utilidad del estudio de la expresión de la FMRP en raíces de cabello como método de cribado de SXF entre varones con retraso mental no aclarado. Los autores realizaron el test a 300 varones en colegios de educación especial. Los dividieron según la puntuación del test clínico de Hagerman en dos grupos: grupo 1, ≤ 9 puntos; grupo 2, ≥ 10 puntos. En el primer grupo se incluyó a 249 individuos en los que la expresión de la FMRP se consideró normal. En el segundo grupo, 46 individuos mostraron un nivel normal de FMRP, mientras que cinco expresaron la FMRP en menos del 1% de los cabellos estudiados. Los resultados se corroboraron con el estudio molecular en todos los casos [22].

Nuestro grupo está realizando un estudio prospectivo similar al anterior, en el que estamos comparando los resultados del test molecular y el test FMRP en sangre y cabellos (Fig. 2). Los resul-

tados preliminares en más de 100 individuos (datos no publicados) parecen confirmar los hallazgos de estudios anteriores en el sentido de que el test FMRP constituye un eficaz y económico método diagnóstico para el cribado inicial del SXF, especialmente

en varones. La validez del test FMRP como método predictivo del grado de retraso intelectual, especialmente en mujeres, está aún por confirmar, y se precisan nuevos estudios, algunos ya en marcha, para su validación.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Vries BB, Mohkamsing S, van den Ouweland AM, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. Am J Hum Genet 1997; 61: 660-7.
2. Lubs HA. A marker X chromosome. Am J Hum Genet 1969; 21: 231-44.
3. Jacky PB, Ahuja YR, Anyane-Yebo K, Breg WR, Carpenter NJ, Froster-Iskenius UG, et al. Guidelines for the preparation and analysis of the Fragile X Chromosome in lymphocytes. Am J Med Genet 1991; 38: 400-3.
4. Verkerk AJ, Pieretti JS, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell 1991; 65: 905-14.
5. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell 1991; 67: 1047-58.
6. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, Macpherson J, Malmgren H, Dahl N, et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome using direct diagnosis with probe StB 12.3: the first 2,253 cases. Am J Hum Genet 1994; 55: 225-37.
7. Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular diagnosis of fragile X syndrome. JAMA 1994; 271: 536-42.
8. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. Hum Mol Genet 1992; 1: 397-400.
9. Verheij C, Bakker CE, De Graaf E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, et al. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. Nature 1993; 363: 722-4.
10. Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Belloq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat Genet 1993; 4: 335-40.
11. Abrams MT, Reiss AL, Freund LS, Baumgardner TL, Chase GA, Denckla MB. Molecular-neurobehavioural associations in females with the fragile X full mutation. Am J Med Genet 1994; 51: 317-27.
12. Willemsen R, Mohkamsing S, De Vries BB, Devys D, van den Ouweland AM, Mandel JL, et al. Rapid antibody test for fragile X syndrome. Lancet 1995; 345: 1147-8.
13. Tassone F, Hagerman RJ, Iklé DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, et al. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. Am J Med Genet 1999; 84: 250-61.
14. Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S, van Beerendonk H, De Haan A, De Vries BB, et al. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique. Hum Genet 1997; 99: 308-11.
15. De Vries BB, Mohkamsing S, van den Ouweland AM, Halley DJ, Niermeijer MF, Oostra BA, et al. Screening with the FMR1 protein test among mentally retarded males. Hum Genet 1998; 103: 520-2.
16. Ramos FJ, Milá M, Ortillés M, Rifé M, Taz-n B, de Diego Y, et al. Validity of the analysis of the FMRP expression in blood smears as a screening method for fragile X syndrome. Am J Hum Genet 2000; 67: 360.
17. Willemsen R, Oosterwijk JC, Los FJ, Galjaard H, Oostra BA. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. Lancet 1996; 348: 967-8.
18. Taylor AK, Tassone F, Dyer PN, Hersch SM, Harris JB, Greenburg WT, et al. Tissue heterogeneity of the FMR1 mutation in a high-functioning male with fragile X syndrome. Am J Med Genet 1999; 84: 233-9.
19. De Graaf E, Willemsen R, Zhong N, de Die-Smulders CE, Brown WT, Freling G, et al. Instability of the CGG repeat and expression of the FMR1 protein in a male fragile X patient with a lung tumor. Am J Hum Genet 1995; 57: 609-18.
20. Helderma-van der Enden AT, Maaswinkel-Mooij PD, Hoogendoorn E, Willemsen R, Maat-Kievit JA, Losekoot M, et al. Monozygotic twin brothers with the fragile X syndrome: different CGG repeats and different mental capacities. J Med Genet 1999; 36: 253-7.
21. Willemsen R, Anar B, de Diego Y, de Vries BB, Hilhorst-Hofstee Y, Amits A, et al. Noninvasive test for fragile X syndrome, using hair root analysis. Am J Hum Genet 1999; 65: 98-103.
22. Tuncbilek E, Alikasifoglu M, Aktas D, Duman F, Yanik H, Anar B, et al. Screening for the fragile X syndrome among mentally retarded males by hair root analysis. Am J Med Genet 2000; 95: 105-7.

NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME X FRÁGIL: ESTUDIO DE LA FMRP EN SANGRE Y PELO

Resumen. Introducción. El síndrome X frágil (SXF) es la causa más frecuente de retraso mental hereditario. Aunque la mayoría de los pacientes afectados, especialmente los varones, presentan un fenotipo característico, es preciso el estudio molecular del gen FMR1 para confirmar el diagnóstico, en dependencia del número de expansiones del triplete CGG en dicho gen. Desarrollo. En los últimos años se ha desarrollado una técnica inmunohistoquímica que permite el estudio de la expresión de la proteína codificada por el gen FMR1, denominada FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein), inicialmente en linfocitos de sangre periférica y más recientemente en raíces de cabello, que permite identificar sin ambigüedades a varones afectados de SXF. Las ventajas de esta técnica con respecto al estudio molecular convencional es su rapidez (resultados en pocas horas), bajo coste y facilidad de obtención de las muestras, en el caso de los cabellos con un método incruento. Los varones afectados muestran niveles sensiblemente inferiores a los varones normales, sin solapamiento en los niveles de expresión respectivos. Estas afirmaciones son válidas tanto para el test en sangre como en raíces de cabello. En mujeres, la interpretación es más complicada debido a la inactivación al azar de uno de los cromosomas X, aunque los estudios iniciales han permitido diferenciar claramente el nivel de expresión de la FMRP en cabellos de mujeres con mutación completa y con cierto grado de retraso intelectual y el de mujeres normales con o sin premutación. Conclusión. Basándonos en los estudios realizados hasta la fecha, podemos concluir que el test FMRP es un eficaz y barato método de despistaje inicial del SXF. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S9-13] **Palabras clave.** Expresión. Proteína FMRP. Raíces de cabello. Sangre. Síndrome X frágil.

NOVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA SÍNDROMA X FRÁGIL: ESTUDO DA FMRP NO SANGUE E NO CABELO

Resumo. Introdução. A síndrome X frágil (SXF) é a causa mais frequente de atraso mental hereditário. Embora a maioria dos doentes envolvidos, especialmente os homens, apresente um fenotipo característico, é necessário o estudo molecular do gene FMR1 para confirmar o diagnóstico, em dependência do número de expansões do triplete CGG no referido gene. Desenvolvimento. Nos últimos anos, desenvolveu-se uma técnica imunohistoquímica que permite o estudo da expressão da proteína codificada pelo gene FMR1, denominada FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein), inicialmente em linfócitos do sangue periférico e mais recentemente em raízes de cabelo que permite identificar claramente homens afectados por SXF. As vantagens desta técnica relativamente ao estudo molecular convencional é a sua rapidez (resultados em poucas horas), baixo custo e facilidade de obtenção das amostras, no caso do cabelo com um método não cruento. Os homens afectados mostram níveis sensivelmente inferiores aos homens normais, sem sobreposição nos níveis de expressão respectivos. Estas afirmações são válidas tanto para o teste no sangue como em raízes de cabelo. Nas mulheres, a interpretação é mais complicada devido à inactivação aleatória de um dos cromossomas X, embora os estudos iniciais permitiram diferenciar claramente o nível de expressão da FMRP no cabelo de mulheres com mutação completa e com certo grau de atraso intelectual e o de mulheres normais com ou sem pré-mutação. Conclusão. Baseando-nos nos estudos realizados até à data, podemos concluir que o teste FMRP é um método eficaz e económico de despistagem inicial da SXF. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S9-13] **Palavras chave.** Expressão. Proteína FMRP. Raízes de cabelo. Sangue. Síndrome X frágil.