

## CASOS CLÍNICOS

## X frágil en una niña: características clínicas y del genotipo

MC Vega<sup>1</sup>, I Ramos<sup>1</sup>, A Márquez<sup>1</sup>, J González<sup>1</sup>, R Martínez<sup>2</sup>, V Bonilla<sup>2</sup>,  
M Lucas<sup>2</sup>, E Pintado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Maduración. Servicio de Pediatría. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El síndrome X frágil (SXF) es la forma más común de retraso mental heredado<sup>1,2</sup>. Es transmitido como una enfermedad dominante ligada al cromosoma X con dominancia incompleta y está causada por una expansión repetitiva del triplete CGG situado en la zona transcrita, pero no traducida, del primer exón del gen FMR1<sup>3</sup>. La repetición del triplete CGG puede ser clasificada en al menos 4 grupos basados en el tamaño de la repetición y la frecuencia en la población<sup>4</sup> (figura 1):

- común: 6-45 repeticiones
- intermedia o "zona gris": 45-60 repeticiones
- premutación: 61-200 repeticiones
- mutación completa: más de 200 repeticiones

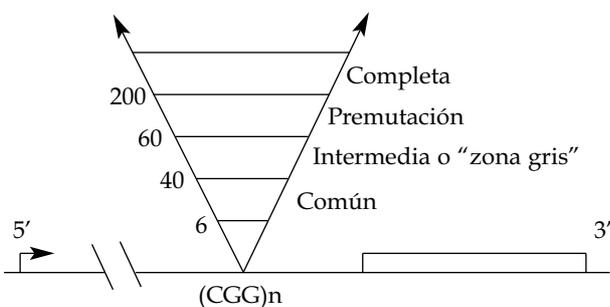


Figura 1.

Entre la población normal, las repeticiones comunes son transmitidas de los padres a la descendencia de una manera estable. Los alelos intermedios suelen ser transmitidos de forma estable o expandirse en raras ocasiones. Los alelos premutados son inestables y tienden a expandirse en las siguientes generaciones si el alelo se transmite por vía materna. En las premutaciones, la isla CpG del promotor no se metila y no suele aparecer sintomatología. Los alelos mutados se acompañan de la metilación aberrante del promotor,

con el consiguiente silenciamiento del gen y falta de expresión de la proteína FMRP<sup>5</sup>, causando los síntomas característicos de este síndrome, siendo el principal el retraso mental<sup>6,7</sup>. Esto es debido a que la proteína FMRP regula la producción de proteínas cerebrales al unirse a las moléculas de ARNm de estas proteínas. En estudios neuronales recientes hay evidencias de que la proteína FMRP está localizada en la sinapsis neuronal y la pérdida de ésta altera la plasticidad sináptica implicada en el aprendizaje y la memoria.

Las mujeres con la mutación completa en general están menos afectadas que los varones, debido posiblemente a la inactivación preferente del cromosoma X frágil.

Se presentan las características clínicas y genotípicas de una niña con SXF que muestra un fenotipo como el de un niño afectado y una inactivación completa del cromosoma X que contiene el gen FMR1 normal.

## CASO CLÍNICO

## Anamnesis

Niña remitida por su pediatra a la edad de un año a la Unidad de Maduración por retraso psicomotor (sedestación al 9º mes, volteo pero no arrastre ni gateo; silabea pero no dice bisílabos). Se objetiva un retraso psicomotor leve en todas las áreas con un cociente de desarrollo de 69 y se aconseja estimulación precoz. Al año y medio de edad llama la atención el fenotipo característico de la niña que a continuación se detalla.

Entre los antecedentes familiares destacar la presencia de un tío-abuelo materno y una tía materna con retraso mental. Los padres, aparentemente no consanguíneos, muestran unas habilidades cognitivas normales.

## Exploración

Peso: 10 Kg (P25). Longitud: 83,5 cm (P75). Perímetro craneal: 49 cm (P90). Los rasgos físicos incluyen cara



Figura 2. Fotografía de la niña donde puede observarse la cara estrecha y alargada y las orejas prominentes.

estrecha y alargada, orejas prominentes y articulaciones hiperextensibles. La evaluación neuropsicológica muestra una atención escasa, retraso en el discurso, aleteo con los brazos, torpeza motora tanto fina como gruesa, timidez y contacto visual escaso. La evaluación a través de tests estandarizados no es posible en esta paciente a causa de su ausencia de empatía (no quiere jugar y llora continuamente) (figura 2).

#### Juicio clínico

Se emite el juicio clínico de retraso madurativo global leve-moderado.

Ante los hallazgos clínicos y los antecedentes familiares se valora la posibilidad de que la niña presente un SXF y se le solicita un cariotipo y un estudio molecular de X frágil. El primero fue normal pero en el segundo se confirma la sospecha clínica, encontrándose que es portadora de una mutación completa del gen FMR1 y además presenta una inactivación completa del cromosoma X normal. Esto nos conduce a estudiar también a su familia.

#### Exámenes complementarios

*a) Evaluación por oftalmología y audiolología:* normal.

*b) Ecocardiografía:* se realiza una ecocardiografía a la niña (IV), la madre (III-2) y la tía materna (III-3) con el objetivo de descartar la presencia de un prolapso valvular mitral y/o una dilatación aórtica. Todas son normales.

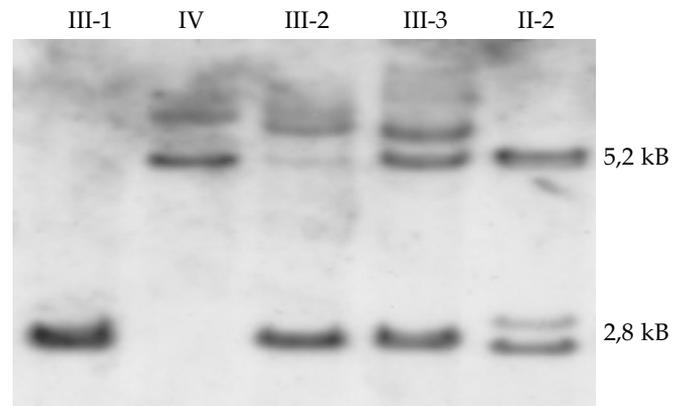


Figura 3. Análisis por Southern blot del gen FMR1 de la niña con SXF (IV) y la familia.

*c) Cariotipo:* fórmula cromosómica 46,XX.

*d) Estudio genético molecular de SXF de la niña*

(IV): La técnica de Southern blot permite estudiar el tamaño de la expansión (CGG)<sub>n</sub> y el estado de metilación de la isla CpG adyacente al gen FMR1. El ADN se digiere con las enzimas de restricción EcoR I y Eag I, esta última sensible a metilación, y se hibrida con la sonda StB 12,3. En un hombre normal se obtendrá solamente una banda no metilada de 2,8 Kb, mientras que una mujer normal mostrará una banda no metilada de 2,8 Kb y una banda metilada de 5,2 Kb que corresponden al gen FMR1 normal presente en el cromosoma X activo e inactivo, respectivamente. En el caso de la niña (IV) se observa un alelo expandido con un tamaño de 8 Kb aproximadamente. El alelo de tamaño normal procedente del padre se encuentra 100% metilado (ausencia total de la banda no metilada de 2,8 Kb). Por tanto, existe una inactivación total del alelo normal (figura 3).

Se ha descartado la existencia de una mutación en el promotor del gen FMR1 que explique el patrón observado en el Southern mediante PCR de la zona promotora y posterior secuenciación.

El análisis por Western blot permite el estudio de la expresión de la proteína FMRP. Se ha realizado en linfocitos de sangre periférica y en raíces de cabello. El Western blot de la niña muestra niveles prácticamente nulos de proteína FMRP en sangre (figura 4) y bajos niveles en el bulbo piloso (figura 5).

*e) Estudio genético molecular de SXF de la familia:*

El análisis por Southern blot (figura 3) del gen FMR1 del padre (III-1) es normal; la madre (III-2) y la tía materna (III-3), la cual presenta retraso mental, son portadoras de una mutación completa. La abuela materna (II-2) es portadora de una premutación. El

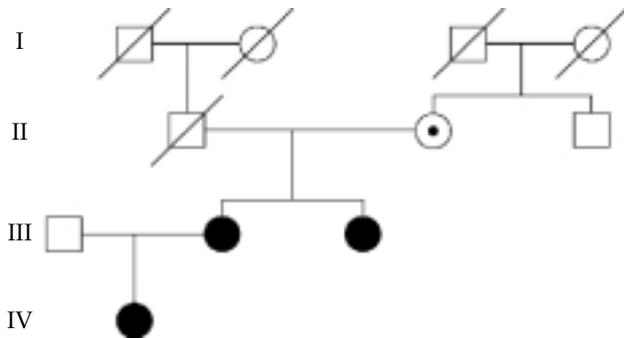


Figura 4. Pedigrí de la familia de la niña con SXF (IV). Los símbolos negros señalan los miembros familiares con una mutación completa y los símbolos de punto los miembros que son portadores de una premutación. Una cuestión muestra un individuo masculino que no está estudiado pero que probablemente esté afectado con una mutación completa, ya que presenta retraso mental.

tío-abuelo materno (II-3) no está estudiado (no lo ha permitido la familia) pero probablemente esté afectado con una mutación completa, ya que presenta retraso mental.

El análisis por Western blot en sangre (figura 5) muestra niveles normales de proteína FMRP en la madre y la abuela materna y descendidos en la tía materna.

El marcador polimórfico del tipo microsatélite, DXS548, que cosegrega con FRAXA, está situado a 150 Kb en dirección centromérica al gen FMR1. Se amplifica por PCR y se carga en gel de acrilamida desnaturado. El resultado de este análisis no es informativo, ya que no existen diferencias entre la niña y los restantes miembros familiares, siendo todas las mujeres del estudio homocigotas (figura 6).

**TRATAMIENTO**

El tratamiento ha consistido en la estimulación precoz, impartida por el equipo de Atención Temprana del Centro de Valoración y Orientación de Sevilla junto con el seguimiento semestral de la niña en la Unidad de Maduración de nuestro hospital.

**DISCUSIÓN**

El SXF es la forma más común de retraso mental heredado con una incidencia estimada en todo el mundo de 1/4.000 hombres y 1/6.000 mujeres. En el caso de portadores se estima su frecuencia en 1/800 hombres

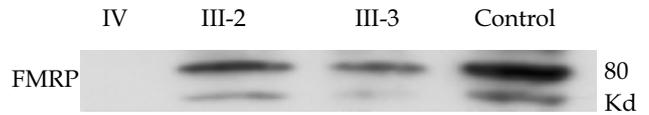


Figura 5. Western blot en sangre en el que pueden verse niveles prácticamente nulos de FMRP detectados en la niña (IV)-línea 1. La línea 2 muestra la proteína extraída de la madre (III-2), la línea 3 de la tía materna (III-3), y la línea 4 de un control normal mujer.

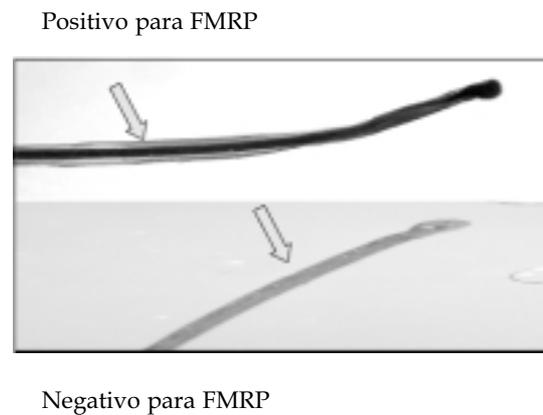


Figura 6. Detección por inmunohistoquímica de la proteína FMRP en bulbo piloso. En la parte de arriba se muestra el cabello de la madre (III-2), en el que se ve una zona periférica roja que corresponde a la expresión normal de la proteína FMRP. En la parte de abajo se muestra el cabello de la niña (IV) en el que no se observa expresión de la proteína.

y 1/260 mujeres<sup>1,2</sup>. En nuestro país no hay un censo que contemple la totalidad de casos. En el trabajo realizado por De Diego *et al.*<sup>8</sup> se obtiene una frecuencia de SXF entre la población con retraso mental de etiología desconocida de Andalucía de un 6,5%.

La edad media de diagnóstico ha disminuido y en nuestro entorno se ofrecen cifras que han pasado de los 20 años en la década de los setenta, a los 3 años en la actualidad. Si se conoce el síndrome, el diagnóstico de sospecha y la confirmación se puede efectuar a edades tempranas. En nuestro caso, el fenotipo de la niña (cara estrecha y alargada, orejas prominentes, articulaciones hiperextensibles, retraso en el discurso, aleteo con los brazos, timidez y un contacto visual escaso), similar al que presentan los niños afectados de SXF, junto con los antecedentes familiares de retraso mental, permitieron un diagnóstico precoz y con ello un abordaje terapéutico adecuado y el estudio familiar para asesoramiento genético.

La clínica clásica descrita en varones con el SXF incluye un fenotipo físico y un fenotipo conductual. El fenotipo físico se caracteriza por cara estrecha y alargada, mentón y orejas prominentes, macrocefalia, macroorquidismo, articulaciones hiperextensibles, alteraciones cardíacas, estrabismo. El fenotipo conductual incluye retraso psicomotor, trastornos del lenguaje, alteraciones de la conducta –hiperactividad y déficit de atención, aleteo de manos, timidez, pobre contacto visual, estereotipias de mordeduras de manos, problemas de integración sensorial y trastornos del sueño-.

El diagnóstico precoz de los individuos afectados con SXF ofrece la posibilidad de que estos puedan ser tratados adecuadamente por un equipo multidisciplinar, con seguimiento médico, tratamiento farmacológico si precisan y con programas de estimulación precoz, integración sensorial, tratamiento psicopedagógico y conductual que permitirán desarrollar al máximo sus potenciales individuales y proporcionarán una mejor integración en esta sociedad<sup>9</sup>.

El consejo genético permite a las familias afectadas la posibilidad de tener descendencia sin riesgos de transmitir esta patología mediante el diagnóstico prenatal molecular (Southern blot y PCR fundamentalmente en muestras de líquido amniótico o de vellosidades coriales)<sup>10</sup> o como alternativas los diagnósticos preimplantacional y preconcepcional<sup>11</sup>.

Los métodos de diagnóstico habituales para la detección de pacientes con el SXF son el Southern blot y la PCR del locus FRAXA. Un método de diagnóstico alternativo es la determinación de la expresión de FMRP en los linfocitos de sangre periférica, y más recientemente en raíz de cabello<sup>12,13</sup>. La elección de este tejido se debe a que las células epiteliales y el sistema nervioso derivan de la misma hoja embrionaria (ectodérmica) durante el desarrollo, de forma que la expresión observada en las células epiteliales debería reflejar mejor lo que ocurre en las neuronas. Los estudios publicados hasta el momento han mostrado que la detección de FMRP en la raíz del cabello es apropiada para el cribado de poblaciones por la baja invasividad de la técnica de obtención de la muestra y por su rapidez y facilidad. El test tiene una buena correlación con el coeficiente intelectual de hombres y mujeres afectados, por lo que puede utilizarse para la predicción de la función cognitiva en mujeres portadoras de la mutación completa.

Aquí presentamos una niña con una mutación completa, así como a su madre, tía y abuela maternas. La niña muestra retraso mental moderado y clínica característica de un niño afectado, mientras que su

madre y tía, ambas también con mutación completa, presentan, la primera unas habilidades cognitivas normales y la segunda un retraso ligero. El Southern blot y el análisis de expresión de FMRP mostró que la niña tenía el gen FMR1 normal totalmente metilado (sesgo del 100%) y la proteína casi indetectable. La madre muestra una inactivación del cromosoma normal de aproximadamente un 20% y tiene unos niveles de FMRP normales. Sin embargo, la tía, que tiene una expansión de la misma magnitud que la madre, tiene menores niveles de FMRP probablemente debido a una inactivación del cromosoma X normal del 50%, superior al de su hermana y que se relacionaría con un mayor déficit cognitivo. La abuela materna, portadora de una premutación, tiene niveles normales de proteína FMRP.

La inactivación completa del cromosoma X que contiene el gen FMR1 normal explica la severidad del fenotipo X frágil observado en la niña, habiéndose encontrado sólo otro caso publicado de un sesgo del 100% en una paciente X frágil<sup>4</sup>. Nosotros proponemos que las diferencias fenotípicas observadas entre la niña y los otros miembros familiares están causadas por la inactivación sesgada del cromosoma X afecto de X frágil. Esta hipótesis está en concordancia con otras publicaciones<sup>14-16</sup> que muestran que, un incremento en la proporción de cromosomas X activos que contienen el gen FMR1 normal como resultado de la inactivación sesgada del X, está asociado con un descenso de la severidad del fenotipo X frágil.

Sería interesante estudiar en esta paciente (IV) las causas moleculares de la inactivación sesgada del cromosoma X. Se ha visto en los ratones que la elección de la inactivación de X depende de elementos genéticos localizados en el cromosoma X y en otros genes autosómicos<sup>17</sup> y dichos loci también se están estudiando en humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. De Vries B, 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 Human Genet* 1997;61:660-667.
2. Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of Fragile X Syndrome. *Am J Med Genet* 1996;64:196-7.
3. Pintado E, Morón FJ. Metilación y expresión del gen FMR1. *Rev Neurol* 2001;33 (supl 1):S 57-62.
4. Heine-Suñer D, Torres-Juan L, Morlá M, Busquets X, Barceló F, Picó G, *et al.* Fragile-X syndrome and skewed X-

- chromosome inactivation within a family: a female member with complete inactivation of the functional X chromosome. *Am J Med Genet* 2003;122A:108-114.
5. O'Donnell WT, Warren ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:315-338.
  6. Ferrando-Lucas MT, Banús-Gómez P, López-Pérez G. Aspectos cognitivos y del lenguaje en niños con síndrome X frágil. *Rev Neurol* 2003;36 (supl 1):S 137-142.
  7. Artigas-Pallarés J, Brun-Gasca C. ¿Se puede atribuir el fenotipo conductual del síndrome X frágil al retraso mental y al trastorno por déficit de atención/hiperactividad? *Rev Neurol* 2004;38(1):7-11.
  8. De Diego Y, Hmadcha A, Morón F, Lucas M, Carrasco M, Pintado E. Fragile X founder effect and distribution of CGG repeats among the mentally retarded population of Andalusia, South Spain. *Genetics and Molecular Biology* 2002;25(1):1-6
  9. Vallejo de Torres G. El síndrome X Frágil: Aspecto familiar. *Ped Rur Ext* 2002;32:75-86.
  10. Tejada MI. La prevención del síndrome X frágil mediante el diagnóstico prenatal genético: ventajas y aspectos controvertidos. *Rev Neurol* 2001;33 (supl 1):14-19.
  11. Milá M, Mallolas J. Síndrome del cromosoma X frágil: menopausia precoz. Diagnóstico preimplantacional y preconcepcional. *Rev Neurol* 2001;33 (supl 1):20-23.
  12. Ramos-Fuentes FJ. Nuevos métodos de diagnóstico del síndrome X frágil: estudio de la FMRP en sangre y pelo. *Rev Neurol* 2001;33 (supl 1):9-13.
  13. Rifé Soler M, Sánchez Díaz A, Ramos F, Milá Recasens M. Estudio de la proteína FMRP en la raíz de cabello: aplicación al diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil. *An Pediatr* 2003;59 (5):431-435.
  14. Reiss AL, Freund LS, Baumgardner TL, Abrams MT, DencKla MB. Contribution of the FMR1 gen mutation to human intellectual dysfunction. *Nat Genet* 1995;11:331-334.
  15. De Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, *et al.* Mental status of females with an FMR1 gen full mutation. *Am J Med Genet* 1996;64:302-308.
  16. Willmesen R, Olmer R, De Diego Otero Y, Oostra BA. Twin sisters, monozygotic with the fragile X mutation, but with different phenotype. *J Med Genet* 2000;37:603-604.
  17. Percec I, Plengue RM, Nadeau JH, Bartolomei MS, Willard HF. Autosomal dominant mutations affecting X inactivation choice in the mouse. *Science* 2002;296:1136-1139.