

La prevención del síndrome X frágil mediante el diagnóstico prenatal genético: ventajas y aspectos controvertidos

M.I. Tejada

PREVENTION OF FRAGILE X SYNDROME BY PRENATAL GENETIC DIAGNOSIS: ADVANTAGES AND CONTROVERSIAL ASPECTS

Summary. Introduction. Fragile X syndrome is the most common cause of hereditary mental retardation. Since the molecular mechanism causing it (anomalous expansion of the CGG triplet in the FMR1 gene and hypermethylation of its CpG island) was identified exactly ten years ago, it has been possible to give families in whom the syndrome is transmitted completely reliable prenatal genetic diagnosis of this. Objective. To report and discuss our experience in this field from 1994 to the present time. Patients and methods. During this period we performed 15 prenatal diagnoses: 14 in samples of chorionic villi from 13 pregnancies (one a twin pregnancy) and 1 using amniotic fluid. In all cases we used Southern blot molecular techniques with the StB12.3 probe, the PCR of CGG triplet and DXS548 in some cases. Results. Nine fetuses were normal. Of the other six fetuses, three had full mutation, one had deletion of the FMR1 gene, another was premutated and another had an allele in the grey zone (50 repetitions). Conclusions. Molecular prenatal diagnosis of SXF is fast and 100% reliable, although from the technical point of view it is complicated and requires use of various molecular techniques. From the clinical point of view, the low rate of mutations found assures offspring, although molecular studies do not predict mental 'status' in either girls with complete mutation or children with permutation. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S14-9]

Key words. Fragile X syndrome. FRAXA. Microsatellite DXS548. PCR. Prenatal diagnosis. Triplet CGG.

INTRODUCCIÓN

El síndrome X frágil (SXF) es la causa más común de retraso mental hereditario, con una prevalencia aproximada de 1:4.000 en varones y 1:8.000 en mujeres [1]. Los pacientes con SXF presentan un retraso mental de leve a grave, asociado a un fenotipo característico: cara alargada, orejas grandes despegadas, macroorquidismo, hiperactividad, lenguaje repetitivo, etc. [2]. Es una enfermedad ligada al cromosoma X, dominante, con penetrancia incompleta, que molecularmente se caracteriza por una expansión anormal de un triplete CGG localizado en 5' del exón 1 del gen *FMR1*, descubierto en 1991 [3,4]. En la población normal, el número de repeticiones de este triplete CGG es polimórfico y varía entre 6 y 50; su expansión hasta unas 200 repeticiones provoca una premutación, llamada así porque los individuos no manifiestan el síndrome; a partir de unas 200 repeticiones se da la llamada mutación completa, debida a una hipermetilación de la región promotora del gen *FMR1*, que implica la ausencia de expresión del gen con la consiguiente falta de su proteína y la aparición del síndrome [5].

Debido a su prevalencia y a su importancia médica, desde los años 70-80 se han desarrollado técnicas de diagnóstico prenatal (DP). Al inicio, el único método del que disponíamos era el citogenético [6], pero inmediatamente después de la puesta a punto de la tecno-

logía molecular por *Southern* [7] se aplicó el método molecular directo al DP [8,9]. Un poco más tarde, por lo laborioso del método *Southern*, diversos autores se centraron en mejorar las técnicas de amplificación del triplete CGG por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya inicialmente descritas por Fu et al [4], y en aplicarlas al DP [10,11]. También a veces para el DP es necesario utilizar marcadores polimórficos del tipo microsatélite cercanos al gen *FMR1*. Por ejemplo, el microsatélite DXS548 del tipo (CA)_n, situado a 150 kb en dirección centromérica al gen, y del que se han descrito nueve alelos distintos del mismo con una heterocigotidad del 70-80% [12], aportaba bastante información al respecto.

Aunque nadie pone en duda la validez de las técnicas moleculares, la mayoría de los autores están de acuerdo en la dificultad técnica de las mismas: desde la ausencia de metilación, frecuente en los tejidos extraembrionales como son las vellosidades coriales [13], hasta la falta de amplificación por PCR de las expansiones grandes [10]. Desde el punto de vista de la interpretación clínica, se plantea no sólo el gran dilema de los fetos femeninos, debido a que el 59% de las mujeres con mutación completa presentan algún tipo de discapacidad mental [14], sino también de la interpretación de los fetos masculinos premutados porque algunos podrían presentar sintomatología o ser mosaicos [15].

En nuestra Unidad de Genética se diagnostica el SXF con métodos moleculares desde el año 1992 [16]; el primer DP se realizó en una portadora en 1994. Presentamos en este trabajo nuestros resultados, los discutimos con los de la literatura y hacemos hincapié en las ventajas del DP del SXF y en sus aspectos controvertidos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Desde 1991, cuando se descubre el gen *FMR1* y ponemos a punto el método molecular directo de diagnóstico con la sonda StB12.3, la Unidad de Genética del Hospital de Basurto recibe la mayoría de las peticiones para estudio molecular del SXF que se generan en el norte de España (Asturias, Cantabria, La Rioja, Navarra y País Vasco). Hasta la fecha, llevamos estudiadas 72 familias, de las que asumimos el DP en las portadoras que lo solicitan salvo en verano, por problemas de infraestructura. El primer DP lo realizamos en

Recibido: 07.09.01. Aceptado: 08.10.01.

Unidad de Genética. Hospital de Basurto. Bilbao, Vizcaya, España.

Correspondencia: Dra. M.I. Tejada. Unidad de Genética. Hospital de Basurto. Avda. Montevideo 18, E-48013 Bilbao. E-mail: itejada@hbas.osakidetza.net

Agradecimientos. Este artículo no hubiera sido posible sin el trabajo de toda la Unidad de Genética del Hospital de Basurto. Quiero mencionar especialmente a la Dra. M. Durán, quien estuvo de becaria entre los años 1994 y 1998, y a M.ª Asun Tapia, la técnico-especialista del Laboratorio de Genética Molecular. Asimismo, nada se podría haber llevado a cabo sin la colaboración de todas las familias y todos los clínicos que las tratan, a quienes agradezco su colaboración.

Parte del trabajo estuvo subvencionado económicamente entre los años 1994 y 1998 por el FIS (94/0857 y 96/1575) y por el Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco.

© 2001, REVISTA DE NEUROLOGÍA

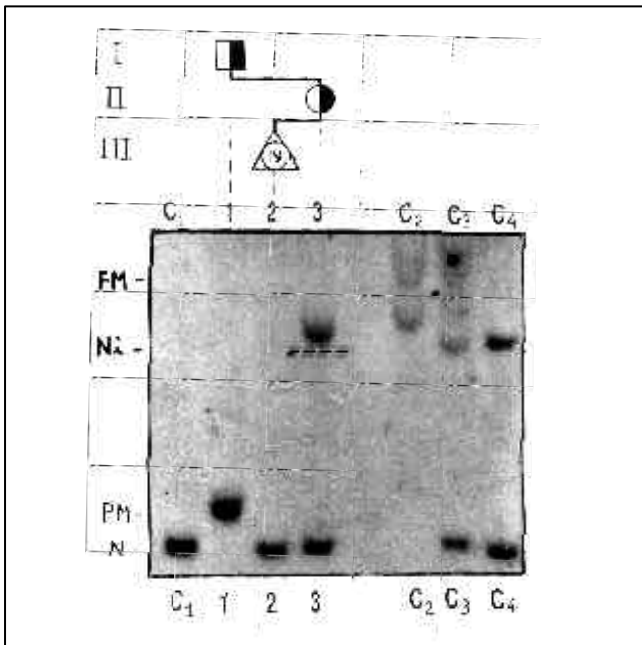


Figura 1. Diagnóstico prenatal del caso 1 del SXF. Patrón de hibridación por *Southern* obtenido con la sonda StB12.3, después de digerir los ADN con *EcoRI* y *EagI*. N: bandas de 2,8 kb de los cromosomas X normales y activos (no metilado). PM: banda de unas 3 kb que corresponde a un cromosoma X premutado activo. N: banda de 5,2 kb de los cromosomas X normales inactivos o metilados. Se observa que, en la línea 3, la banda PM es ligeramente superior a ese valor. FM: región en donde se observan los *smear* de la mutación completa. C₁: caso y control de niño normal. C₂: caso y control de niño con SXF. C₃: caso y control de niña con mutación completa del SXF. C₄: caso y control de niña normal. Las líneas 1, 2 y 3 corresponden en vertical al pedigrí dibujado. 1: abuelo portador premutado; 2: caso 1 de diagnóstico prenatal con resultado de un feto femenino normal con una sola banda de 2,8 kb por ausencia de metilación o inactivación de sus cromosomas X; 3: madre portadora en la que, por azar, su cromosoma X premutado está completamente metilado o inactivo en la muestra estudiada (sangre periférica).

1994 y, hasta la fecha, hemos efectuado 15 DP en 14 gestaciones de 13 gestantes: un embarazo fue de gemelos y otro DP se realizó a la misma gestante al año siguiente. Las 13 gestantes pertenecían a las familias con SXF estudiadas por nosotros, y todas ellas conocían su condición de portadoras: nueve presentaban una premutación; dos, mutación completa, y otra era un mosaico (parte premutación y parte mutación completa). El caso 8 merece explicación aparte: aunque tía de un niño con SXF y hermana de portadoras, la gestante no había heredado el cromosoma X frágil que se segregaba en su familia, pero llevaba, de su padre, un alelo de 50 repeticiones. Dado que cuando hicimos el estudio la paciente estaba ya en estado gestante, al entender que ese alelo estaba en el inicio del riesgo (zona gris) aunque parecía transmitirse de forma normal, nos exigió el DP. La tabla I describe cronológicamente los casos, años, familias y el tipo de portadoras que eran esas gestantes.

Muestras fetales

El caso 8 mencionado se estudió en células de cultivo de líquido amniótico porque, cuando se tomó la decisión de realizar el DP, estaba ya de 16 semanas. Todos los demás DP se realizaron en biopsias de vellosidades coriales. Salvo la primera, que se tomó a las 11-12 semanas de gestación, todas las demás se realizaron a las 13-14 semanas de embarazo: siete se obtuvieron transcervicalmente y otras siete fueron transabdominales en función de criterios ginecológicos.

Estudio citogenético

En todas las muestras se realizó el cariotipo para descartar también anomalías cromosómicas y conocer el sexo fetal (Tabla I), pero no se realizaron técnicas de inducción del sitio frágil.

Estudio molecular

Todos los casos se estudiaron con la sonda StB12.3 (cedida por el Dr. J.L. Mandel), mediante el método molecular directo de *Southern*, *blotting* e *hibridación*.

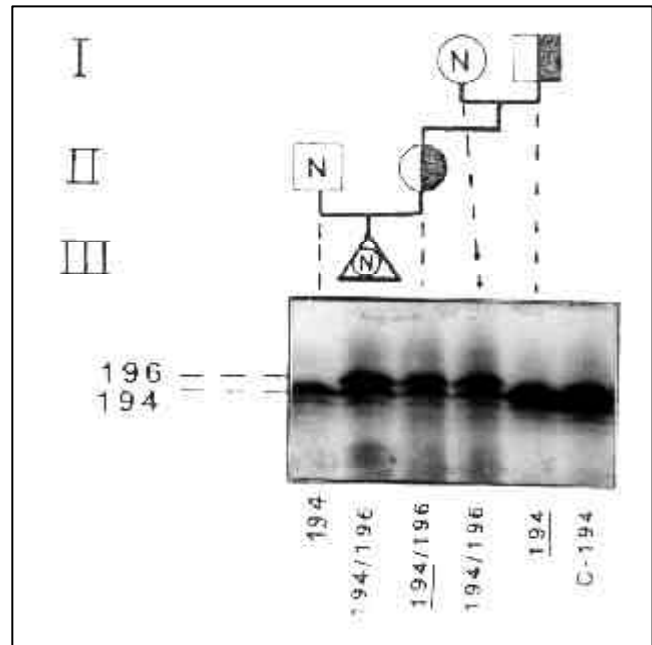


Figura 2. Estudio del microsatélite DXS548 en el diagnóstico prenatal (DP) del SXF del caso 1. Los dos alelos que se observan en esta foto se han marcado en función del número de pares de bases que se obtienen (194 y 196), siendo C-194 un control de este valor. El alelo 194 subrayado es el que va ligado al cromosoma X frágil en esta familia. Las líneas de la electroforesis corresponden en vertical al pedigrí dibujado. Se observa claramente que el resultado del DP es un feto femenino con dos alelos, que ha heredado de su madre el de 196 pb, no ligado al SXF.

dación, después de digerir con *EcoRI* y *EagI* los ADN obtenidos de las vellosidades coriales y del líquido amniótico por métodos convencionales. La técnica usada ha sido la descrita por Rousseau et al [7], pero utilizando un marcaje no radioactivo con digoxigenina y la detección con CSPD, según protocolos modificados de Boehringer Mannheim-actual Roche (Fig. 1).

También en todos los casos se ha realizado una amplificación por PCR del triplete CGG; en los seis primeros casos el estudio fue retrospectivo porque hasta finales del año 1995 no implantamos de rutina el estudio del SXF por PCR. Desde entonces, cada vez que realizamos un DP ponemos en marcha simultáneamente tres protocolos con el ADN extraído: el método directo por *Southern* y, además, dos protocolos de PCR diferentes que hemos denominado de cribado (detección por fluorescencia en geles de agarosa) y de cuantificación en geles de poliacrilamida, los cuales han descrito ampliamente Durán et al [17].

En los 11 primeros casos se estudió de forma rutinaria el microsatélite DXS548, siguiendo el protocolo descrito en Durán et al [17]. Desde el año 1998 sólo usamos esta técnica si la consideramos necesaria (Fig. 2), lo que no ha sucedido en los cuatro últimos DP.

RESULTADOS

Todos los resultados de los diagnósticos prenatales realizados se encuentran en la segunda mitad de la tabla I. Veremos con un poco más de detalle algunos de ellos.

En el caso 1 obtuvimos una sola banda de 2,8 kb en el estudio por *Southern*, pero habíamos obtenido un cariotipo fetal femenino (Fig. 1). El estudio del microsatélite DXS548, informativo en esta familia, mostró dos alelos, de 194 y 196 pb, denotando que se trataba de un feto normal femenino (Fig. 2). Este resultado de banda única lo interpretamos como un fallo de metilación de la isla CpG del gen *FMR1* en biopsia de vellosidades coriales, tejido que por ser extraembrionario parece no metilar el ADN sin inactivar ninguno de los dos cromosomas X. Aunque a partir de entonces decidimos retrasar la toma de vellosidades coriales a las semanas 13 o 14 para evitar esa ausencia de metilación, la tabla I muestra que en sólo tres casos hemos encontrado metilación en la muestra estudiada, y de forma muy parcial (en un porcentaje muy bajo de sus células) en dos de ellos.

Los casos 2 y 3 correspondieron a un embarazo de gemelos, en el que se obtuvieron un feto femenino normal y otro masculino, con una banda en forma

de *smear* de entre 3,5 y 4,2 kb, lo que correspondía a un feto con la mutación completa que, sin embargo, también presentaba un fallo de metilación. La gestante perdió ambos fetos al intentar el feticidio del afectado.

En el caso 5, un feto femenino, por la PCR del triplete CGG y por el DXS548, el feto parecía llevar la mutación completa. Sin embargo, en la primera placa que sacamos del *Southern* se observaba sólo una banda en 2,8 kb. Al sobreexponer la impresión, nos encontramos con un amplísimo *smear* tanto en la zona no metilada, digerida por EagI (entre 3,5 y casi 5 kb), como en la zona metilada (> 6 kb), que correspondía al feto afecto esperado.

El caso 8 se ha comentado ya con anterioridad. Se obtuvo precisamente un feto masculino con el alelo de 50 repeticiones, igual que el de su madre, lo que demostraba que el alelo no era inestable en esta familia.

En los casos 9 y 10 tuvimos que enfrentarnos al hecho de no contar con un resultado por *Southern*, debido probablemente a haber utilizado un equipo comercializado para la extracción del ADN que inhibió las digestiones del mismo. El estudio del triplete CGG, heterocigoto en ambos casos, fue crucial para determinar que se trataba de dos fetos femeninos normales.

En el caso 11, feto femenino, las técnicas de PCR del triplete CGG y del microsatélite DXS548, informativas en ambos casos, demostraban que el feto había heredado el cromosoma X mutado de su madre. Sin embargo, el patrón de *Southern* mostró la banda normal de 2,8 kb y otra, también activa, de 2,2 kb, mostrando la existencia de una delección en el X mutado de la madre, en la región del *FMR1* en donde se encuentra el triplete CGG. A pesar de ser una niña, la gestante optó por interrumpir el embarazo, sin esperar otras técnicas complementarias.

En el caso 12 nos encontramos con que el feto era masculino y llevaba una premutación algo inferior a la de la madre, es decir, una regresión en el número de repeticiones del triplete CGG. La gestante, hija de un varón sano, portador premutado, optó por seguir el embarazo, aun conociendo que no podíamos obviar la posibilidad de un mosaico en otros tejidos fetales. Hasta la fecha, el niño es normal.

En el caso 13, un feto masculino, una parte de la muestra presentó una contaminación materna: la vellosidad corial se había extraído por vía trans-abdominal en dos tubos diferentes, por lo que se obtuvieron dos muestras de ADN independientes. En la primera muestra, la técnica de cribado que detecta banda si el feto es normal, la detectó, pero la técnica de cuantificación mostró dos alelos idénticos a los de la madre. En el *Southern* de esta primera muestra, así como en todas las técnicas realizadas en la segunda, el resultado correspondió a un feto masculino con la mutación completa.

Salvo en este caso, como hemos visto parcialmente, en todos los DP ha habido una total concordancia entre los resultados de las técnicas de *Southern*, las ampliificaciones por PCR del triplete CGG, y el estudio del microsatélite DXS548.

De los 15 fetos estudiados, en total ocho fueron femeninos y siete masculinos. Nueve tomaron el cromosoma X normal de la madre; cinco, el X frágil (tres con mutación completa, uno con premutación y uno con delección), y por último, uno era el del alelo de 50. En el caso de los tres fetos con mutación completa y en el de la delección, se optó por la interrupción del embarazo. Como además se perdió la niña normal del embarazo de gemelos, tenemos como resultado nueve niños nacidos normales (incluyendo el premutado y el alelo de 50) y una gestación que sigue normalmente su curso (caso 15). El resumen de estos resultados se muestra en la tabla II.

DISCUSIÓN

La Unidad de Genética del Hospital de Basurto recibió la sonda Stb12.3 del Dr. Mandel para estudiar molecularmente el SXF tan pronto como se descubrió el gen en 1991. Al inicio se volvió a

Tabla I. Relación cronológica detallada de los diagnósticos prenatales del SXF realizados mediante técnicas moleculares.

| Caso | Año | Familia n.º | Mutación en la gestante ^a | Cariotipo fetal | Stb12.3 (EcoRI/EagI) ^b | Metilación | (CGG)n ^a | Seguimiento |
|------|------|-------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|------------|---------------------|---------------|
| 1 | 1994 | 31 | PM (88/29) | 46,XX | 2,8 | No | 29/18 | Niña normal |
| 2 | 1995 | 19 | PM (73/29) | 46,XY | 3,5-4,2 | No | NA | IVE |
| 3 | 1995 | 19 | La misma que 2 | 46,XX | 2,8 | No | 29/29 | Pérdida fetal |
| 4 | 1995 | 18 | PM (78/29) | 46,XX | 2,8/5,2 (5%) | Parcial | 29/29 | Niña normal |
| 5 | 1995 | 11 | PM (70/29) | 46,XX | 2,8/>3,5 y >6 | Parcial | NA/13 | IVE |
| 6 | 1995 | 3 | FM (NA/29) | 46,XY | 2,8 | No | 29 | Niño normal |
| 7 | 1996 | 19 | La misma que 2 | 46,XX | 2,8 | No | 29/29 | Niña normal |
| 8 | 1996 | 45 | PM ? (50/18) | 46,XY | 2,9 | No | 50 | Niño normal |
| 9 | 1997 | 13 | PM (60/18) | 46,XX | Fallo digestión | ? | 29/18 | Niña normal |
| 10 | 1998 | 45 | FM (NA/18) | 46,XX | Fallo digestión | ? | 29/18 | Niña normal |
| 11 | 1998 | 28 | Mos. (NA/29) | 46,XX | 2,2/2,8 | No | NA/29 | IVE |
| 12 | 1998 | 56 | PM (73/29) | 46,XY | 3 | No | 70 | Niño normal |
| 13 | 1999 | 52 | PM (97/38) | 46,XY | >6 | Si | NA | IVE |
| 14 | 1999 | 57 | PM (100/29) | 46,XY | 2,8 | No | 29 | Niño normal |
| 15 | 2001 | 11 | PM (80/29) | 46,XY | 2,8 | No | 29 | Gestación |

^a Los números entre paréntesis indican las repeticiones del triplete CGG; ^b Los números se expresan en kilobases (kb); PM: premutado/a; FM: mutación completa; Mos.: mosaico (muestra con PM y FM); NA: ausencia de amplificación; IVE: interrupción voluntaria de embarazo.

Tabla II. Resumen de los resultados obtenidos en los 15 diagnósticos prenatales del SXF realizados en nuestro laboratorio.

| | FM | Del. PM | Zona gris | Total X frágil | X normal | Total | Nacidos sanos |
|-------|----|---------|-----------|----------------|----------|-------|---------------|
| 46,XX | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 6 | 8 |
| 46,XY | 2 | 0 | 1 | 1 | 4 | 3 | 7 |
| Total | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 9 | 15 |

FM: mutación completa; Del.: delección del gen *FMR1*; PM: premutado; zona gris: alelo de 50 repeticiones. *Un varón normal todavía en gestación (fecha probable de parto: noviembre de 2001).

estudiar a una serie de familias X frágil que ya se habían diagnosticado previamente por métodos citogenéticos [16,18] y, con esa experiencia y diversas subvenciones de investigación, se ofreció el estudio a otros hospitales, convirtiéndose nuestro laboratorio en poco tiempo en centro de referencia para el diagnóstico molecular del SXF en gran parte del norte de España [17,19]. Desde entonces hasta la fecha hemos estudiado a 72 familias transmisoras del SXF, con un total de 570 individuos (datos cerrados el 30.06.2001), de los cuales 315 (120 varones y 195 mujeres) llevan el cromosoma X frágil en sus diversos estadios de premutación, mutación completa y mosaicos. Desde el año 1993 asumimos el DP en las portadoras de las familias que lo solicitan salvo en verano, por problemas de infraestructura. El primer DP lo realizamos en 1994 y, hasta la actualidad, hemos realizado 15 diagnósticos prenatales en 13 gestantes (Tabla I). En todos estos años sólo hemos tenido que derivar en verano cuatro DP a otros laboratorios, lo que pone de manifiesto, como primer resultado en nuestra muestra, la baja tasa de natalidad que se da entre las

portadoras (en total, 19 DP en casi 10 años, cuando más del 30% de las 195 portadoras estudiadas están en edad fértil). Este número tan bajo de embarazos no parece deberse a problemas de infertilidad, sino más bien a la bajísima tasa de natalidad existente en nuestra zona (en el País Vasco, la menor de Europa), unida a los problemas socioeconómicos que supone, de por sí, la existencia de varios chicos con SXF en esas familias.

Hemos titulado este artículo 'ventajas y aspectos controvertidos' porque, no siendo muy numerosos los DP del SXF realizados en nuestro laboratorio, los resultados no son especialmente originales desde el punto de vista de los patrones moleculares obtenidos, pero sí creemos importante comunicar nuestra experiencia para demostrar que, desde el punto de vista técnico, el DP molecular del SXF no resulta sencillo, aunque sea fiable al 100%; requiere a la vez la utilización de varias técnicas moleculares diferentes y de un laboratorio con personal muy especializado.

Portanto, vamos a discutir aquí las diversas dificultades con que nos hemos encontrado, a aportar nuestras soluciones y a demostrar la importancia de tener una amplia experiencia en el manejo de pacientes y familias transmisoras del SXF para una óptima interpretación de los resultados en un DP.

Con el protocolo de trabajo que hemos establecido en nuestro laboratorio, que combina las técnicas de *Southern* con dos protocolos de PCR del triplete CGG diferentes [17] y con el estudio del microsatélite DXS548, se puede dar a la gestante, en un máximo de 10-12 días, un resultado molecular fiable al 100%. Siendo la muestra de elección la biopsia de vellosidades coriales, y practicando aproximadamente a las 11-12 semanas de gestación —no merece la pena hacerlas más tarde porque no hemos encontrado mejoría en los fallos de metilación—, la gestante tiene el resultado, a más tardar, a las 13 o 14 semanas, lo que asegura una interrupción del embarazo —en caso de anomalía— bastante precoz y por lo tanto con menos riesgo. En ningún caso hemos necesitado otra toma de muestra para aclarar el resultado molecular; con el fin de optimizar la interpretación clínica, propusimos el estudio de sangre fetal tanto a las pacientes con la delección como a la del feto varón premutado (casos 11 y 12), pero no se optó por este estudio complementario.

Pero, ¿por qué hemos decidido utilizar para DP este protocolo con varias técnicas simultáneas? La técnica de PCR que utilizamos de cribado —consistente simplemente en visualizar o no el fragmento amplificado [17]— sólo detecta los fragmentos normales y las premutaciones muy bajas. Como no discrimina los dos alelos y siempre amplifica el alelo normal en un feto femenino, sólo sirve para los masculinos, e incluso en éstos, a pesar de la sencillez de la técnica, hay que tener mucha prudencia porque la PCR puede contaminarse fácilmente, bien por la persona que la manipula, bien en un feto, de muestra materna. De los casos que presentamos, sólo en uno (caso 13), y en una parte de la muestra de éste, este tipo de PCR dio un falso negativo por contaminación materna. No es por tanto una técnica que pueda utilizarse en solitario en el DP. Sin embargo, como es muy rápida y económica, la utilizamos siempre porque puede dar un primer indicio de lo que podremos encontrar y permite manejar mejor las otras técnicas de mayor duración.

Con la técnica que llamamos de cuantificación —con la cual desplazamos el producto amplificado en geles de poliacrilamida e hibridamos con un oligo (CGG)₅—, se discriminan perfectamente todos los alelos (CGG)_n hasta un margen de unas 120 repeticiones. En nuestra experiencia con el estudio de las familias [17], esta técnica ha mostrado una total concordancia con los patrones hallados por *Southern*, y ha superado a éste en precisión, como por

ejemplo en las premutaciones pequeñas (menores de 65 repeticiones). En nuestros DP hay que reseñar la importancia de este protocolo de PCR al detectar la contaminación materna en el caso 13 y, en particular, al obtener el diagnóstico definitivo en los casos 9 y 10, en los que tuvimos problemas con las digestiones de los ADN extraídos. Sin embargo, el problema de esta amplificación del triplete CGG reside en la obtención de una sola banda normal en un feto femenino, al no poder saber si se trata de un feto homocigoto normal o heterocigoto para la mutación completa que no ha amplificado. En los casos de obtener fetos con la premutación tampoco podemos saber si, en realidad, se trata de mosaicos en los que no se amplifican sus células con mutación completa. Esta falta de amplificación de los alelos con muchas repeticiones ha sido descrita por casi todos los autores que trabajan en el SXF [4, 10, 13], por lo que se necesita siempre la realización de un *Southern*.

No obstante, el método directo de hibridación con sondas genómicas (como la StB12.3 en nuestro caso) a partir de un *Southern*, a pesar de ser el definitivo, también presenta dificultades técnicas que lo hacen muy largo y laborioso, y sus dificultades de interpretación requieren de profesionales expertos en el diagnóstico del SXF. Entre las primeras dificultades se encuentran, por ejemplo, los fallos de digestión y la ausencia de visibilidad de los *smears* muy amplios. Así, en los casos 9 y 10, en donde tuvimos problemas de digestión, es evidente que hubiéramos podido purificar el ADN e intentar otra vez la digestión, pero en DP actuamos siempre contra reloj y todo lo que signifique un adelanto en el diagnóstico será siempre positivo. Con respecto a los *smear*, en el caso 5 tuvimos que exponer tanto la placa para verlo, que al final esas bandas, que son precisamente la confirmación definitiva del feto afecto, pueden confundirse con los ruidos de fondo de la placa. Para obviar este problema puede utilizarse el enzima BglII [20], pero una vez más tendríamos que volver a empezar una nueva digestión, un *Southern*, etc., con el consiguiente retraso en el diagnóstico.

En cuanto a las dificultades de interpretación nos encontramos sobre todo con la ausencia de metilación o con las metilaciones anormales que se observan al digerir con un enzima sensible a la metilación, como el EagI. Normalmente, el método de *Southern* tras digestión con doble enzima (EcoRI/EagI) aporta al mismo tiempo información acerca del tamaño de la expansión y de la metilación de la isla CpG, detectando dos bandas en mujeres normales (de 2,8 y 5,2 kb) y cuatro en las premutadas, ya que tanto los cromosomas X normales como los premutados sufren inactivación al azar [7]. Sin embargo, a veces encontramos mujeres premutadas con sólo dos bandas porque en el extremo de esa inactivación al azar se hallan los casos que tienen todo el cromosoma X normal activo y todo el cromosoma X premutado inactivo (o al revés). En DP, lo que se encuentra muy a menudo es una sola banda de 2,8 kb en las muestras de vellosidad corial de fetos femeninos normales, tal como se observa en la tabla I. Estas dos posibilidades atípicas las observamos por primera vez en la familia 31 (caso 1, Figs. 1 y 2), lo que en su momento nos pareció muy novedoso y fue la razón por la cual presentamos el caso en un congreso [21].

Hoy día, las metilaciones parciales o ausentes en las vellosidades coriales se han documentado sobradamente [13, 22, 23]. En el caso del SXF afectan también a los fetos con la mutación completa, pues en ellos debería haber metilación y no la hay, o bien se da parcialmente. Sin embargo, las diversas series publicadas presentan diferencias en lo concerniente al porcentaje de manifestación de este fenómeno: nuestros resultados indican que la mayoría de las muestras de ADN de vellosidades coriales no están metiladas (sólo tres, y dos muy parcialmente), lo cual concuerda con los resultados

de Devys et al [24], pero no con los de Castellví-Bel et al [13], que sólo encuentran un 32% de muestras sin metilación. También estos últimos autores encuentran muestras fetales masculinas normales para el SXF, aunque con dos bandas (de 5,2 y 2,8 kb), sugiriendo que en estos casos también hay metilaciones anormales o digestiones parciales. Nosotros no hemos encontrado este fenómeno en ningún caso masculino, ni siquiera en el feto premutado (caso 12) ni en el de la zona gris de 50 repeticiones (caso 8).

Para obviar este problema de los patrones anormales de metilación, algunos autores aconsejaban tomar las muestras fetales unas semanas de gestación más tarde; sin embargo, nosotros, habiendo tomado las muestras de vellosidades coriales a las 13-14 semanas a partir del caso 2, no hemos encontrado ninguna mejora. Esto concuerda con lo hallado por Castellví-Bel et al [13] acerca de la falta de correlación entre la metilación y las semanas de gestación, y demuestra que los patrones anormales de metilación constituyen un fenómeno frecuente en muestras extraembrionarias como las vellosidades coriales tomadas para DP. Como podemos resolver este problema con otras técnicas (como la PCR del triplete CGG) o interpretar los resultados en función del tamaño de la expansión [23], no nos parece adecuado retrasar la toma de biopsias de vellosidades coriales, pues ello no conlleva más que un retraso en el diagnóstico.

Con todo lo expuesto podemos observar que, para el DP del SXF, sobre todo de fetos hembra, hay que ser muy cautos y en caso de que tanto el *Southern* como la PCR del triplete CGG den una sola banda, será necesario utilizar las técnicas de PCR de microsatélites cercanos, como el DXS548 que nosotros utilizamos. El estudio de este microsatélite es de gran utilidad diagnóstica: sencillo de estudiar, su amplificación no falla nunca y su visualización es clarísima—puede diferenciar perfectamente aquellas mujeres heterocigotas cuyos alelos difieren en una sola repetición (CA) (Fig. 2)—. Además, es un microsatélite muy informativo en nuestra población, con un índice de heterocigotidad del 71,42% [17]. Sin embargo, también en nuestra muestra [17] hemos encontrado un caso de recombinación entre éste y el triplete CGG, por lo que debe considerarse una ayuda en el DP, pero no una técnica diagnóstica en sí misma. Así, por ejemplo, nos ayudó en el DP de la familia 31 (caso 1) cuando aún no habíamos puesto a punto la PCR del triplete CGG (Fig. 2). Retrospectivamente, supimos que esta niña era también heterocigota para el triplete CGG—29/18 (Tabla I)—, pero esta experiencia sirvió para aplicarla en casos similares, pero con homocigosidad del triplete CGG.

Dentro de lo que consideramos dificultades de interpretación podemos incluir los casos 8, 11 y 12, puesto que los patrones obtenidos que no se ajustan a los de normalidad o mutación completa requieren un tratamiento clínico y una casuística propia importante, así como una consulta cauta de consejo genético. El caso 8 se trataba de una mujer en su primer embarazo, tía de un chico con SXF, que no portaba el cromosoma X frágil que se segregaba en su familia, pero sí otro alelo de 50 repeticiones que diversos autores han llamado ‘zona gris’ porque puede presentar cierta inestabilidad [25], aunque parece que no lo suficiente como para dar hijos con SXF [25-27]. Aun así, en nuestras familias tenemos ocho portadoras de SXF en la zona gris (entre 50 y 60 repeticiones), tal como expusimos a la gestante, quien, a pesar de nuestra insistencia sobre su bajo riesgo, solicitó un DP. Como se ve en la tabla I, el resultado fue precisamente de un feto varón de 50 repeticiones iguales que las que llevaba la madre. Posteriormente estudiamos la transmisión de este alelo en su familia a través de varias generaciones y no encontramos variación alguna,

lo cual indicaba que no era un alelo inestable. De todas formas, el asesoramiento genético en este intervalo de 50 a 60 repeticiones es delicado al existir alelos normales o estables y alelos premutados inestables que podrían llegar incluso a pasar a mutación completa; aunque no hemos encontrado en la literatura tales casos [26,27], no puede despreciarse el riesgo y no podemos negar el DP, si se solicita, en caso de hallar estos alelos en mujeres gestantes.

Toda vía es más delicado el consejo genético cuando obtenemos fetos masculinos con la premutación porque podrían ser mosaicos e incluso mutaciones completas en tejidos fetales—estas posibilidades existen en todas las casuísticas publicadas [14,17]—. Strain et al [15] aconseja el estudio de sangre fetal, pero como recientemente han aparecido casos publicados de chicos premutados—estudiados después del parto en linfocitos de sangre—con sintomatología del SXF [28], la práctica de la funiculocentesis no aclararía al 100% el estado mental del futuro niño. Así lo creyó la pareja del caso 12, que prefirió no someterse a ese riesgo añadido.

En este DP (caso 12) nos encontramos además con una pequeña regresión madre-hijo de 73 a 70 repeticiones. Esta disminución del tamaño del triplete CGG constituye un fenómeno poco frecuente en general, pero en nuestra casuística familiar disponemos de otros cuatro casos [17], y también ha sido descrito por otros autores [25]. Se han propuesto diversos mecanismos para explicarlo, como la conversión génica, las recombinaciones anómalas o las deleciones, lo que nos conduce al caso 11, en donde sí encontramos una auténtica deleción de unas 600 pb en el cromosoma X frágil heredado de la madre. Tanto las deleciones como las regresiones se han descrito como poco frecuentes, pero están bien documentadas [29,30] y demuestran una vez más que la región del gen *FMR1* en donde se encuentra el triplete CGG es muy inestable, no sólo en cuanto a la amplificación del triplete, sino también como un ‘punto caliente’ para las deleciones. Por tanto, debemos permanecer atentos al hallazgo de estas posibilidades en DP.

A pesar de que lo hayan mencionado sobradamente todos los autores que trabajan en DP del SXF [13,27,29], no podemos dejar de comentar nuestro caso 5 de feto femenino con la mutación completa. Desde el punto de vista de la interpretación clínica, con las técnicas disponibles hoy día no puede predecirse si estas futuras niñas tendrán algún tipo de discapacidad mental, puesto que en todas las series (y también en la nuestra, datos aún no publicados) más del 50% de las mujeres con mutación completa presentan sintomatología del SXF [14]. Ésta es sin duda la gran laguna del DP del SXF, conjuntamente con lo ya comentado acerca de los fetos masculinos premutados.

En el resumen de la tabla II observamos que sólo ha habido interrupciones de embarazo en cuatro de las 14 gestaciones estudiadas, lo que demuestra una ligera segregación selectiva contra los alelos con la mutación del SXF. Otros autores [26,27] han observado este mismo fenómeno, aunque para las premutaciones bajas, y sin embargo nuestras gestantes abarcan todos los intervalos de la expansión del triplete CGG, por ello probablemente nuestros resultados pueden considerarse como un sesgo de baja casuística. Aun así, estos datos nos reafirman en la convicción de que el DP es un procedimiento clínico que, en la mayoría de los casos, sirve para asegurar y ratificar los embarazos normales y favorecer el futuro reproductivo de las portadoras.

El DP molecular del SXF es rápido y fiable al 100%, aunque desde el punto de vista técnico no resulta sencillo y requiere la utilización simultánea de varias técnicas moleculares. Clínicamente, la baja tasa de mutaciones encontradas asegura la procreación pese a que el estudio molecular no pueda predecir el estado mental en las niñas con mutación completa ni en los niños premutados.

BIBLIOGRAFÍA

- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196-7.
- Hagerman RJ. Physical and behavioral phenotype. In Hagerman RJ, Silverman AC, eds. *Fragile X syndrome: diagnosis treatment and research*. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press; 1991. p. 3-68.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, 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* 1991; 65: 906-14.
- Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetics instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-58.
- Pieretti M, Zhang F, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the *FMR1* gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66: 817-22.
- Tejada I, Boué J, Gilgenkrantz S. Diagnostic prénatal sur les cellules du liquide amniotique d'un foetus mâle, porteur du chromosome X fragile. *Ann Genet* 1983; 26: 247-50.
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boué J, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673-81.
- Hirst M, Knight S, Davies K, Cross G, Ocraft K, Raeburn S, et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. *Lancet* 1991; 338: 956-7.
- Dobkin CS, Ding XH, Jenkins EC, Krawczun MS, Brown WT, Goonerwardena P, et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. *Lancet* 1991; 338: 957-8.
- Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A, Levinson FN, Ding X, Dobkin C, et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA* 1993; 270: 1569-75.
- Chong SS, Evan EE, Nelson DL, Hughes MR. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *Am J Med Genet* 1994; 51: 522-6.
- Riggins G, Sherman S, Oostra B, Sutcliffe J, Feitell D, Nelson D, et al. Characterization of a highly polymorphic dinucleotide repeat 150 kb proximal to the fragile X site. *Am J Med Genet* 1992; 43: 237-43.
- Castellví-Bel S, Milá M, Soler A, Carrió A, Sánchez A, Villa M, et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome: (CGG)_n expansion and methylation of chorionic villus samples. *Prenat Diagn* 1995; 15: 801-7.
- 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 StB12.3: the first 2,253 cases. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 225-37.
- Strain L, Porteous MEM, Gosden CM, Ellis PM, Neilson JP, Bonthron DT. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome: management of the male fetus with a premutation. *Prenat Diagn* 1994; 14: 469-74.
- Tejada I, Mornet E, Biancalana V, Oberlé I, Boué J, Mandel JL, et al. Direct DNA analysis of fragile X syndrome in Spanish pedigrees. *Am J Med Genet* 1992; 43: 282-90.
- Durán M, Molina M, Fernández-Toral J, Martínez T, López-Aríztegui MA, Álvarez AI, 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* 2001; 54: 331-9.
- Tejada MI, Mornet E, Tizzano E, Molina M, Baiget M, Boué A. Identification by molecular diagnosis of mosaic Turner's syndrome in an obligate carrier female for fragile X syndrome. *J Med Genet* 1994; 31: 76-8.
- Tejada MI. Screening molecular de FRAXA y FRAXE en pacientes con retraso mental. *Gac Med Bilbao* 1998; 95: 77-80.
- Grasso M, Perroni L, Colella S, Piombo G, Argusti A, Lituanica M, et al. Prenatal diagnosis of 30 fetuses at risk for fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 187-90.
- Tejada MI, Durán M, Álvarez AI, Onaíndia ML, Molina M. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome: abnormal methylation in a premutated mother and in her female normal fetus in chorionic villi [abstract]. *Medizinische Genetik* 1995; 2: 152.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. DNA methylation represses *FMR1* transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 397-400.
- Sutherland GR, Gedeon A, Kornman L, Donnelly A, Byard RW, Mulley JC, et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N Engl J Med* 1991; 325: 1720-2.
- Devys D, Biancalana V, Rousseau F, Boué J, Mandel JL, Oberlé I. Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicates that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am J Med Genet* 1992; 43: 208-16.
- Murray A, Macpherson JN, Pound MC, Sharrock A, Youngs SA, Dennis NR, et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 173-84.
- Pesso R, Berkenstadt M, Cuckle H, Gak E, Peleg L, Frydman M, et al. Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. *Prenat Diagn* 2000; 20: 611-4.
- Kallinen J, Heinonen S, Mannermaa A, Ryyänänen M. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome and the risk of expansion of a premutation. *Clin Genet* 2000; 58: 111-5.
- Teague JW, Morton NE, Dennis NR. FRAXA and FRAXE: evidence against segregation distortion and for an effect of intermediate alleles on learning disability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 719-24.
- De Graaff E, Rouillard P, Willems PJ, Smits APT, Rousseau F, Oostra BA. Hotspot for deletions in the CGG repeat region of *FMR1* in fragile X patients. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 45-9.
- Van den Ouweland A, Deelen WH, Kunst CB, Giovannucci-Uzielli ML, Nelson D, Warren ST, et al. Loss of mutation at the *FMR1* locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes. *Hum Molec Genet* 1994; 3: 1823-7.

LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME X FRÁGIL MEDIANTE EL DIAGNÓSTICO PRENATAL GENÉTICO: VENTAJAS Y ASPECTOS CONTROVERTIDOS

Resumen. Introducción. El síndrome X frágil es la causa más común de retraso mental hereditario. Desde el descubrimiento, hace justo diez años, del mecanismo molecular que lo produce (expansión anómala del triplete CGG en el gen *FMR1* e hipermetilación de su isla CpG), el diagnóstico prenatal genético se ha podido ofertar con total fiabilidad a las familias que transmiten el síndrome. Objetivo. Presentar y discutir nuestra experiencia en este campo, desde el año 1994 hasta la actualidad. Pacientes y métodos. Hemos realizado en este período 15 diagnósticos prenatales: 14 en muestras de vellosidades coriales de 13 gestaciones (una de ellas gemelar) y uno en líquido amniótico. En todos ellos hemos utilizado las técnicas moleculares de Southern blotting con la sonda StB12.3, la PCR del triplete CGG y el DXS548 en algunos. Resultados. Nueve fetos fueron normales y, de los otros seis, tres portaban la mutación completa, uno llevaba una delección del gen *FMR1*, otro era premutado, y el último llevaba un alelo en la zona gris (50 repeticiones). Conclusiones. El diagnóstico prenatal molecular del SXF es rápido y fiable al 100%, aunque, desde el punto de vista técnico no es sencillo, y requiere a la vez la utilización de varias técnicas moleculares. Desde el punto de vista clínico, la baja tasa de mutaciones encontradas asegura la procreación, aunque el estudio molecular no predice el estado mental, ni en las niñas con la mutación completa, ni en los niños premutados. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S14-9]

Palabras clave. Diagnóstico prenatal. FRAXA. Microsatélite DXS548. PCR. Síndrome X frágil. Triplete CGG.

A PREVENÇÃO DA SÍNDROMA X FRÁGIL MEDIANTE O DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL GENÉTICO: VANTAGENS E ASPECTOS CONTROVERSOS

Resumo. Introdução. A síndrome X frágil é a causa mais comum de atraso mental hereditário. Desde a descoberta, há sensivelmente dez anos, do mecanismo molecular que o produz (expansão anómala do triplete CGG no gene *FMR1* e hipermetilação da sua ilha CpG), o diagnóstico pré-natal genético pode ser disponibilizado com toda a confiança às famílias em que existe transmissão desta síndrome. Objectivo. Apresentar e discutir a nossa experiência neste campo, desde o ano de 1994 até à data. Doentes e métodos. Realizámos neste período 15 diagnósticos pré-natais: 14 em amostras de vilosidades coriais de 13 gestações (uma das quais gemelar) e 1 em líquido amniótico. Em todos utilizámos as técnicas moleculares de Southern blotting com a sonda StB12.3, a PCR do triplete CGG e o DXS548 em alguns. Resultados. Nove fetos foram normais e dos 6 restantes, três traziam a mutação completa, um apresentava uma deleção do gene *FMR1*, outro era permutado, e o último apresentava um alelo na zona cinzenta (50 repetições). Conclusões. O diagnóstico pré-natal molecular da SXF é rápido e fiável a 100%, embora sob o ponto de vista técnico não seja simples, uma vez que requer a utilização de várias técnicas moleculares. Sob o ponto de vista clínico, o baixo índice da taxa de mutações encontradas assegura a procriação, embora o estado molecular não faça a predição do 'status' mental, nem nas meninas com a mutação completa, nem nas crianças prematuras. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S14-9]

Palavras chave. Diagnóstico pré-natal. FRAXA. Microsatélite DZS 548. PCR. Síndrome X frágil. Triplete CGG.