



**Universidad
Zaragoza**



**Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza**

Trabajo fin de máster

**Estudio retrospectivo de la premutación en
el gen FMR1 en población residente en
Aragón. Posibilidades de repercusión en la
clínica**

Alumna: Noelia Cuadrado Lasheras

Director: Dr. Manuel Guerra Sánchez

Codirectora: Dra. Silvia Izquierdo Álvarez

Convocatoria: Junio 2016

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2.1. El gen <i>FMR1</i> | 4 |
| 2.2. La proteína FMRP | 5 |
| 2.3. Inestabilidad de las repeticiones CGG y herencia | 5 |
| 2.4. Diagnóstico genético | 5 |
| 2.5. Patologías asociadas a la premutación del gen <i>FMR1</i> | 8 |
| 2.5.1. FXPOI..... | 10 |
| 2.5.2. FXTAS | 11 |
| 2.6. Características clínicas de los trastornos asociados a la premutación en el gen <i>FMR1</i> . 13 | |
| 3. OBJETIVOS | 21 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| 5. RESULTADOS | 23 |
| 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 40 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 44 |

1. RESUMEN

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica.

RESUMEN: El gen FMR1 en estado mutado provoca el síndrome X Frágil, pero en su estado premutado produce un amplio espectro de trastornos. Durante años se pensó que los portadores de la premutación no presentaban ninguna manifestación clínica, tan sólo el riesgo de transmitir el síndrome X Frágil a sus descendientes. Pero en los últimos años los estudios realizados han demostrado claros riesgos de salud asociados con las expansiones FMR1 en el rango de la premutación. Las alteraciones asociadas aceptadas actualmente y basadas en estudios científicos son: problemas emocionales y psicológicos, insuficiencia ovárica prematura (FXPOI) y síndrome de temblor-ataxia (FXTAS). Aunque todavía se siguen describiendo fenotipos asociados a la premutación. Estos trastornos existen en un subgrupo de los individuos con premutación, con trayectorias y síntomas específicos asociados. También se han descrito varias dificultades médicas, emocionales y cognitivas que ocurren con mayor frecuencia entre las personas con premutación de lo que se esperaría en la población general, aunque la asociación de la premutación con muchas de estas condiciones está peor establecida.

Los objetivos que nos planteamos en este trabajo son determinar la frecuencia de la premutación entre las muestras analizadas para X Frágil en Aragón, precisar la proporción en adultos y en niños, también la distribución en hombres y mujeres, averiguar la prevalencia de fallo ovárico precoz en mujeres premutadas, así como de FXTAS en el total de pacientes premutados, y estudiar la posibilidad de otras manifestaciones clínicas asociadas. También queremos estudiar la frecuencia de la mutación C677T de MTHFR en las muestras con premutación. Y por último, determinar el número de interrupciones AGG que se localizan en las mujeres premutadas, ya que pueden intervenir en la probabilidad de expansión del alelo en la siguiente generación.

PROJECT TITLE: A retrospective study of the premutation in the FMR1 gene in population resident in Aragon. Possibilities of impact in the clinic.

SUMMARY: The FMR1 gene mutated state causes Fragile X syndrome, but in its premutation state produces a wide spectrum of disorders. For years it was thought that premutation carriers showed no clinical manifestation, only the risk of transmitting Fragile X syndrome to their offspring. But in recent years studies have shown clear health risks associated with expansions in FMR1 premutation range. Associated alterations currently accepted and based on scientific studies they are: emotional and psychological problems, premature ovarian failure (FXPOI) and tremor-ataxia (FXTAS) syndrome. There's still describing phenotypes associated with the premutation. These conditions exist in a subgroup of individuals with premutation, with paths and specific symptoms associated. They have also described several medical, emotional and cognitive difficulties occur more often among individuals with premutation of what would be expected in the general population, although the association of the premutation with many of these conditions is less well established.

The objectives we set in this work are to determine frequency of premutation among the samples tested for Fragile X in Aragon, specify the proportion in adults and children, also the distribution in men and women, to find out the prevalence of premature ovarian failure premutated women, as well as FXTAS in total premutation patients and consider other associated clinical manifestations. We also want to study the frequency of the C677T mutation in MTHFR of samples with premutation. And finally, determine the number of AGG interruptions that are located in the premutated women because it can intervene in the probability of allele expansion in the next generation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El gen *FMR1*

El gen *FMR1* (por sus siglas en inglés “Fragile X mental retardation 1”) se descubrió en 1991 y se llamó así por su papel como el gen causante del síndrome X frágil (SXF) [1]. La descripción inicial como síndrome X frágil (SXF) corresponde a Lubs en 1969 [2], que asoció al cuadro clínico la presencia de un cromosoma X marcador. El cromosoma X mostraba una fragilidad en su parte más distal de los brazos largos, de ahí el nombre del síndrome. Ya en 1991 se identificó la alteración molecular que causaba el síndrome. Se trataba del primer síndrome descrito causado por una mutación dinámica: la expansión de un trinucleótido citosina-guanina-guanina (CGG) localizado en la región 5’ no codificante del primer exón del gen *FMR1*.

El gen *FMR1* codifica para una proteína llamada FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) cuya ausencia es la responsable del SXF. El gen contiene 17 exones y genera diversos transcritos alternativos. La expansión del trinucleótido CGG es la causante del síndrome en la gran mayoría de los casos [3]. En un 1–2% de los casos, el SXF está causado por otro tipo de mutaciones, como deleciones o mutaciones puntuales, pero siempre que conlleven la pérdida de función del gen [3].

En la población general el número de repeticiones CGG es polimórfico, variando de 6 a 44, siendo el alelo con 29-30 repeticiones el más frecuente. Los alelos de este rango de repeticiones se transmiten de forma mendeliana estable. Se pueden distinguir 4 rangos de repeticiones del triplete CGG que se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de alelos en el gen *FMR1* según su número de repeticiones CGG.

| Nº repeticiones CGG | Carácter de los alelos |
|---------------------|------------------------|
| 6 – 44 | Rango normal (sano) |
| 45 – 54 | Zona gris - intermedio |
| 55 – 200 | Premutación (PM) |
| >200 | Mutación completa (MC) |

Los alelos que contienen entre 45 y 54 repeticiones CGG se conocen como alelos intermedios (o alelos en la “zona gris”). Estos alelos que constituyen el intervalo entre alelos normales y premutados, pueden ser estables o inestables. Esta estabilidad se ha relacionado con la presencia de tripletes adenina-guanina-guanina (AGG) que interrumpen la secuencia CGG y que generalmente se presentan cada 9 ó 10 repeticiones CGG. Recientemente se ha resaltado la necesidad de cuantificar el número de interrupciones AGG, especialmente en mujeres con alelos en el rango de zona gris, para poder realizar una estimación del riesgo de expansión del triplete CGG en la descendencia y poder ofrecer un adecuado asesoramiento genético [4].

Las interrupciones AGG juegan un papel protector desestabilizando las estructuras secundarias atípicas [5]. Dichas interrupciones tienen la capacidad de modular el comportamiento del tracto repetido en el gen empaquetado, conteniendo la expansión y manteniendo la correcta organización funcional del gen *FMR1*. Estas interrupciones AGG se presentan generalmente cada 9 ó 10 repeticiones CGG, de la siguiente manera:



Los alelos comprendidos entre 55 y 200 repeticiones del triplete CGG se denominan premutados (PM). Los individuos portadores de estos alelos no manifiestan el SXF, pero pueden transmitirlo ya que estos alelos son inestables al pasar de generación en generación y tienden a aumentar de tamaño. Ni la isla CpG adyacente ni el promotor tienen una metilación anormal.

Las expansiones de más de 200 repeticiones forman la llamada mutación completa (MC), ver Tabla 2; que causa el SXF. La patología se debe a que el gen sufre una pérdida de función y por lo tanto hay una ausencia de la proteína FMRP. La inactivación del gen está causada por una hipermetilación de las repeticiones CGG y de la región promotora del gen (isla CpG). Las expansiones en el rango de la MC son inestables tanto en meiosis como en mitosis.

Desde su descubrimiento se han realizado avances importantes en la comprensión de las expresiones fenotípicas de los alelos mutados. El fenotipo de los individuos con SXF incluye discapacidad intelectual, hiperactividad, dificultades sociales, ansiedad, agresividad y trastorno del espectro autista (TEA) o rasgos autistas [6].

Tabla 2. Variación del número CGG en el gen FMR1

| (CGG)n | Isla CpG | FMRP | ESTATUS | FENOTIPO |
|----------|-------------|----------|-------------------|--|
| 6 – 54 | No metilada | Positivo | Normal | Normal |
| 55 – 200 | No metilada | Positivo | Premutación | FXPOI, FXTAS, otros <i>Penetrancia reducida</i> |
| > 200 | Metilada | Negativo | Mutación completa | SXF <i>Varones afectados, 50% mujeres afectas</i> |

2.2. La proteína FMRP

La falta de la proteína FMRP codificada por el gen *FMR1* [7] es la responsable de las manifestaciones clínicas que presentan los afectados. Aunque no se conoce exactamente su función, sí se sabe que se trata de un factor de transcripción que se une al mRNA. Como todas las proteínas, la FMRP es sintetizada en el citoplasma, pero parte de ella vuelve al núcleo. Se expresa ubicuamente y durante toda la vida postnatal. Tiene un papel fundamental en la sinapsis y en el normal desarrollo de las dendritas. Este papel como factor de transcripción explicaría la complejidad fenotípica del síndrome y la expresividad variable que muestra.

Por mecanismos todavía no bien conocidos, los alelos con MC se acompañan de hipermetilación de los propios CGG y del promotor, ocasionando el silenciamiento transcripcional del gen *FMR1* y el subsiguiente descenso o ausencia de la producción de FMRP.

2.3. Inestabilidad de las repeticiones CGG y herencia

Las mutaciones que afectan a la región polimórfica CGG son dinámicas y pueden cambiar la estabilidad de las repeticiones tanto en células somáticas como germinales, tras la proliferación mitótica, favoreciendo así la expansión de los alelos a lo largo de las generaciones.

Las premutaciones cuando son transmitidas por mujeres tienen riesgo de expandirse a MC. El riesgo de transmisión es fuertemente dependiente del tamaño de la premutación materna, y se sitúa alrededor del 98% para alelos con >100 repeticiones [8]. El alelo más pequeño que se ha expandido a MC en una sola generación y sin ninguna interrupción AGG es de 56 CGG [9].

En el rango bajo de la premutación, para estimar el riesgo se tienen en cuenta la estructura AGG y la longitud de la secuencia CGG por el extremo 3' que no se encuentra interrumpida.

2.4. Diagnóstico genético

La detección del número de repeticiones se realiza mediante un análisis molecular que determina el número preciso de repeticiones del triplete CGG en el gen *FMR1*. Actualmente el estudio citogenético no se acepta como prueba diagnóstica.

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

Anteriormente y debido a la falta de precisión de los métodos diagnósticos, no se consideraban los mismos intervalos del estado de alteración del gen FMR1, y no existía el rango “intermedio” o “gris”. Tampoco era obligatorio informar del número de repeticiones CGG cuando el alelo detectado era “normal”. Pero las guías y recomendaciones elaboradas por las diferentes sociedades científicas para el análisis molecular se van actualizando y de esta manera se van implementando los últimos avances en los laboratorios de diagnóstico clínico [8].

A continuación se explican las diferentes técnicas que se han ido implementando en los laboratorios de diagnóstico genético con el curso de los años:

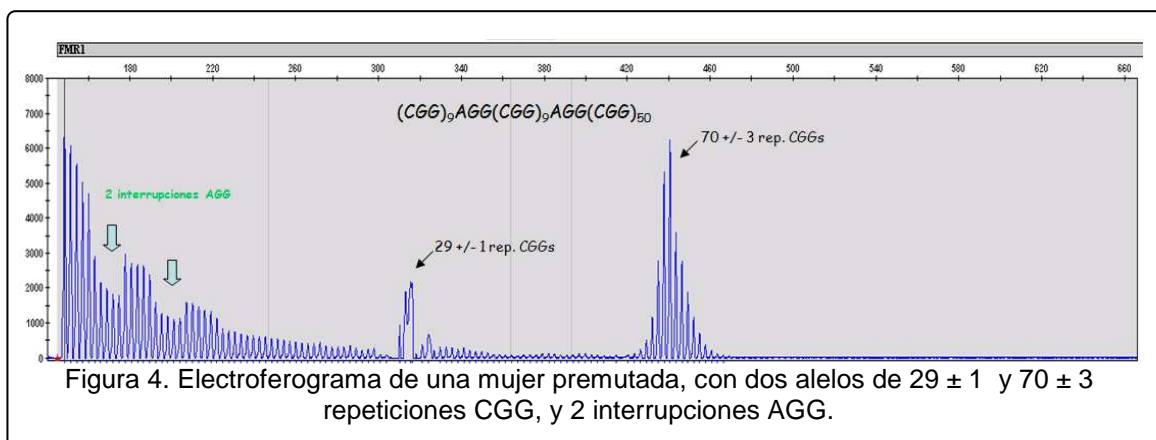
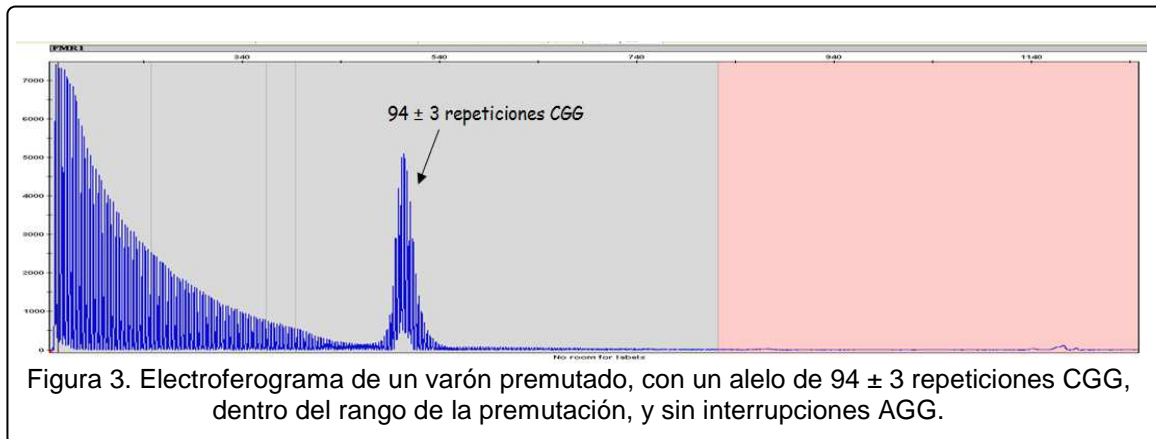
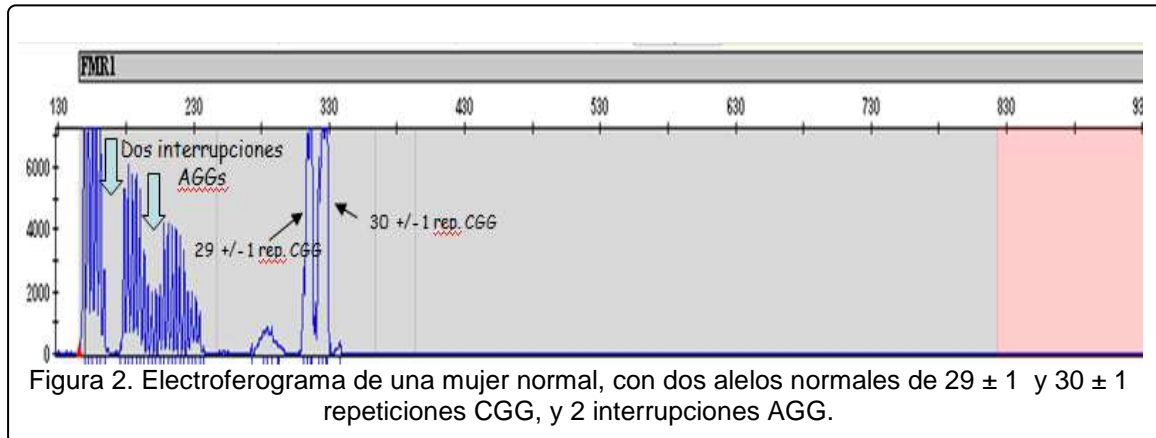
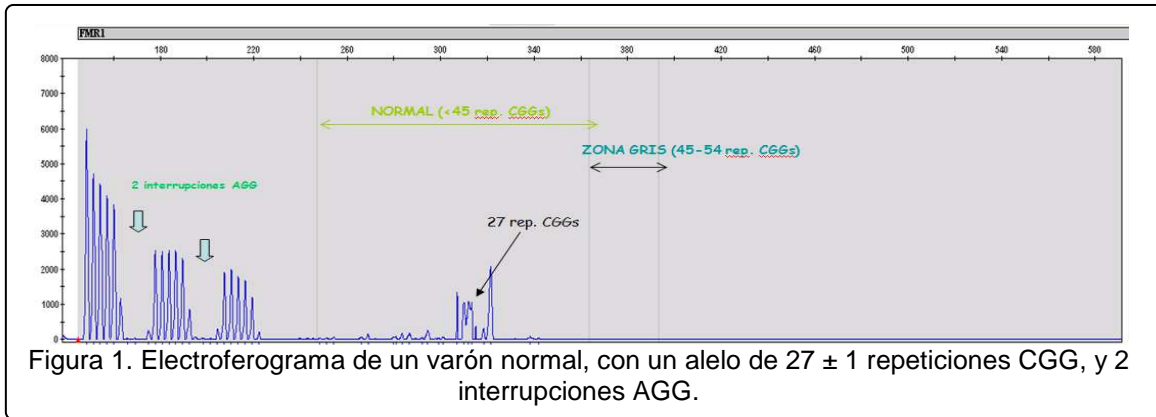
PCR: La metodología más rápida y precisa es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este estudio, mediante la medida del tamaño del producto de PCR, permite determinar el número de repeticiones CGG. La limitación de esta técnica es que no detecta expansiones de más de 200 repeticiones aproximadamente (según el diseño utilizado), y por lo tanto no es capaz de determinar MC. Tampoco da información acerca de la metilación y no permite distinguir entre una mujer homocigota (20–30% de la población) y una mujer con un alelo en el rango normal y otro expandido. Esta limitación del método se debe a dos factores: 1. Los tamaños de los alelos son en ocasiones muy largos y la enzima polimerasa no puede amplificar fragmentos tales; 2. Debido al alto contenido en nucleótidos guanina y citosina (GC), la molécula de ADN moldea formas estructurales secundarias que son difíciles de desnaturalizar lo que impide el acceso de la enzima al sitio de elongación. En varones, la ausencia de producto de PCR indica la presencia de un alelo expandido patológico. Una vez más, la técnica no ofrece máxima fiabilidad, ya que no es posible saber si la ausencia de amplificado se debe a la presencia de dicho alelo, o al fallo de la propia técnica de PCR.

Southern Blot: Hasta hace poco el análisis por Southern Blot por doble digestión con enzimas sensibles a la metilación (EcoRI y EagI) era el método de elección para muchos expertos para determinar grandes expansiones y el estado de metilación. El método combina una PCR con una digestión que utiliza enzimas sensibles a la metilación y que permite obtener información acerca del estado de metilación de las repeticiones y de la isla CpG. Ésta es una técnica laboriosa que requiere de varios días de trabajo y grandes cantidades de ADN. Además de estimaciones imprecisas del número de repeticiones y al ser una técnica tan laboriosa la variabilidad incluso intra-laboratorio es elevada. Sin embargo la aparición en el mercado de nuevos kits comerciales de diagnóstico, tanto de PCR fluorescente como de triplet repeat primed PCR (TP-PCR), han simplificado mucho el trabajo y hecho que se vaya sustituyendo.

TP-PCR: La TP-PCR es una modificación de la PCR básica. El método fue desarrollado por Warner y col. [10] para detectar alelos expandidos en distrofia miotónica, pero también ha sido implementado para el SXF y para otras enfermedades provocadas por expansión de trinucleótidos. El ensayo utiliza 3 cebadores. Uno de ellos marcado con carboxifluoresceína (FAM) flanquea la secuencia de trinucleótidos de longitud variable. Otro hibrida con la zona de repeticiones CGG e incluye una secuencia en 5' común al tercer primer, que amplifica la mezcla de productos obtenida con los anteriores cebadores. De esta forma ocurre una amplificación desde múltiples sitios, tantos como el número de repeticiones en el alelo. La especificidad viene dada por el cebador locus-específico, marcado fluorescentemente. El resultado en el electroferograma es una escalera de picos fluorescentes muy característica de este tipo de PCR, en el que el número y morfología del conjunto de picos es indicativo del número de tripletes detectado.

Este sistema permite una rápida identificación de alelos largos que no pueden ser detectados mediante el método tradicional de sólo *primers* flanqueantes. También permite distinguir entre una mujer homocigota y una mujer heterocigota portadora de un alelo normal y otro expandido. Además proporciona información sobre el número y situación de las interrupciones AGG.

Se presentan a continuación ejemplos de los patrones obtenidos en los electroferogramas según las diferentes posibilidades, ver Figuras 1 a 7.



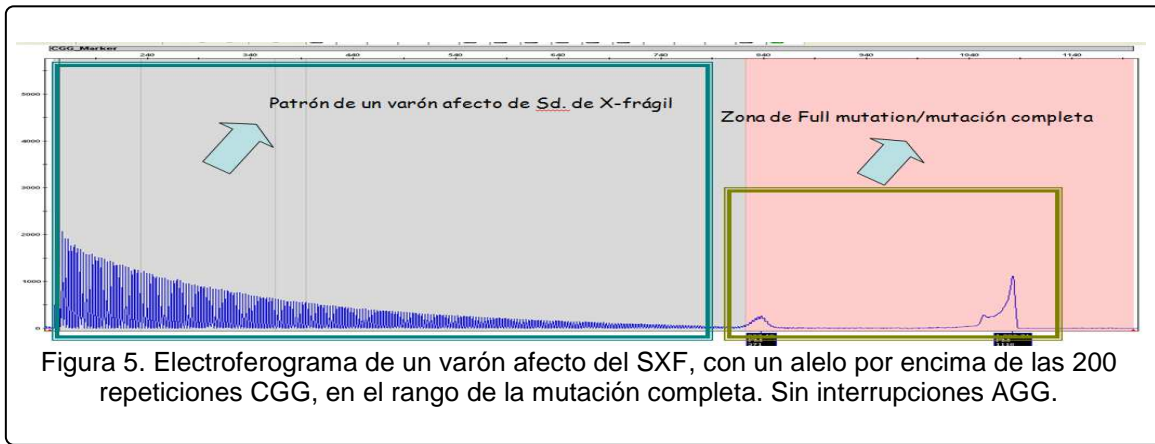


Figura 5. Electroferograma de un varón afecto del SXF, con un alelo por encima de las 200 repeticiones CGG, en el rango de la mutación completa. Sin interrupciones AGG.

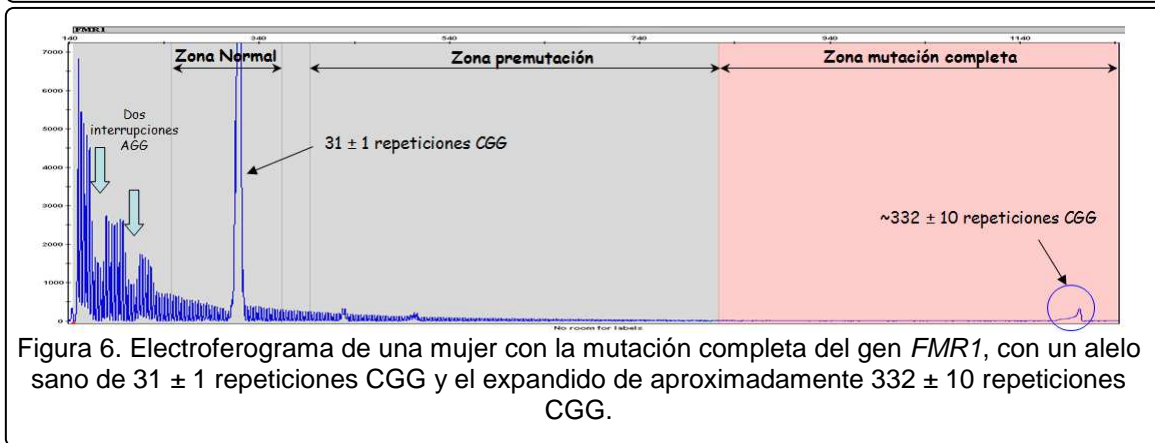


Figura 6. Electroferograma de una mujer con la mutación completa del gen *FMR1*, con un alelo sano de 31 ± 1 repeticiones CGG y el expandido de aproximadamente 332 ± 10 repeticiones CGG.

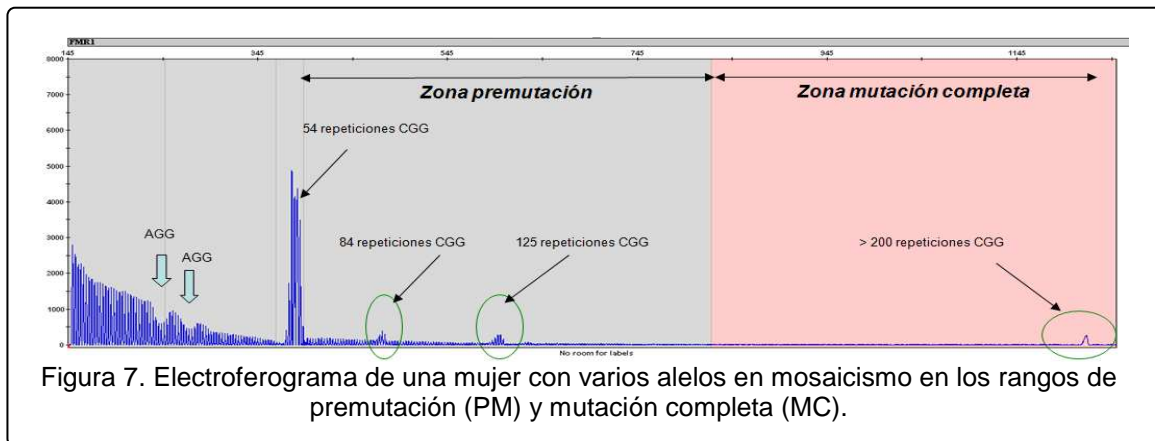


Figura 7. Electroferograma de una mujer con varios alelos en mosaicismo en los rangos de premutación (PM) y mutación completa (MC).

Todas estas técnicas pueden ser realizadas con ADN obtenido de cualquier tejido, mientras cumpla ciertos requisitos de calidad, pureza e integridad. Sangre, líquido amniótico, velloidad corial, saliva, etc. Si bien es la TP-PCR la técnica que más se está estandarizando en los laboratorios de diagnóstico genético por su versatilidad en el empleo de ADN de muestras de sangre periférica, impregnada en papel de filtro (screening neonatal), velloidad corial y/o líquido amniótico (diagnósticos prenatales) y por poder disponer de resultados en 24-48 horas.

2.5. Patologías asociadas a la premutación del gen *FMR1*

Durante muchos años se pensó que los portadores de la PM no presentaban ninguna manifestación clínica, tan sólo el riesgo de transmitir la enfermedad a sus descendientes. Sin embargo, las investigaciones desarrolladas en la PM en los últimos años han demostrado claros riesgos de salud asociados con las expansiones en el gen *FMR1* en el rango de la PM. Dos trastornos están ahora bien documentados [1, 11]. En la década de los 90 se empezó a

*Estudio retrospectivo de la premutación en el gen *FMR1* en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica*

asociar un riesgo mayor a presentar fallo ovárico prematuro a las mujeres portadoras de la PM [12], denominada insuficiencia ovárica prematura asociada a la PM del gen *FMR1* (FXPOI – Fragile X Primary Ovarian Insufficiency). En el año 2001 una enfermedad neurodegenerativa de aparición tardía fue asociada a los portadores/portadoras de la PM [1], lo que se denominó síndrome de temblor-ataxia asociado a la PM del gen *FMR1* (FXTAS – Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome). Y finalmente y durante los años siguientes 2007 – 2009 se han ido describiendo una serie de fenotipos asociados a la PM [1].

Estos trastornos existen en un subgrupo de los individuos con PM, con trayectorias y síntomas específicos asociados. También se han descrito varias alteraciones emocionales y cognitivas que ocurren con mayor frecuencia entre los individuos con PM de lo que se esperaría en la población general, aunque la asociación de la PM con muchas de estas condiciones está peor establecida.

Actualmente se acepta que las manifestaciones clínicas diferentes al SXF y asociadas a la PM del gen *FMR1* constituyen formas alélicas completamente diferentes a las del SXF. Por lo tanto, la mutación genética dinámica, aumento del número de repeticiones del triplete CGG, en el gen *FMR1* (NM_002024.5) es responsable de tres síndromes de herencia mendeliana en el hombre (OMIM) con fenotipo clínico bien diferenciado: SXF (#MIM300624); y dos patologías en adultos portadores de la premutación del gen *FMR1* (55-200 repeticiones CGG): FXPOI (MIM#311360) y FXTAS (MIM#300623).

Mientras que el SXF se produce por una pérdida de función del gen *FMR1*, las patologías asociadas a la PM se producen por una ganancia de función del mRNA (Tabla 3). Con el aumento de la longitud se incrementa los niveles de transcripción de *FMR1* y disminuyen los de FMRP. La toxicidad del mRNA de *FMR1* puede provocar FXPOI y FXTAS [13]. Se sabe que los portadores presentan niveles elevados de mRNA (entre 2 y 8 veces) y niveles ligeramente disminuidos de FMRP.

Tabla 3. Correlación fenotipo, función del mRNA, y expresión de la proteína FMRP con el número de repeticiones del triplete CGG.

| Nº repeticiones CGG | mRNA | FMRP | Fenotipo |
|---------------------------------|------|------|-------------|
| Normal/Intermedio: 6-54 CGGs | + | + | NORMAL |
| Premutación: 55-200 CGGs | + | + | FXPOI/FXTAS |
| Mutación completa: >200 CGGs | - | - | AFECTO |

Las alteraciones asociadas a la PM del gen *FMR1* aceptadas actualmente y basadas en estudios científicos son: problemas emocionales y psicológicos, disfunción tiroidea, fibromialgia/dolor muscular crónico, trastornos del sistema inmunológico, y neuropsiquiátricos, insuficiencia ovárica prematura FXPOI (20%) y síndrome de temblor-ataxia FXTAS (varones 40% y mujeres 16%).

El por qué algunos individuos con la PM no son afectados y otros sin embargo presentan síntomas puede estar relacionado con varios factores, incluyendo la longitud de las repeticiones CGG y la magnitud de aumento del mRNA. También posiblemente estén implicados los transcritos *FMR1 antisense*, bajos niveles de FMRP (especialmente en el rango superior de PM), subproductos de la traducción aberrante de la secuencia repetida incluyendo péptidos que contienen glicina, polimorfismos genéticos en otras zonas del genoma y factores medioambientales como toxinas u otras exposiciones que pueden ser dañinos para el cerebro, o el estrés en familias con trastornos asociados al SXF. Hay indicios de la existencia de un espectro que va desde síntomas leves de ansiedad o timidez en algunos niños y adultos con la PM, hasta problemas psiquiátricos más graves, y con la edad, la aparición de problemas neurológicos que en algunas ocasiones pueden resultar en FXTAS [11].

El conocimiento del fenotipo asociado a la PM es importante desde la perspectiva de la sanidad pública, dada su prevalencia. En tres estudios realizados en la población de Estados Unidos se observó una prevalencia de las expansiones CGG mayor que lo que se había demostrado anteriormente (1 de cada 151 mujeres y 1 de cada 468 hombres [11]; 1 de cada 209 mujeres y 1 de cada 430 hombres [14]; 1 de cada 148 mujeres y 1 de cada 290 hombres [15]). Esta prevalencia se traduce en alrededor 1 millón de portadores premutados en Estados Unidos.

La literatura mundial revela una considerable variabilidad étnica de la prevalencia de la mutación, moviéndose entre 1 de cada 1674 hombres en Japón a 1 de cada 251 en España. En mujeres fluctúa entre 0 portadoras detectadas en 324 individuos testados en Japón, a 1 de cada 113 en Israel [11].

2.5.1. FXPOI

La insuficiencia ovárica primaria ligada a la PM del gen *FMR1* es un fenómeno por el que se desarrolla una amenorrea con deficiencia de las hormonas sexuales y elevados niveles de gonadotropinas en suero antes de los 40 años. Esta condición clínica, también conocida como fallo ovárico prematuro (FOP) ocurre en aproximadamente el 1% de la población general, mientras que su incidencia dentro de las portadoras de la PM en *FMR1* es del 20%. Actualmente esta condición está considerada la causa genética más común de fallo ovárico prematuro (≈ 20 veces) [13].

El término insuficiencia ovárica primaria (IOP) incluye tanto el FOP como otros indicadores ocultos de función ovárica, como los niveles elevados de hormona estimuladora del folículo y un nivel bajo de hormona antimülleriana. Como este espectro se ha observado entre las mujeres con PM, también se acepta el término FXPOI.

No todas las mujeres premutadas manifiestan FOP y no está claro si esto es debido a una expresividad variable o a una reducida penetrancia. El hecho de que las mujeres con MC no tengan un riesgo incrementado de disfunción ovárica [13] indica que la reducción de FMRP no provoca esta sintomatología.

El motivo por el cual algunas portadoras de la PM desarrollan FXPOI y otras no, se desconoce. Lo único que se sabe es que pequeños cambios en la expresión de la proteína FMRP afectan a la función ovárica.

Se han analizado cuatro factores para intentar explicar la penetrancia incompleta del FOP: la longitud de las repeticiones CGG, el sesgo en la inactivación del cromosoma X, el tabaquismo y otros genes. En primer lugar hay una fuerte asociación no lineal de la penetrancia respecto al número de repeticiones: las mujeres en la zona intermedia del rango de la PM (80 – 100 repeticiones) tienen el riesgo más alto de FOP. Las portadoras de alelos premutados por encima o por debajo de ese intervalo también tienen un riesgo incrementado comparado con el de la población general, pero no del mismo alcance que entre 80 y 100 [16]. Segundo, se ha estudiado la influencia de la inactivación del cromosoma x en el riesgo a sufrir FXPOI, pero no se han encontrado evidencias que las relacionen [17]. En tercer lugar, se sabe que el consumo de tabaco es un factor que reduce de forma importante la edad de la menopausia. Y afecta de igual modo a las mujeres con la PM [16]. Por último hay evidencia indirecta de que el riesgo de FOP depende no sólo del alelo PM sino también de otros genes de fondo [16, 18 – 21]. El conocimiento de las consecuencias moleculares y biológicas de la PM proporcionan una base para la búsqueda de genes candidatos y vías en los que focalizar los estudios genéticos: proteínas que se unen al tracto CGG en el mRNA o los genes de las vías que se encuentran alteradas en modelos animales de FXPOI (p.ej. hormona luteinizante). A día de hoy no existen evidencias que permitan correlacionar la edad de aparición del FXPOI con el número de repeticiones CCG.

En resumen, todavía se conoce poco sobre la etiología del FXPOI. Si bien se ha observado que las madres premutadas suelen presentar FXPOI cuando presentan un número de repeticiones CGG comprendido entre 80-100 y en cambio en premutadas con más de 100 repeticiones o en mujeres con MC no se observa FXPOI. El riesgo de presentar FXPOI es mayor cuanto mayor es el número de repeticiones CGGs pero se ralentiza ese efecto al llegar a las 100 repeticiones. Las mujeres con 80-100 repeticiones CGGs tienen mayor riesgo de

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

presentar FXPOI, pero esto no implica que no se produzca el FXPOI en mujeres premutadas con un número de repeticiones comprendidas entre 55 y 79 CGGs.

Por todo ello, el asesoramiento genético a una mujer portadora debe incluir el tema de la fertilidad y las opciones reproductivas. Deben saber que se aconseja tener hijos antes de los 35 años ya que la menopausia puede avanzarse entre 4 y 6 años. Por otra parte también es necesario informar de que existen ovulaciones esporádicas, por lo que si no desean descendencia deben tomar medidas anticonceptivas.

Existen varias opciones reproductivas según quien sea el progenitor portador de la premutación:

- Donación de gametos (óvulos o esperma): donantes de semen u ovocitos
- Diagnóstico prenatal
- Diagnóstico genético preimplantacional (estudio de blastómeros) o preconcepcional (estudio del corpúsculo polar).

2.5.2. FXTAS

El síndrome de temblor-ataxia asociado al X Frágil (FXTAS) es una alteración neurológica multisistémica, con el temblor y la ataxia como signos principales.

La prevalencia de FXTAS entre varones de 50 años es de 1 de cada 3000, lo cual sitúa este síndrome como una de las causas monogénicas más frecuentes de temblor y ataxia entre la población general adulta. Por otra parte se estima que 1/3 de los portadores de la PM en las familias de SXF desarrollarán un FXTAS.

A nivel molecular el FXTAS se asocia con un aumento de mRNA de *FMR1*. A este aumento de mRNA en las células se le atribuye un efecto tóxico que puede dar lugar a la formación de inclusiones intranucleares en el cerebro. De hecho, los estudios anatomopatológicos realizados en cerebros de pacientes con FXTAS demostraron la presencia de eosinófilos e inclusiones dentro del núcleo de neuronas y astrocitos [22].

El síndrome comienza con un temblor intencional y de forma progresiva y gradual van apareciendo otras manifestaciones como la ataxia, problemas de memoria, pérdida de función ejecutiva, demencia, impotencia, hipertensión, incontinencia, signos parkinsonianos, ansiedad, irritabilidad, cambios de humor, etc. No todos los pacientes presentan las mismas manifestaciones, algunos de ellos sólo muestran temblor.

La penetrancia del síndrome depende de la edad, el sexo y el número de repeticiones, siendo el aumento de años, el número elevado de repeticiones y el sexo varón los mayores factores de riesgo. Puede aparecer en los individuos portadores de la PM a partir de los 50 años, tanto en varones como en mujeres. En general se habla de una penetrancia del 30% en hombres y del 16% en mujeres [23 – 25].

El diagnóstico se hace en base a unos criterios clínicos y radiológicos (Tabla 4), y por la presencia de la PM. Se ha visto que los pacientes con FXTAS tienen sobreexpresión del gen, lo cual lleva a una aparente toxicidad por exceso de su mRNA. Sin embargo, también se han descrito algunos casos del síndrome en portadores dentro de la zona gris (45-54 repeticiones de CGG) y en individuos con la MC (> 200 repeticiones de CGG) que tienen el gen parcial o completamente desmetilado (“activo”).

La prevalencia del alelo mutado de FXTAS es común entre la población general y varía según el grupo poblacional que se esté evaluando. En España se encontró una prevalencia de 1 en 130 mujeres y 1 en 250 hombres. En Israel la prevalencia en mujeres fue similar con datos de 1 en 113-157 mujeres. Seltzer et al., en 2012 [12], presentaron estudios realizados en una población estadounidense, en los que encontraron la PM del gen *FMR1* con una frecuencia de 1 en 151 mujeres y 1 en 468 hombres de la población general, es decir, a una razón de prevalencia entre mujeres y hombres de 3,1:1 respectivamente. Ya que aproximadamente el 40% de los hombres portadores y del 8-16% de las mujeres portadoras desarrollarán FXTAS a medida que avanza su edad, ello permite estimar una prevalencia aproximada de 1 en 3.000.

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

Esta prevalencia de FXTAS es similar a la de otras enfermedades neurológicas como la atrofia multisistémica, la esclerosis lateral amiotrófica o la parálisis supranuclear progresiva. Para los hombres, el FXTAS podría clasificarse como una de las enfermedades neurológicas progresivas de inicio tardío más comunes asociadas a la mutación de un gen único.

Tabla 4. Clasificación de los criterios clínicos y radiológicos

| Criterio | Clínico | Radiológico |
|----------|----------------------------------|--|
| Mayor | Temblor de intención | Hiperintensidades en T2 en sustancia blanca cerebral |
| Menor | Ataxia | Hiperintensidad T2 en pedúnculo cerebeloso medio |
| Menor | Parkinsonismo | Atrofia cerebral generalizada moderada o grave |
| Menor | Déficit de memoria a corto plazo | – |
| Menor | Disfunción ejecutiva | – |

A pesar de que la prevalencia de la PM del gen *FMR1* es tan elevada, la prevalencia del FXTAS es menor de lo estimado, lo que podría indicar un posible subregistro de esta patología. Esto podría deberse a que el FXTAS presenta unas manifestaciones clínicas similares a otros desórdenes neurológicos, lo que aumenta la probabilidad de hacer diagnóstico equivocado, acompañado de la poca remisión a neurología de estos pacientes. El porcentaje de penetrancia va a variar según la edad del portador, el cual incrementa su riesgo de desarrollar FXTAS a medida que aumenta su edad. Jacquemont et al. [revisado en 1] estudiaron las familias conocidas en California y encontraron que los signos de temblor y ataxia ocurrían en 17%, 38%, 47% y 75% de hombres portadores en edades entre los 50-59, 60-69, 70-79, y mayores de 80 años, respectivamente.

Manifestaciones clínicas y diagnóstico de FXTAS

Las manifestaciones clínicas tienen un inicio típico alrededor de los 60-65 años de edad. El FXTAS se caracteriza por la presentación de temblor de intención y ataxia cerebelosa, que son los dos criterios clínicos mayores para su diagnóstico. También, y aunque estos síntomas motores son usualmente encontrados, en ocasiones el FXTAS se presenta con detrimento cognitivo aislado, que puede incluir posteriormente temblor y/o ataxia. FXTAS puede ocurrir junto con enfermedad de Parkinson, patología con la cual comparte características clínicas como temblor, ataxia, bradiquinesia, ansiedad, alteraciones del ánimo y cognitivas. No obstante, la ataxia típica de Parkinson no corresponde a la ataxia cerebelosa característica del FXTAS.

Las manifestaciones clínicas por sí solas no permiten realizar un diagnóstico certero de FXTAS, el cual debe contar con la presencia de ciertos hallazgos radiológicos específicos, tales como la hiperintensidad del pedúnculo cerebelar medio (MCP por las siglas en inglés de Medium Cerebellar Peduncle) observada en imagen de resonancia magnética de cerebro, aunque este no es patognomónico. Pese a ello, constituye un criterio radiológico mayor que debe ir acompañado de los criterios clínicos no radiológicos mencionados para constituir un diagnóstico. El signo de MCP solo se encuentra en el 60% de los hombres y el 13% de las mujeres con FXTAS; estos pacientes presentan un déficit cognitivo más severo y una historia más larga de síntomas de degeneración neurológica que los individuos con FXTAS sin él.

Entre otros hallazgos neurológicos se incluyen criterios radiológicos menores, también identificados a través de RMN T2, como la hiperintensidad de la materia blanca en diferentes zonas del sistema nervioso central como los núcleos pontinos, la ínsula, el esplenio del cuerpo calloso y la región periventricular. Por otro lado, el segundo criterio radiológico menor sería la atrofia cerebral severa generalizada. La atrofia se hace más evidente en la parte frontal de la corteza, incluyendo las áreas dorsomediana y dorsolateral de la corteza prefrontal.

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

Según Hagerman et al. [11], para un diagnóstico definitivo de FXTAS se necesita la presencia de un criterio clínico y radiológico mayor, o un criterio radiológico mayor (Tabla 5) y la presencia de inclusiones intranucleares redondeadas típicas de FXTAS en neuronas y astrocitos. Estas inclusiones tienen una distribución amplia a través de todo el cerebro y el tallo cerebral. En el caso de un diagnóstico probable, se debe presentar un criterio radiológico mayor acompañado de un criterio clínico menor, o por el contrario, dos criterios clínicos mayores, es decir, la presentación conjunta de temblor de intención y ataxia cerebelar que característicamente se pueden identificar en estos pacientes al examen clínico. Por último, un diagnóstico posible de FXTAS se constituye a partir de la presencia de un criterio radiológico menor y un criterio clínico mayor (Tabla 4 y Tabla 5). De manera que el diagnóstico de este síndrome se hace mucho más complicado que la observación de temblor y ataxia en pacientes con la premutación del gen *FMR1* identificada.

Tabla 5. Diagnóstico de FXTAS en función de los criterios clínicos y radiológicos

| FXTAS | Clínicos | Radiológicos |
|--------------|-----------------|-------------------------|
| DEFINITIVO | 1 MAYOR | 1 MAYOR (0 inclusiones) |
| PROBABLE | 2 MAYORES | |
| | 1 MENOR | 1 MAYOR |
| POSIBLE | 1 MAYOR | 1 MENOR |

Es claro que el mRNA elevado del gen *FMR1* cumple un papel importante en la patogenia del FXTAS. La PM, sin embargo, puede, mediante de la toxicidad por RNA, causar a las neuronas una vulnerabilidad a muerte celular temprana debida a golpes genéticos secundarios, como: toxicidad ambiental, los efectos deletéreos de las convulsiones recurrentes o incluso niveles disminuidos de FMRP que se han asociado a autismo y/o TDAH en algunos portadores de la premutación. Aunque el papel patogénico del mRNA puede estar restringido a los eventos desencadenantes en el neurodesarrollo del paciente, son necesarias distintas injurias para que este síndrome neurodegenerativo se consolide. Es posible que estas sean causadas por alcoholismo crónico, abuso de opioides, tabaquismo, hipertensión no tratada, depresión, hipotiroidismo o deficiencias vitamínicas, y exposición a anestesia prolongada durante cirugía.

2.6. Características clínicas de los trastornos asociados a la premutación en el gen *FMR1*

Además de los trastornos FXPOI y FXTAS que actualmente se aceptan como asociados a la premutación del gen *FMR1*, se está investigando la relación de otras manifestaciones clínicas, ver Figura 8 y Figura 9 [1].

Trastornos inmunológicos

Se encuentran problemas de tiroides en el 17,3% de las portadoras que no desarrollan FXTAS pero también en el 50% de las mujeres con FXTAS, lo que es una frecuencia significativamente más alta que en los controles (10,1%) de la misma edad [26]. Por otra parte otros problemas pueden incluir una historia de tiroiditis de Hashimoto dando lugar a hipotiroidismo o, en ocasiones, la enfermedad de Graves. Estos problemas son trastornos autoinmunes. Winarni y colaboradores encontraron en su estudio [27] que el 44,7% de las mujeres adultas portadoras sufrían algún tipo de trastorno de este tipo, comparado con el 27,8% de los controles. El odds ratio (OR) de sufrir un trastorno autoinmunes es de 5,5 en mujeres con FXTAS, y del 2,1 si no padecen FXTAS, en comparación con los controles. En contraste, entre la población general, la prevalencia de hipotiroidismo en las mujeres menores de 30 años es del 1,5%, subiendo hasta el 7,5% en mujeres de 70 a 80 años.

Según un estudio de Rodríguez-Revenga y col. [28], las mujeres con la premutación en *FMR1* presentaban una penetrancia de enfermedad tiroidea del 15,9%. De las 14 premutadas con

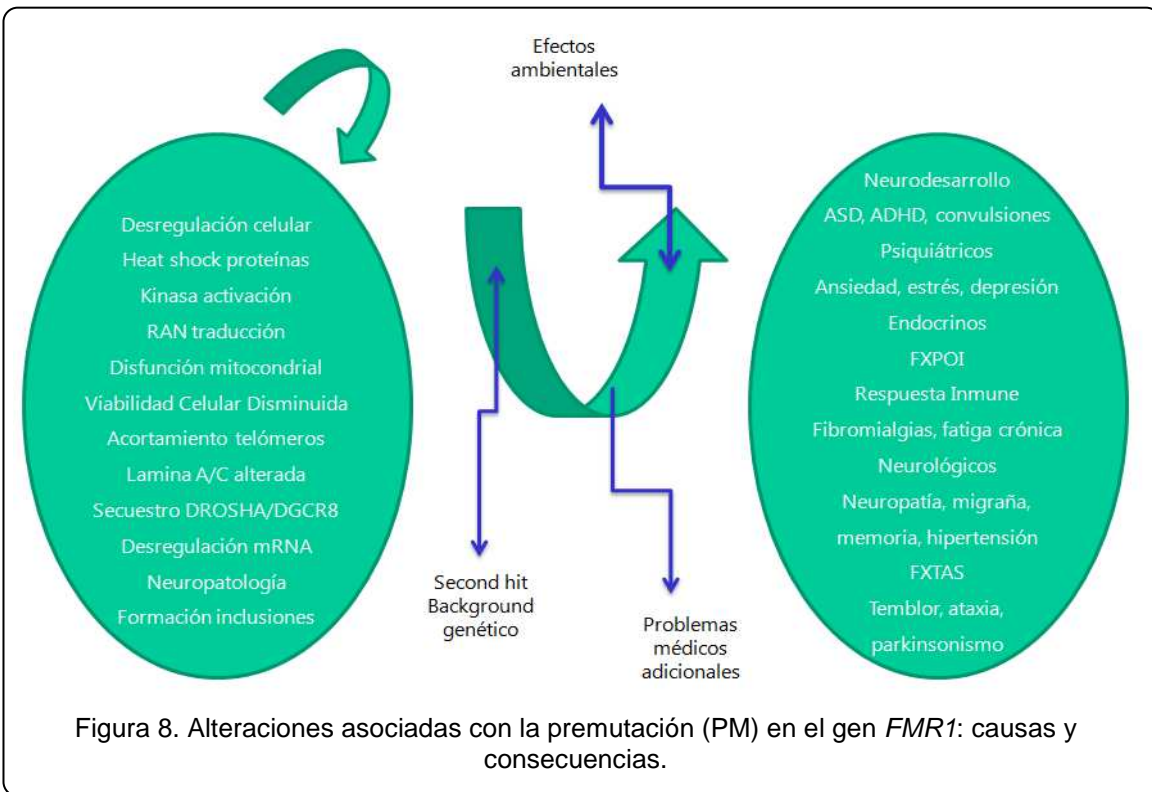
Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

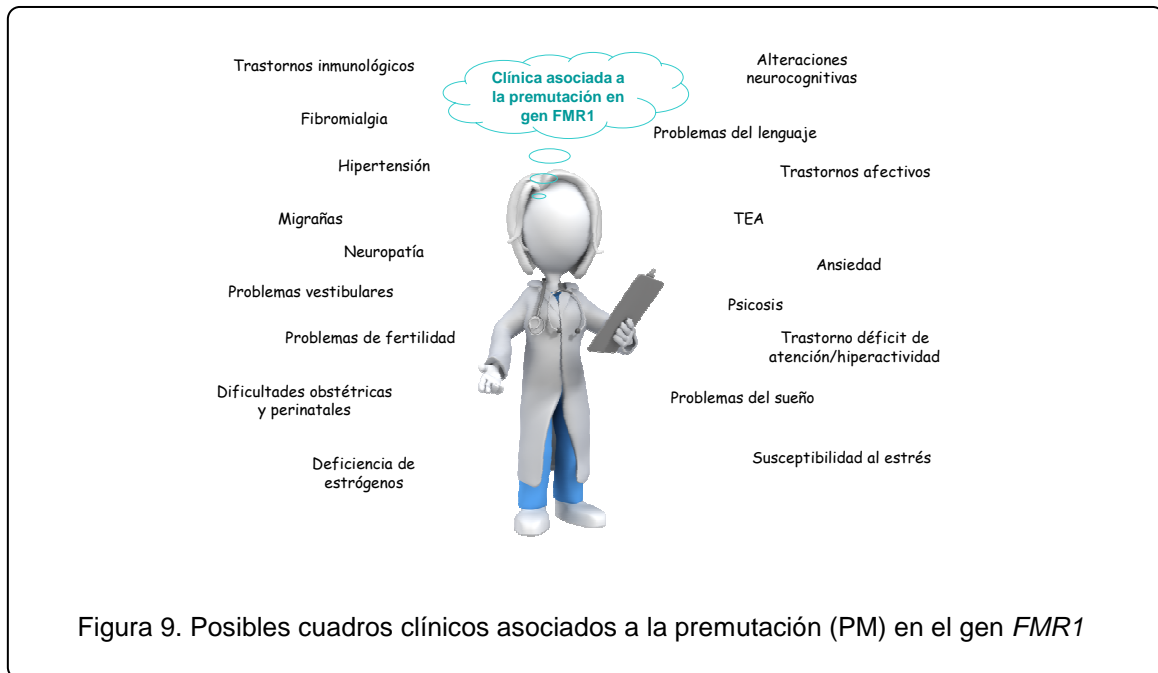
problemas tiroideos, 9 presentaban hipotiroidismo, uno sufría hipertiroidismo, otra un nódulo tiroideo, una más la enfermedad de Graves y las otras dos no tuvieron un diagnóstico específico.

La causa del alto índice de enfermedades tiroideas en mujeres con la premutación, especialmente en aquellas con FXTAS, no está clara. Los problemas endocrinos parecen estar directamente relacionados con la toxicidad del RNA en el eje hipotalámico-pituitario, o al efecto directo del RNA tóxico en la tiroides, quizá a través de un mecanismo autoinmune o de la inducción de apoptosis en las células tiroideas [26].

Fibromialgia

Otro problema encontrado en el 10,2% de las portadoras es la fibromialgia, según Winarni [27]. Sin embargo, otros dos estudios más recientes realizados en España encontraron resultados opuestos. Se estudiaba la mutación *FMR1* entre mujeres con fibromialgia. En uno de los estudios [29] con 353 mujeres, se encontró un ratio elevado de PM en gen *FMR1*. Sin embargo en el segundo estudio [30], con 700 mujeres, no se encontró asociación.





Migrañas

Las migrañas son comunes entre los portadores, tanto varones como mujeres. En un estudio se observó que el diagnóstico de migrañas difiere de un 54,2% en mujeres portadoras, al 25,3% de controles [31]. Smith y col. [32] reportaron que los dolores de cabeza (no sólo migrañas) son significativamente más frecuentes entre las portadoras de PM madres de niños con SXF (26,9%) que en los controles (13,6%) del mismo grupo de edad sin hijos enfermos. De hecho la incidencia de las migrañas no es mayor en las portadoras que en la población general, lo que puede implicar una relación entre esta clínica y el estrés en las familias con algún niño afectado por SXF.

A día de hoy sabemos que las migrañas pueden estar asociadas con algunos síndromes derivados de la disfunción mitocondrial, como se ha observado en líneas celulares de premutaciones [33, 34].

Neuropatía

Se reportó por primera vez en el estudio de un grupo de 5 mujeres portadoras de premutaciones con FXTAS, de las que 4 mostraban indicios de neuropatía [1].

En su estudio [1] Wheeler y col. encontraron que las portadoras que comienzan a tener señales de FXTAS desarrollarán con mayor probabilidad neuropatías que aquellas sin FXTAS.

Coffey [26] encontró que pocas veces se producía pérdida de sensibilidad o evidencia de neuropatía en mujeres sin FXTAS. La neuropatía estaba aumentada en portadoras con FXTAS respecto a los controles y a las portadoras sin FXTAS. Las portadoras sin FXTAS también reportaron una historia de temblor intermitente en el 11% de los casos, frente al 1,5% de los controles.

Problemas vestibulares

Las portadoras a menudo se quejan de sensación de mareo y desequilibrio. Smith y col. [31] reportaron altos índices de mareos en las portadoras madres de niños con SXF (5%) que en los controles (1,3%). Es la misma observación que también hizo Seltzer [14] con un 18% de las premutadas experimentando mareos y debilidad frente al 4% de los controles.

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

Los problemas vestibulares parecen estar presentes en las premutadas que no cumplen los criterios clínicos para FXTAS, pero también se sabe que estos déficits correlacionan con el score de FXTAS y son más graves en aquellas portadoras con FXTAS.

Problemas de fertilidad

La consecuencia más inmediata y significativa de la IOP es una fertilidad reducida. Dados las altas cifras de menopausia prematura, la dificultad para reproducirse es significativa en las mujeres con PM. Incluso entre las mujeres jóvenes se ha reportado mayor dificultad para quedarse embarazadas de lo esperado, necesitando en muchos casos ayuda de reproducción asistida.

Al igual que otros síntomas de la FXPOI, los problemas de fertilidad parecen ser más significativos en mujeres en el rango medio de la PM [1].

Dificultades obstétricas y perinatales

Se conoce poco sobre el potencial riesgo obstétrico y el riesgo perinatal en las portadoras de la PM en el gen *FMR1*. En un estudio desarrollado en Finlandia [35] en el que se siguió a 63 mujeres portadoras de la PM, se encontró que el riesgo de sangrado en las últimas etapas del embarazo es ligeramente superior. Pero no hubo ningún otro problema durante el curso o el final del embarazo.

Deficiencia de estrógenos

En general, la deficiencia temprana de estrógenos que resulta de la IOP provoca un riesgo aumentado de baja densidad ósea, aparición temprana de osteoporosis y fracturas de huesos, una función endotelial disminuida, aparición temprana de enfermedad coronaria y riesgo aumentado de mortalidad cardiovascular. En las mujeres premutadas se ha observado una baja densidad de los huesos y osteoporosis con mayor frecuencia que en las no portadoras, pero no se han visto otros trastornos relacionados con la deficiencia de estrógeno [1].

Por otra parte el hipoestrogenismo puede conllevar consecuencias conductuales y cognitivas. Las mujeres en las que la menopausia aparece a una edad temprana presentan más ansiedad, depresión, somatización, sensibilidad, hostilidad y sufrimiento psicológico que las mujeres con una función ovárica normal. Algunos estudios han encontrado evidencias de que los síntomas del FXPOI pueden en parte explicar el aumento de la vulnerabilidad a trastornos del humor y ansiedad y depresión [1].

El estrógeno también juega un papel en la respuesta inmune y en la inflamación, y se ha asociado con la aparición de trastornos autoinmunes [36], un grupo de enfermedades que se han visto elevados entre las mujeres con PM. Recientemente se ha demostrado que el estrógeno puede moderar el impacto del estrés crónico [1], punto que presenta mucho interés dado que las mujeres premutadas a menudo experimentan niveles altos de estrés relacionado con su papel de cuidadoras principales de niños con SXF y de parientes mayores con FXTAS.

Características neurocognitivas

Se sabe que varios dominios cognitivos están afectados por la PM, incluso cuando no aparece FXTAS. Entre ellos la función ejecutiva, la memoria de trabajo y la aritmética [1]. Estos déficits pueden aparecer en los individuos jóvenes y a menudo muestran un curso más progresivo en premutados que en la población general. Estas características pueden ser un signo temprano de deterioro cognitivo, principalmente en el ámbito de la disfunción ejecutiva que puede acompañar al FXTAS. Sin embargo hay que destacar que otros estudios no han encontrado problemas en esas áreas. Muy probablemente haya un subgrupo de mujeres con la PM que son más vulnerables.

Inteligencia general

Las habilidades cognitivas generales aparecen normales en las mujeres adultas sin FXTAS [1]. Otro estudio reciente [37] también demostró que los valores (intelligence quotient) (IQ) eran normales en portadoras por encima de los 50 años. Por el contrario, algunas publicaciones muestran bajas puntuaciones IQ verbal (área del lenguaje) en comparación con los controles o con sus homólogos varones [1].

Diversos estudios han mostrado tanto IQ bajos [38] como superiores [39] en chicas con la premutación. Myers y col. [40] examinaron a 14 niños (7 eran mujeres) y encontraron una tendencia hacia un IQ bajo.

También se han reportado dificultades aritméticas en mujeres con la PM [1].

Función ejecutiva

La función ejecutiva implica la capacidad de autorregulación del comportamiento y la atención, y consiste en múltiples procesos incluyendo el mantenimiento y actualización de información relevante en la memoria de trabajo, inhibición de información irrelevante, modificación de metas y monitorización del cumplimiento [41]. Aunque la función ejecutiva es el principal dominio cognitivo afectado en pacientes con FXTAS, algunos estudios muestran que mujeres jóvenes con la PM pero no FXTAS superan los tests de función ejecutiva con puntuaciones normales [1].

Atención

La atención sostenida en una tarea de búsqueda visual entre mujeres con la PM no FXTAS y varios grupos control es comparable [1]. En otro estudio, mujeres con PM auto-reportaron más déficits de atención que en controles sanos [42].

Memoria

La memoria generalmente se mantiene intacta en portadoras sin FXTAS [37, 42]. Tanto el recuerdo inmediato como el retardado de memoria visual están afectados por la longitud de las repeticiones CGG en esas portadoras [1].

Problemas de lenguaje

Las portadoras no afectadas por FXTAS muestran habilidades parecidas a las de los controles [1]. En contraste, otros estudios muestran que el lenguaje funcional (o el uso del lenguaje en contextos sociales, por ejemplo, la capacidad de conversación) puede estar afectado entre los portadores de PM [43]. En este estudio se revisaron los casos de 200 mujeres con la PM, en los que se observó la realización de afirmaciones incompletas, discurso repetitivo, excesivas muletillas y la corrección o modificación de una afirmación hecha anteriormente. Estas disfunciones pueden indicar problemas con las tareas ejecutivas como planificación y organización, y pueden interferir en una comunicación fluida. Los resultados revelaron valores elevados de todas estas disfunciones en las premutadas, en comparación con los de madres de niños con autismo, así como una asociación significativa con la edad (a más edad aumentan estos problemas de lenguaje). No se vio ninguna asociación entre la longitud de los CGG.

Características psiquiátricas

Trastornos afectivos

Los trastornos relacionados con el estado de ánimo han sido una preocupación en la población con la PM del SXF durante dos décadas. Algunos pequeños estudios iniciales no pudieron demostrar de forma significativa diferencias entre portadores y controles en trastornos depresivos [44]. Posteriormente se realizaron investigaciones a mayor escala que sí pudieron demostrar la relación entre el número de repeticiones CGG y la presencia de depresión así como la gravedad de los síntomas depresivos [45, 46].

Seltzer y col. [14] no encontraron evidencias de una elevada prevalencia de síntomas depresivos, y Smith y col. [32] tampoco reportaron afectación negativa en portadoras.

Seltzer y col. en otro estudio de 2012 [47] vieron ratios más altos de depresión y ansiedad en mujeres portadoras de la PM, madres de niños con la mutación completa y SXF, bajo ciertos condicionantes genéticos y ambientales: las madres que experimentaron eventos estresantes en el año anterior mostraron ratios más altos de depresión y ansiedad si sus repeticiones CGG estaban en el rango medio.

Trastornos del espectro autista

El SXF es uno de los trastornos explicado por un solo gen más comúnmente asociado con autismo. Por este motivo es importante determinar cuál es el riesgo que confiere ser portador de la PM. En un estudio de cribado en familias con SXF, un 14% de los chicos y un 5% de las chicas con la PM mostraron también algún trastorno del espectro autista (TEA) [48]. Incluso en los portadores no diagnosticados con un trastorno de este tipo, algunas características relacionadas sí son más comunes que en los controles sin PM.

López-Moureló [49] evaluaron el autismo en un grupo de portadores de la PM en *FMR1*, a través del cuestionario AQ (por sus siglas en inglés, Autism-Spectrum Quotient). El resultado mostró diferencias entre pacientes FXTAS y no FXTAS. Los pacientes diagnosticados de FXTAS mostraron un incremento significativo en 4 de los 5 subdominios del AQ en comparación con los controles, mientras que el grupo no FXTAS sólo presentó diferencias significativas en 2 de los 5. Este resultado sugiere que los FXTAS presentan un fenotipo autista más amplio que los portadores de la PM sin FXTAS. El efecto del género no fue tan evidente y sólo se observó en el subdominio de habilidades sociales. También los rasgos de comportamiento relacionados con trastorno del espectro autista son más comunes entre los portadores no diagnosticados de TEA que entre la población general. Este conjunto de síntomas se conocen como fenotipo autista extendido y son un grupo de características subclínicas a menudo presentes en familiares de pacientes diagnosticados de TEA. En resumen, se demostró que los portadores de PM presentaban un aumento de los rasgos autistas especialmente en pacientes FXTAS [49].

Ansiedad

En un amplio estudio [1] se compararon portadoras con y sin FXTAS en cuanto a la prevalencia de desórdenes de ansiedad. Considerando todos los desórdenes de ansiedad en conjunto, sólo los pacientes con FXTAS mostraron una prevalencia más elevada. Al separarlos, las cifras eran similares para trastorno del pánico, estrés posttraumático y fobia específica. No pudieron demostrarse diferencias entre portadores y controles en trastorno de ansiedad generalizada y desorden obsesivo compulsivo. Sólo la fobia social mostró tener niveles más elevados en portadoras de la PM sin FXTAS que en los controles con los que se compararon.

El grupo de López-Moureló [49] evaluó la ansiedad social en un grupo de portadores de la PM en *FMR1*, a través del cuestionario SPIN (por sus siglas en inglés, Social Phobia Inventory). Encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres pero no entre los hombres portadores, en comparación con los controles, independientemente si tenían FXTAS o no. Este estudio se centró en población adulta, mostrando que las mujeres premutadas son más susceptibles a la fobia social que los hombres premutados. Los desórdenes de ansiedad pueden estar favorecidos por factores ambientales, como las implicaciones emocionales del FXPOI [50] o la carga de tener un hijo con discapacidad intelectual [44]. Todos estos factores pueden contribuir al aumento de síntomas de ansiedad observados entre las mujeres premutadas.

Psicosis

Debido a la relativa rareza de la psicosis en la población general, es un reto estudiarla en los portadores premutados. Inicialmente no se encontró una clara relación de la esquizofrenia con el gen *FMR1*. Sin embargo hay varios casos reportados de enfermedades psicóticas combinadas con la PM, incluyendo el trastorno esquizoafectivo y un individuo con esquizofrenia y trastorno esquizoide de la personalidad combinados. Un hecho interesante es que en lugar de trastornos psicóticos francos, se ha encontrado una prevalencia elevada de rasgos esquizotípicos de la personalidad en la población portadora [1].

Trastorno de déficit de atención/ hiperactividad

Las dificultades para regular la atención se han manifestado como un problema en las personas con la PM. De forma notable cuando se comparan con los controles, los portadores de PM tienen más problemas de atención [51]. La falta de interés y la impulsividad entre los portadores de FMR1 pueden ser problemáticas durante la edad adulta [42], aunque la prevalencia de la hiperactividad no se ha visto incrementada. La PM actúa junto a otros loci genéticos para influenciar en la gravedad de los síntomas del trastorno de déficit de atención [52].

Problemas del sueño

Para estudiar los problemas de sueño se realizan mediciones como las del Pittsburgh Sleep Quality Index y el Insomnia Severity Index. Estos parámetros analizados en portadores han resultado significativamente patológicos. Esto puede relacionarse con las elevadas cifras del síndrome de las piernas inquietas y la apnea del sueño, cuyos casos se han advertido multiplicados en población premutada [53, 54]. La apnea del sueño es común en portadores mayores con FXTAS: se da en el 31,4% de portadores con FXTAS, en el 8,6% de los portadores sin FXTAS, y en el 13,8% de los controles [53].

Estos problemas pueden contribuir al desarrollo de fatiga, que es una queja común en los pacientes portadores adultos [55].

Susceptibilidad al estrés

Se han descrito dos hipótesis para explicar los elevados síntomas psiquiátricos, cognitivos y somáticos de los portadores de PM [56]: en primer lugar, que esos síntomas son características biológicas primarias de las expansiones CGG en FMR1 en el rango de la PM; segundo, que dichos síntomas pueden estar agravados por el estrés asociado con tener un hijo con SXF.

Polimorfismos en el gen *MTHFR* y su posible asociación con cuadros de depresión en pacientes premutados para el gen *FMR1*

El gen *MTHFR* es el codificante de la enzima N₅,N₁₀-metilentetrahidrofolato reductasa, que es la encargada de sintetizar N₅-metiltetrahidrofolato (comúnmente abreviado FH₄) a partir de N₅,N₁₀-metilentetrahidrofolato. Esta enzima participa en el metabolismo del folato y la homocisteína. El 5 metil-tetrahidrofolato es la forma predominante de folato en circulación y el principal donador de grupos metilo en la vía de la remetilación. Un defecto en esta enzima ocasiona la acumulación de homocisteína debido a la escasa cantidad de 5-metiltetrahidrofolato que se encuentra disponible para que la homocisteína metiltransferasa, a través de la ruta de remetilación, transfiera un grupo metilo a la homocisteína dando origen a la metionina.

Se ha visto que este sistema está alterado en personas con cuadros de depresión. Por otro lado, algunos de los pacientes con premutación en el gen *FMR1* del SFX presentan síntomas de depresión, ansiedad y cambios en el estado de ánimo. Entre un 5 y un 15% de las personas normales son homocigotas para la mutación C677T en el gen *MTHFR* [57]. Esta variante está relacionada con un incremento de la homocisteína en el suero y una redistribución de los folatos, con aumento de los folatos en hematíes, folato en plasma disminuido (en el límite bajo del intervalo de normalidad), y concentraciones bajas de cisteína en plasma. Esta situación tiene como consecuencia un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular, un riesgo de 3 a 7,2 veces mayor de tener descendencia afectada con defectos del tubo neural [58], así como su posible implicación en enfermedades como la esquizofrenia, depresión y el cáncer [59].

En el polimorfismo C677T, las variantes homocigotas presentan un 30% de actividad enzimática en comparación con los individuos homocigotos para el alelo C, mientras que en el caso de los heterocigotos el porcentaje de actividad es del 65% [57]. Conociendo la posible implicación de los polimorfismos en *MTHFR* con la depresión, y por otra parte sabiendo de los

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

cuadros depresivos que sufren algunas pacientes premutadas para el SXF, podría plantearse una asociación entre ambos.

Diversos estudios realizados intentando determinar la relación entre las variaciones genéticas en el gen *MTHFR* y desórdenes psiquiátricos han resultado en una serie de hallazgos no concluyentes. Se ha estudiado ampliamente la relación de *MTHFR* con la predisposición a depresión, ansiedad, cambios en el estado del ánimo, esquizofrenia y trastornos depresivos. Se encontró asociación del polimorfismo C677T con depresión unipolar [60] y con trastorno depresivo mayor [57]. En un estudio de dicha relación con los trastorno psiquiátricos mayores, se encontró que el *MTHFR* C677T está significativamente asociado con todos los desórdenes asociados: esquizofrenia, trastorno bipolar y desorden depresivo unipolar, con un OR = 1.26 para el genotipo TT frente a los portadores del CC [61]. Sin embargo en otro estudio no pudo demostrarse la relación C677T con trastorno depresivo mayor [62] y Permoda-Osip y col. [63] tampoco pudieron confirmar la asociación con el desorden bipolar.

Aleyasin y col. [64] estudiaron la posible asociación entre 3 polimorfismos en las enzimas de la ruta del folato, entre ellos el *MTHFR* C677T, y el SXF. Observaron una frecuencia incrementada del alelo 677T en los pacientes de X frágil, en comparación con el control (OR=2,459), estadísticamente significativa, demostrando una correlación entre ambos en población iraní. En dicho estudio se incluyeron muestras con la mutación completa determinada por PCR y Southern Blot. Santa María y col. [65] se centró en el estudio de los polimorfismos C677T y A1298C en las mujeres portadoras de la premutación en FMR1 pero no obtuvieron resultados concluyentes.

3. OBJETIVOS

El objetivo general es estudiar la repercusión clínica de la premutación en el gen *FMR1* en la población residente en Aragón.

Como objetivos específicos se establecen los siguientes:

- 1. Determinar la frecuencia de la premutación de entre todas las muestras analizadas (estudio genético) entre el periodo de 2011 a 2015.
- 2. Precisar qué proporción del total de premutaciones se detectaron en niños y en adultos.
- 3. Definir la proporción de la premutación en el gen *FMR1* en hombres y mujeres.
- 4. Señalar cuál es la prevalencia de las mujeres premutadas con fallo ovárico prematuro (FOP) en el periodo de 2011 a 2015.
- 5. Estudiar cuál es la prevalencia del FXTAS en el total de individuos estudiados en el periodo de 2011 a 2015.
- 6. Observar si existen manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de la premutación en el gen *FMR1*.
- 7. Estimar y analizar el número de interrupciones AGG que se localizan en las mujeres premutadas para el síndrome de X frágil.
- 8. Observar la frecuencia de la mutación C677T del gen *MTHFR* en individuos con premutación en el gen *FMR1*.
- 9. Estudiar si los pacientes premutados presentan alteraciones del perfil tiroideo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo es un estudio retrospectivo observacional. Los datos han sido obtenidos de las bases recogidas en la sección de Genética Clínica y Reproducción Asistida del Hospital Universitario Miguel Servet (H.U.M.S.) de Zaragoza.

La muestra del estudio la componen los individuos que fueron remitidos para estudio genético del SXF, detección de la expansión del triplete CGG, a la sección de Genética Clínica y Reproducción Asistida del H.U.M.S. En su momento las muestras biológicas se analizaron dentro de la rutina del laboratorio de diagnóstico genético, mediante técnicas de biología molecular, para estudiar el número de repeticiones del triplete CGG en el gen *FMR1*.

La muestra de partida para el análisis molecular es ADN, procedente principalmente de sangre periférica con EDTA.

Se incluyeron en el estudio un total de 550 individuos, que fueron estudiados para confirmar/descartar la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* por diferentes indicaciones clínicas, desde enero de 2011 hasta noviembre de 2015. Se eligió este periodo de tiempo, porque en dichas fechas se realizaba el análisis del gen *FMR1* con una técnica diagnóstica que permite mayor precisión que las usadas anteriormente. Así, en dichas muestras se podía hacer una cuantificación precisa del número de repeticiones CGG y el número y posición de las interrupciones AGG. Dicho análisis se realizó con un kit comercial basado en una TP-PCR fluorescente, con análisis de fragmentos en secuenciador capilar. Este kit tiene un error admisible de ± 1 repetición CGG en alelos normales (<55) y de ± 3 en alelos premutados (≥ 55) y ± 5 en alelos premutados con > 100 repeticiones CGGs.

Algunas de las muestras estudiadas también fueron analizadas para la detección de la presencia del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*. En esos casos estudiamos también si existe alguna relación entre el estado de mutación del gen *FMR1* y el polimorfismo del gen *MTHFR*.

Se realizó una revisión exhaustiva de la sintomatología así como anamnesis que presentaban los pacientes con diagnóstico de premutación en el gen *FMR1*. Se evaluaron y elaboraron los árboles genealógicos (*pedigrees*) correspondientes a los individuos portadores de la premutación en el gen *FMR1*.

5. RESULTADOS

Estudio de FMR1 según grupos poblacionales

El criterio para asignar una muestra como premutada es que contenga al menos un alelo en el rango de la premutación (55 a 200 repeticiones CGGs). En los posibles casos de mujeres con dos alelos, si además de un alelo premutado tienen un alelo en el rango de mutación completa, la muestra se clasifica como mutada.

De las 550 muestras analizadas para el gen *FMR1* el 87,27% (480) resultaron en el rango de tamaño normal. Sólo el 6,73% (37) resultaron premutadas y el 4% (22) mutadas. Por último se localizaron en el estrecho intervalo de la zona gris el 2,00% (11) de las muestras (Figura 10).

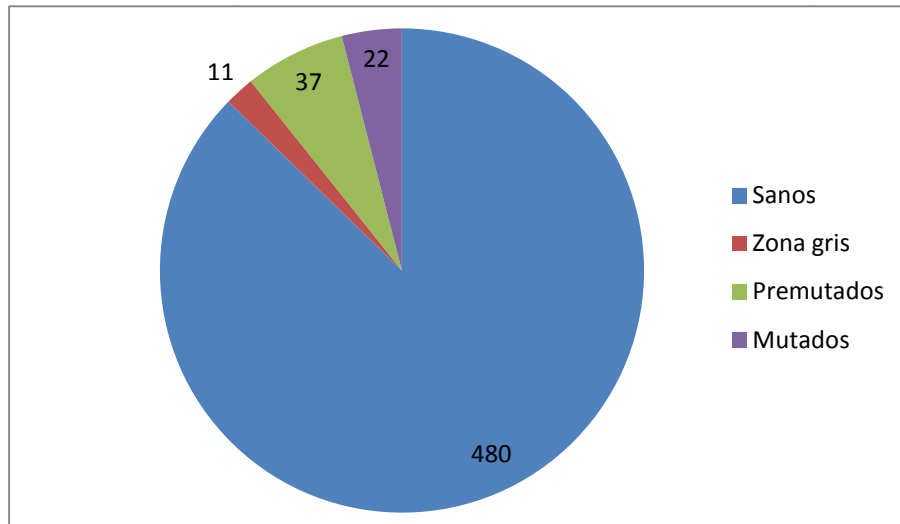


Figura 10. Clasificación de las muestras analizadas para presencia de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* según los tipos de alelos.

Según la edad de los pacientes remitidos, el 75,09% (413) fueron niños (≤ 15 años) y el 24,91% (137) eran adultos (≥ 16). Nos basamos en la edad que tenían los pacientes en el momento en el que se les realizó el estudio genético (Figura 11).

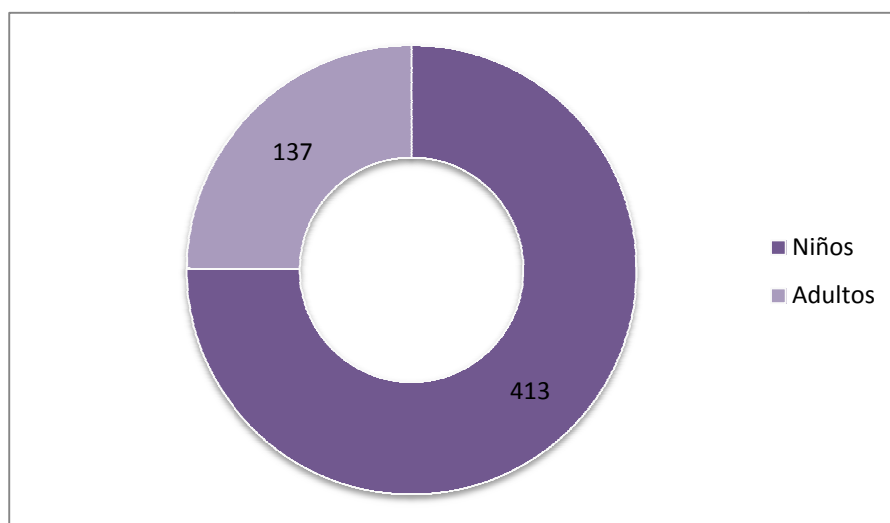


Figura 11. Clasificación de las muestras analizadas según el sexo del paciente.

Según el sexo de las muestras remitidas dentro del grupo de edad de los menores vemos que el 38,50% (159) son niñas y el 61,50% (254) son niños. Entre los adultos, el 77,36% de las muestras pertenecen a mujeres (106) y sólo el 22,53% (31) a hombres (Figura 12).

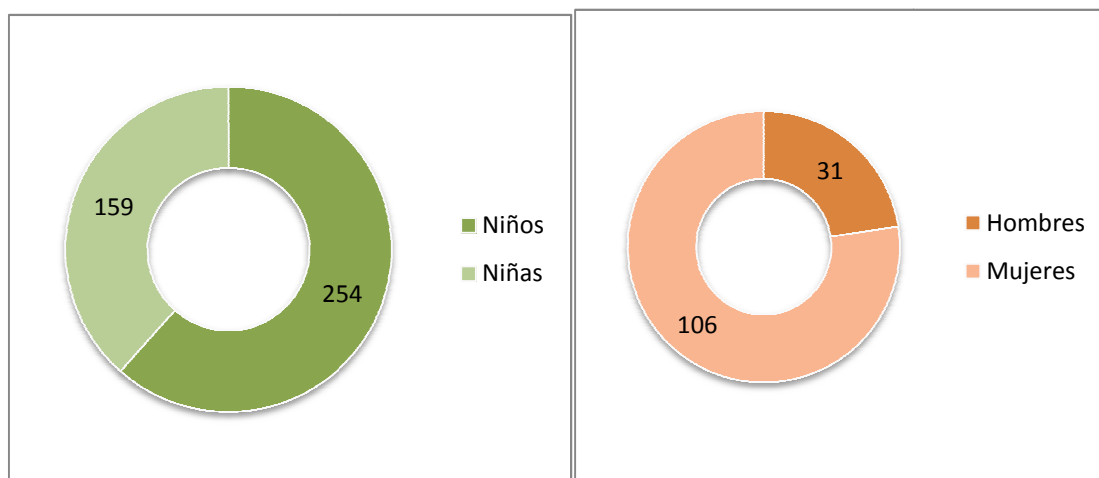


Figura 12. Distribución de las muestras por género dentro de cada grupo de población analizado.

Los resultados de las muestras cuyo diagnóstico fue la premutación (55 a 200 repeticiones del triplete CGG) en el gen *FMR1* también se han clasificado en base a edad y género.

En el total de 39 muestras un 15,38% (6) pertenecen a niños y el resto a adultos. De las pertenecientes a niños, son la mitad de cada sexo. En el caso de los adultos, la clasificación por sexo se desequilibra, habiendo un 69,70% (23) de muestras pertenecientes a mujeres, y sólo un 30,30% (10) de hombres (Tabla 6).

Analizando esta vez los resultados por sexo y luego por edad, vemos que la frecuencia de las muestras femeninas entre el total de premutadas es del 66,67% (26). Dentro de ese grupo el 88,46% son de mujeres adultas y tan sólo el 11,54% (3) son de niñas. En el grupo de varones, el 76,92% (10) pertenecen a adultos y el 23,08% (3) a niños (Tabla 7).

Tabla 6. Distribución por edad y género dentro del grupo de premutados.

| Clasificación por edad | Nº frecuencia (%) | Género | Nº frecuencia (%) |
|------------------------|-------------------|---------|-------------------|
| Niños premutados | 6 (15,38) | varones | 3 (50) |
| | | mujeres | 3 (50) |
| Adultos premutados | 33 (84,62) | varones | 10 (30,30) |
| | | mujeres | 23 (69,70) |

Tabla 7. Distribución por género y edad dentro del grupo de premutados.

| Clasificación por sexo | Nº frecuencia (%) | Grupo edad | Nº frecuencia (%) |
|------------------------|-------------------|------------|-------------------|
| Varones premutados | 13 (33,33) | niños | 3 (23,08) |
| | | adultos | 10 (76,92) |
| Hembras premutadas | 26 (66,67) | niñas | 3 (11,54) |
| | | adultas | 23 (88,46) |

Prevalencia de Fallo Ovárico Prematuro (FOP) en mujeres premutadas

En el periodo 2011 – 2015 se analizaron un total de 26 mujeres premutadas para FMR1. Tres de ellas sufrían indicios de insuficiencia ovárica prematura (IOP). Todas ellas pertenecen a la misma familia (identificada como C). En la Tabla 8 se muestra su indicación diagnóstica (fenotipo/sintomatología/clínica) para la solicitud del estudio genético de la detección de la presencia de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* y el parentesco con el caso índice (probando) que fue un varón que presentaba SXF. Hay otros miembros de esta familia afectados por algún tipo de trastorno asociado a la presencia de la mutación dinámica, expansión del triplete CGG en el gen *FMR1*, que se detallan en el árbol genealógico correspondiente más adelante (Familia C).

Tabla 8. Pacientes premutadas que presentaron síntomas de Fallo Ovárico Prematuro (FOP).

| ID muestra | Edad (años) en el momento diagnóstico genético | Indicación diagnóstica | Parentesco con el caso índice | Alelo 1 (repeticiones CGG) | Alelo 2 (repeticiones CGG) |
|------------|--|---|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| PM12 | 53 | FOP a los 36 años. Epilepsia (ausencias) desde la infancia. Tendencia a la depresión. Orejas grandes. | TIA MATERNA | 30 | 94 |
| PM14 | 45 | Orejas grandes y despegadas. Depresión | PRIMA SEGUNDA | 32 | 85 |
| PM15 | 50 | Orejas grandes y despegadas/ tendencia a la depresión y cambios del estado del ánimo | PRIMA SEGUNDA | 33 | 87 |

Estas tres pacientes, a pesar de ser diagnosticadas de su condición de premutadas y portadoras del SXF con más de 45 años de FXPOI, reportaron haber sufrido desajustes en el periodo antes de los 40 años. Todas ellas presentan tamaños de alelos en la parte intermedia de la PM (de 80 a 100 repeticiones CGG). El resto de mujeres premutadas para el gen *FMR1* mayores de 35 años (13), no fueron diagnosticadas de FXPOI. Esto supone un 81,25% en la muestra analizada en este trabajo (Tabla 9).

Tabla 9. Casos de mujeres premutadas mayores de 35 años confirmadas mediante estudio genético y su indicación diagnóstica.

| ID muestra | Edad (años) en el momento del diagnóstico genético | Indicación diagnóstica | Alelo 1 (repeticiones CGG) | Alelo 2 (repeticiones CGG) |
|------------|--|--|----------------------------|----------------------------|
| PM4 | 43 | Familiares afectos y portadores de SXF | 30 | 70 |
| PM6 | 62 | Nieto afecto de SXF | 29 | 70 |
| PM7 | 65 | Hermana portadora de premutación | 28 | 60 |
| PM8 | 44 | Madre de afecto de SXF. Alteración microdelección 1q21.1. Posible FOP 44 años. | 29 | 122 |
| PM10 | 37 | Madre de premutado | 29 | 56 |
| PM11 | 78 | Abuela de afecto de SXF, hija premutada | 21 | 84 |
| PM17 | 39 | Madre de afecto de SXF | 30 | 89 |

| | | | | |
|------|----|---|-------------------|-----|
| PM18 | 46 | Madre de afecta de SXF | 30 | 106 |
| PM19 | 35 | Gestante portadora del SXF. Confirmación del estado de la presencia de la expansión del triplete CGG | 34, 69, 112, 239* | |
| PM23 | 57 | Reevaluación: en estudio previo premutada sin saber el número de repeticiones. Madre de paciente con mosaïcismo. 2 sobrinos varones afectados de SXF. | 30 | 79 |
| PM24 | 51 | Reevaluación de la condición de portadora /premutada por TP-PCR. Madre de afecta de FRAXA y otros antecedentes familiares. | 29, 126, 180* | |
| PM25 | 46 | Reevaluación de la condición de portadora. Madre de afecta de FRAXA. | 30 | 72 |
| PM26 | 86 | Reevaluación de estudio previo en el año 1997. | 30 | 65 |

*Mosaïcismos (más de dos alelos en el rango de la premutación en el gen *FMR1*, *mosaico en el rango premutación*, o alelos en el rango de la premutación más alelos en el rango de mutación completa, *mosaico premutación/mutación completa*)

De entre los 16 casos de mujeres premutadas analizadas se encontraron 2 muestras con mosaïcismos, que contienen alelos normales, premutados y/o mutados, en total más de 2 (2 alelos sería lo normal para una mujer con dos copias del cromosoma X). Es relevante la detección de alelos con diferentes tamaños del triplete CGG ya que esto puede tener mucha repercusión a la hora de ver la correlación del número de repeticiones con el cuadro clínico. Por ejemplo las mujeres con mosaïcismo premutación/mutación completa no presentarían FXPOI. Gestantes con mosaïcismo en premutación/mutación completa tendrían un mayor riesgo de expansión del triplete CGG en la siguiente generación. Además, en los mosaïcicos es importante ver el porcentaje de metilación de todos los alelos mutados completos y en el rango de la PM.

Prevalencia de FXTAS en pacientes premutados

Entre todos los pacientes remitidos a la consulta para el estudio de la condición de premutación en el gen *FMR1*, sólo un individuo mostró tener síntomas de FXTAS. Se trataba de un hombre de 77 años, que comenzó con temblores intencionales en manos y depresión a los 62 años. Este hombre es tío abuelo materno del probando (caso índice), diagnosticado con SXF a los 10 años (Familia C).

Posee un único alelo de unas 87 ± 3 repeticiones CGG en el rango de la premutación y una sola interrupción AGG.

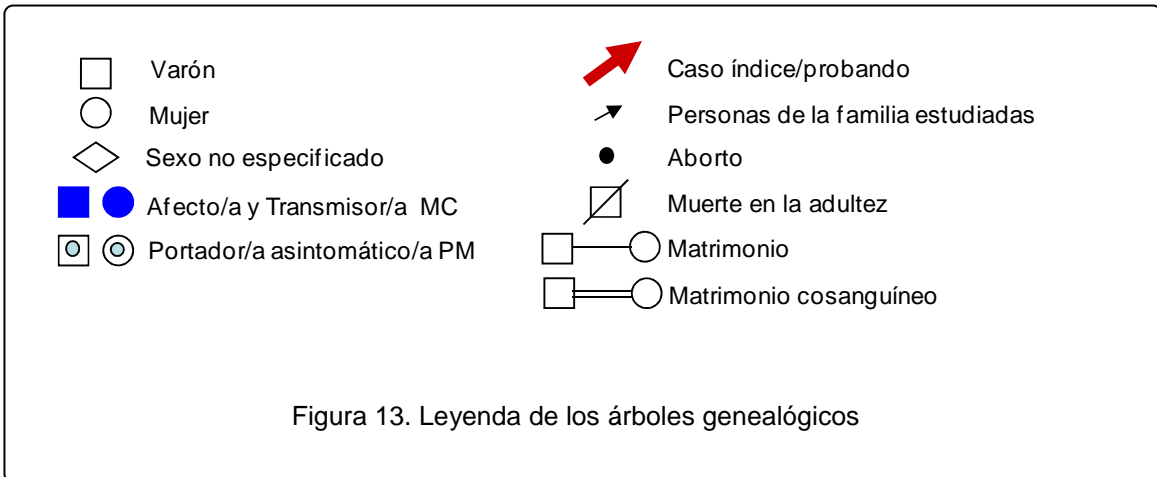
Otras manifestaciones clínicas asociadas

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes entre los niños se encuentran el retraso psicomotor y del lenguaje. Por su parte, los adultos muestran a menudo orejas grandes y desplegadas, tendencia a la depresión y cambios del estado del ánimo.

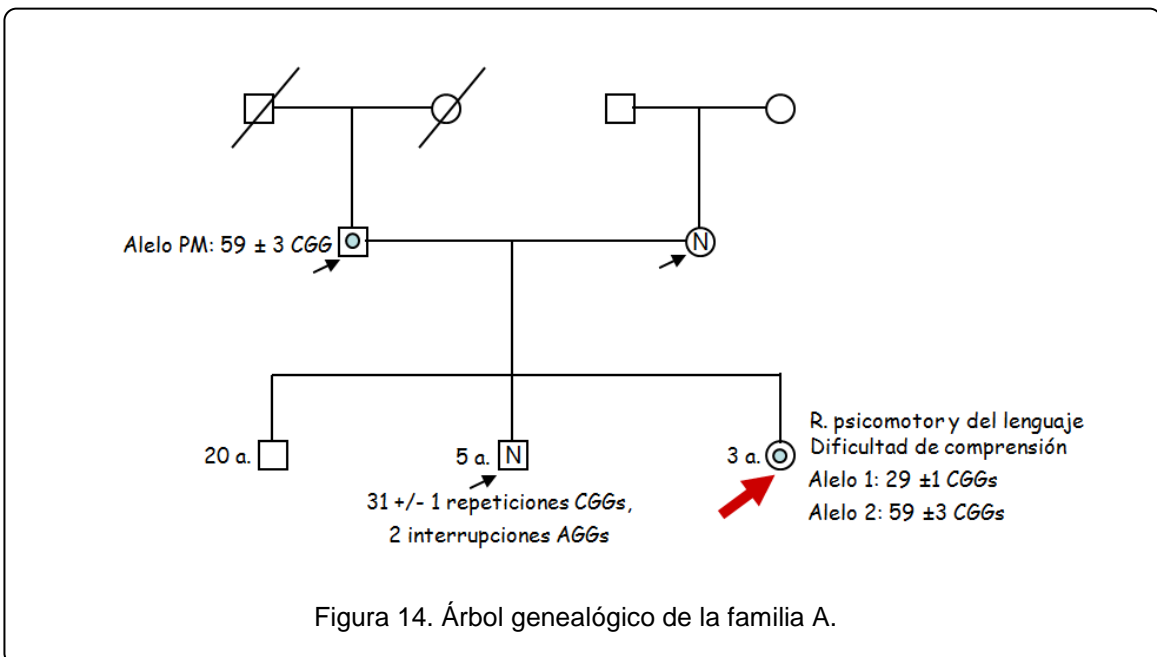
En los árboles genealógicos, *pedigrees*, cuya simbología para correcta interpretación se recoge en la Figura 13, se describen con mayor detalle los trastornos descritos en las familias estudiadas.

Evaluación de los árboles genealógicos de las familias estudiadas

Se realizó un análisis de todas las indicaciones diagnósticas, sintomatología y cuadros clínicos que presentaban los pacientes y sus respectivos familiares.



❖ Familia A (Figura 14)

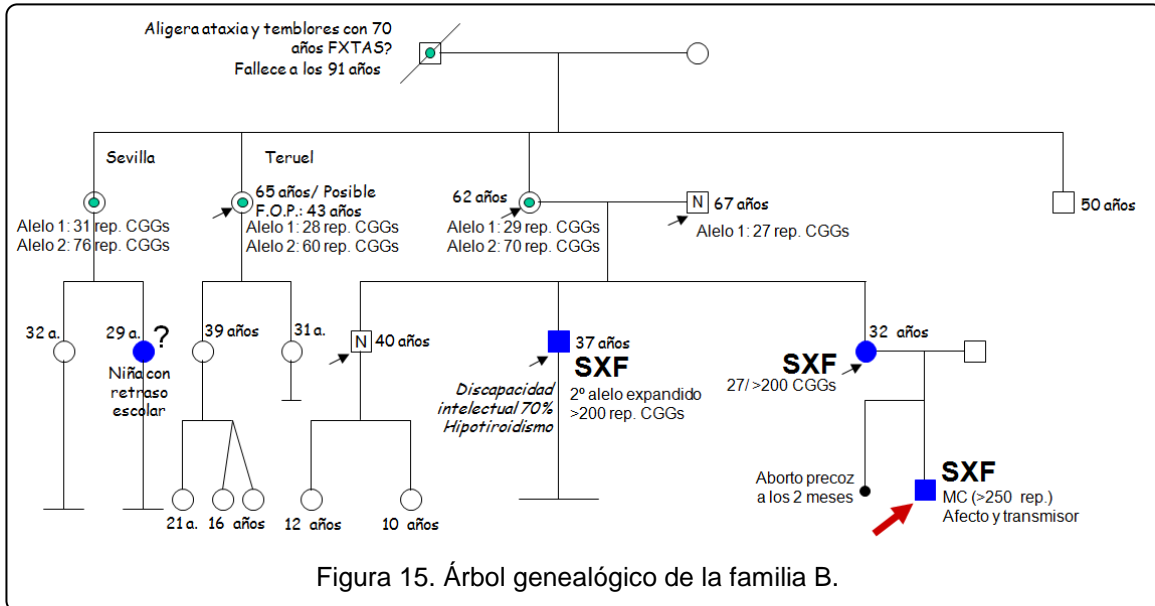


El caso índice de este familia era una niña de 3 años que presentaba retraso psicomotor y del lenguaje. En el estudio genético de la presencia de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* se descubrió su condición de premutada. A raíz de este hallazgo y recibiendo los familiares el correspondiente asesoramiento genético se procedió a estudiar a uno de sus hermanos ya que éste refería un cuadro clínico más leve pero similar al que presentaba la probando y a los progenitores.

La paciente probando heredó su alelo premutado de su progenitor (rama paterna), que poseía un alelo de unas 59 (± 3) repeticiones CGG.

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

❖ Familia B (Figura 15)



El caso índice en esta familia era un niño de 2 años que presentaba retraso psicomotor y fenotipo peculiar: nariz plana, frente amplia, orejas grandes y desplegadas. Se indicaba que existía un tío materno con discapacidad intelectual de origen no filiado en principio aunque en la historia se justificaba por el hipotiroidismo congénito. Además, él presentaba testículos de tamaño grande en la pubertad, acompañado de timidez y evitación de la mirada. Se le diagnosticó afecto del síndrome de X Frágil, con más de 250 ± 10 repeticiones CGG.

Se estudió a la madre del caso índice, que también resultó ser afecta del SXF. La paciente manifestaba que presentaba tendencia a la depresión y fenotípicamente se evidenciaban orejas grandes y despegadas. Se pudo confirmar que un hermano de la madre del paciente probando también había heredado el alelo mutado (> 200 repeticiones CGG) y por lo tanto se le debía etiquetar como SXF. El cuadro clínico, fenotipo que presentaba el tío materno del probando se justificaba por la presencia de la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1*. Así, se confirmó que la discapacidad intelectual del paciente no era debida al hipotiroidismo sino más, sino a la presencia de un único alelo de más de 200 repeticiones CGG (mutación completa) y completamente metilado. Se debe reflexionar que ante niños con hipotiroidismo congénito más macroorquidismo y cierto retraso psicomotor habría que sospechar de SXF. El tercer hermano, varón, tío del probando, fue analizado encontrándole que presentaba un alelo en el rango normal, motivo por el cual sus dos hijos no fueron estudiados.

Ascendiendo en el árbol genealógico se estudió a los abuelos del probando, resultado el abuelo normal y la abuela premutada para el gen *FMR1*. A raíz de este descubrimiento se estudió a sus dos hermanas, resultando ambas premutadas. Esto permitió recomendar un adecuado asesoramiento genético para las tías abuelas del probando ya que una de ellas tenía una hija de 29 años que había sufrido cierto retraso escolar/ discapacidad intelectual, aunque no pudo ser confirmada su condición de afecta para el SXF por residir en otra comunidad autónoma.

El origen al que nos pudimos remontar en esta familia fue la madre de las tres mujeres premutadas y bisabuela del probando, que falleció a los 91 años y sufría una ligera ataxia y temblores desde los 70 por lo que aunque desgraciadamente no se pudo confirmar parecía que dicha paciente podría ser un FXTAS.

❖ Familia C (Figura 16)

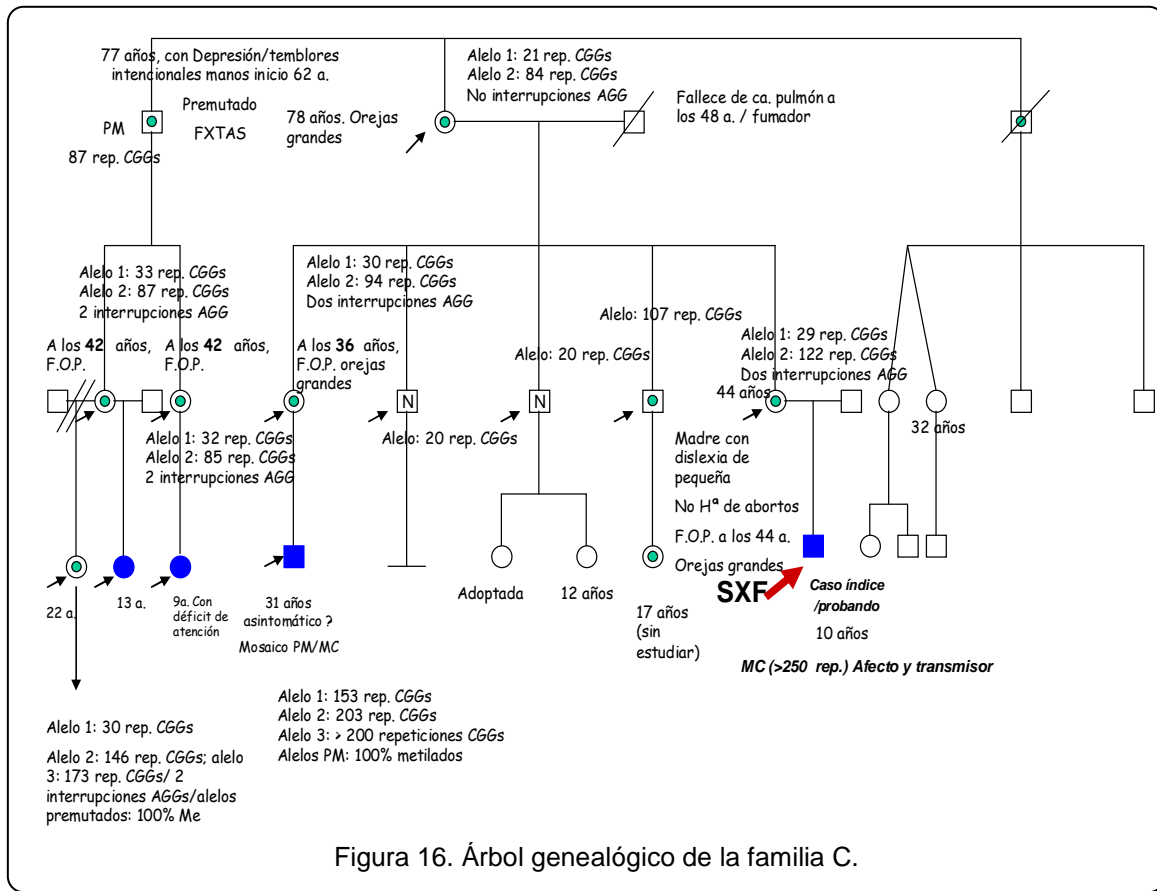


Figura 16. Árbol genealógico de la familia C.

El caso índice de esta familia fue un niño de 10 años, que presentaba fenotipo compatible con SXF: frente amplia, orejas grandes y evertidas, cara alargada, retraso escolar, hiperactividad y déficit de atención. Al realizar el estudio genético se vio que poseía el alelo con la mutación completa (>250 repeticiones CGGs). Debía ser considerado afecto y transmisor del SXF.

A partir de este momento se estudió a sus familiares directos. Su madre presenta fallo ovárico precoz (FOP) a los 44 años, y molecularmente se descubre que es premutada, con un alelo en el rango de la premutación de unas 122 ± 5 repeticiones CGGs (29/122 CGG), con dos interrupciones AGG.

Los 4 hermanos de la madre son estudiados también. La hermana es una paciente de 53 años con epilepsia desde la infancia y tendencia a la depresión, FOP a los 36 años y fenotípicamente con orejas grandes, resulta premutada con un alelo en el rango de la premutación de unas 94 ± 3 repeticiones CGGs (30/94 CGG); ésta tiene un hijo de 31 años asintomático en principio, en el que se decide realizar el estudio molecular, hallándose un mosaicismo PM/MC (153, 203, >200 repeticiones CGGs), destacando un alelo en el rango de la premutación de unas 153 ± 5 repeticiones CGG y otro alelo justo en la frontera premutación/mutación completa sin metilar.

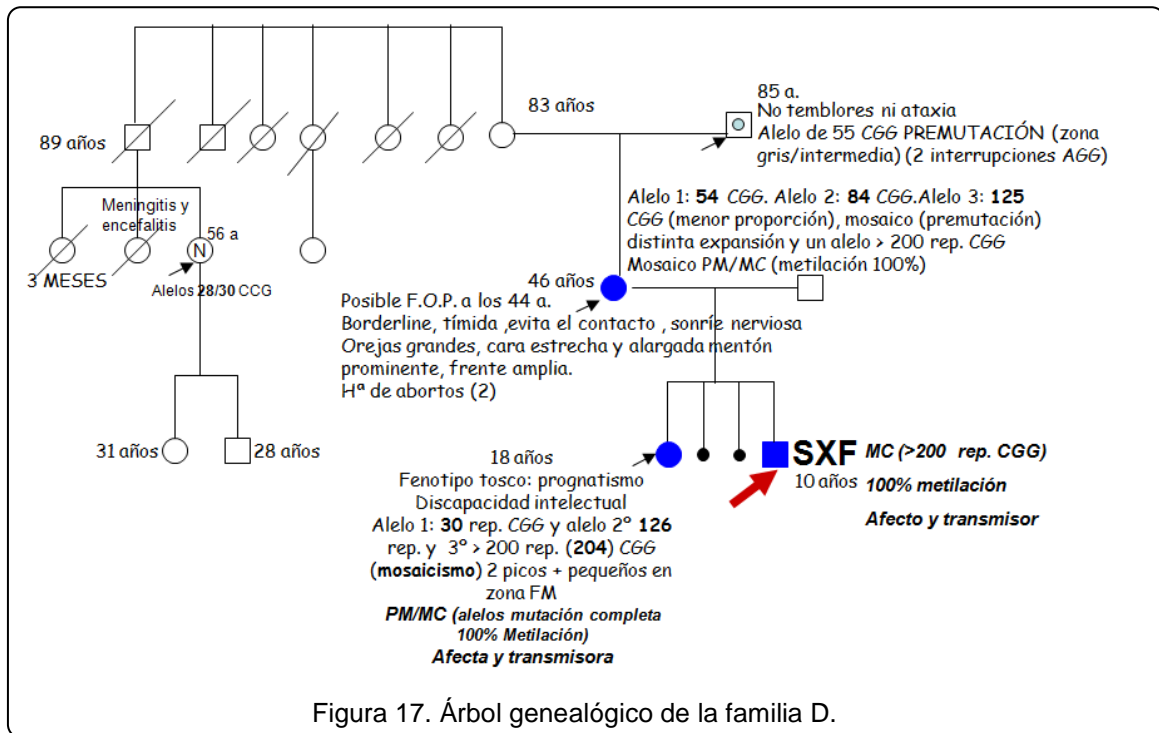
Dos de los tíos varones del paciente probando presentaban un número de repeticiones CGGs en el rango de la normalidad y el tercer varón posee un alelo de unas 107 ± 5 repeticiones CGGs y un fenotipo con orejas grandes. Éste a su vez tiene una hija de 17 años asintomática y sin estudiar, pero que obligatoriamente tiene que ser premutada para el gen FMR1 ya que su progenitor (padre) le habrá transmitido el cromosoma X con el alelo en el rango de la

premutación. Es importante confirmar la condición de premutada en dicha paciente de cara a ofrecerle un adecuado asesoramiento genético para planificar su futura descendencia.

La madre de los 5 pacientes descritos en el párrafo anterior y abuela del paciente probando presentaba orejas grandes y no tuvo FOP. Se le realiza el estudio molecular y resulta poseer la premutación, presentando un alelo de unas 84 ± 3 repeticiones CGGs (21/84 CGG) sin interrupciones AGG. En esta rama de la familia se observa el fenómeno de expansión del alelo premutado según avanzan las generaciones.

El tío abuelo, hermano de esta mujer es un anciano de 77 años con depresión y temblores intencionales en las manos que se iniciaron a los 62 años. Dicho paciente estaba erróneamente diagnosticado de parkinson. Resulta tener un alelo con 87 repeticiones CGG. Es el único paciente de este estudio diagnosticado de FXTAS. Tuvo dos hijas, ambas premutadas, actualmente en estudio y exploración neurológica. La primera era una paciente de 50 años con FOP a los 42, con orejas grandes y despegadas, tendencia a la depresión y cambios del estado de ánimo, con un alelo en el rango de la premutación de unas 87 ± 3 repeticiones CGGs (33/87 CGG); ésta tuvo una hija con mosaico con alelos en el rango de la premutación, 100% metilados con un cuadro clínico característico de las mujeres portadoras del SXF; y también una niña que con 13 años le detectaron la mutación completa (30/>200) y poseía la clínica y fenotipo característicos (hiperactiva, orejas despegadas). La segunda hija del anciano con FXTAS, también premutada, era una paciente de 45 años con FOP a los 42 años, al igual que su hermana, con orejas grandes y despegadas y también depresión (32/85 CGG); tuvo una hija que con 9 años mostraba déficit de atención, dificultad escolar especialmente en el área de las matemáticas, a la que también se le descubrió la presencia de la mutación completa (20/>200). Además esta niña tenía los pabellones auriculares grandes y algo despegados, la cara alargada, abundante vello en las 4 extremidades y en el tronco, y se mostraba miedosa cuando se encontraba en centros comerciales y a los ruidos. También sufría de rabiets y manías por temporadas.

❖ Familia D (Figura 17)



El caso índice en esta familia fue un niño de 10 años con sintomatología propia del SXF. Se demostró que poseía un alelo mayor de 200 repeticiones CGG, 100% metilado.

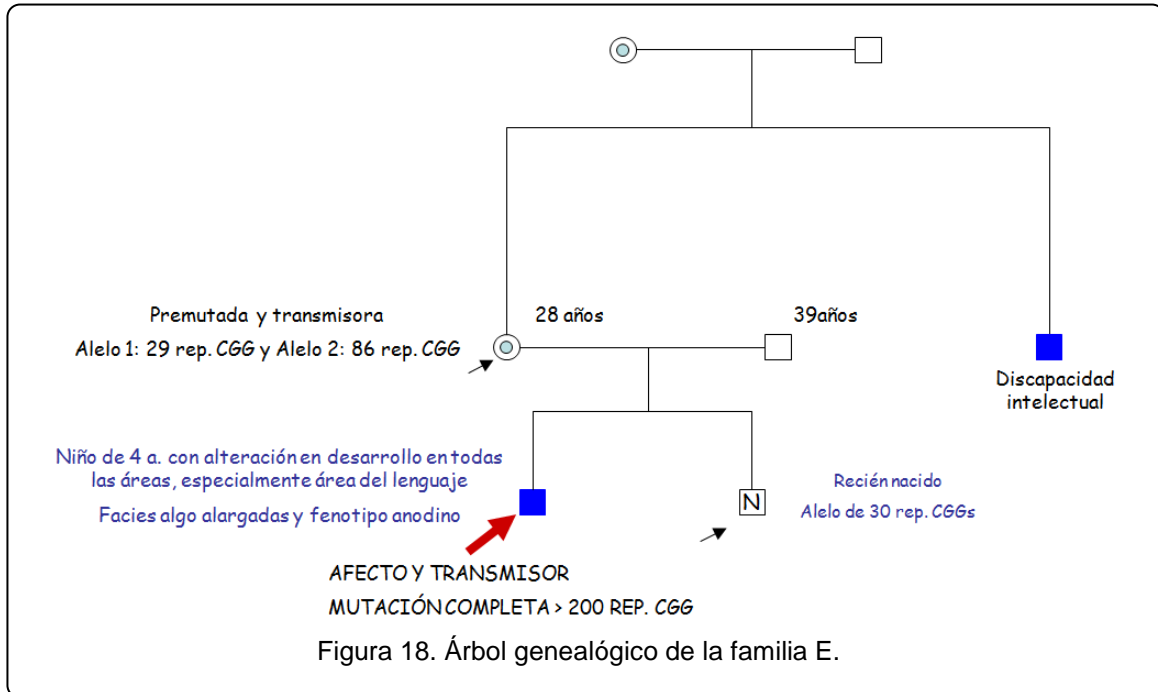
Su hermana de 18 años presentaba fenotipo toscos, prognatismo, orejas grandes, cara estrecha y alargada, y mentón prominente. Además tenía pies planos, otitis de repetición, trastornos del sueño (insomnio) y pequeñas crisis epilépticas. En el área neurocognitiva presentaba problemas de aprendizaje, retraso en el lenguaje, dificultad en matemáticas y déficit de atención, poniendo de manifiesto una clara discapacidad intelectual. Tenía varios alelos en mosaicismo entre premutación y mutación completa (30 ± 1, 126 ± 5, varios alelos de >200 ± 10 repeticiones CGGs). La paciente es afectada y transmisora del SXF.

La madre de ambos era borderline, tímida, evitaba el contacto visual y sonreía nerviosa. Tenía las orejas grandes, la cara estrecha y alargada, el mentón prominente y la frente amplia. Reseña haber tenido 2 abortos. En el estudio molecular se vio que presentaba un alelo gris (54 CGG) y uno premutado (84), además de otros alelos en menor proporción (125/>200 CGG). Por lo que era un mosaicismo de premutación/mutación completa con los alelos en el rango de la mutación completa y en el rango de la premutación casi 100% metilados, lo que justificaría la clínica de la paciente.

Pudo estudiarse al abuelo del probando, un hombre de 85 años que no presentaba temblores ni ataxia. Poseía un alelo de 55 repeticiones CGG en el límite inferior del rango de la premutación, casi alelo intermedio, con 2 interrupciones AGG. Como la hija poseía dos alelos intermedios sabemos que uno debió transmitírselo el padre y el otro la madre, a la que no se pudo analizar por negación de la hija aunque se pudo corroborar que presentaba temblores y cierta demencia.

Se estudió la rama familiar de esta mujer. Tenía 4 hermanas y dos hermanos, todos ellos fallecidos en el momento del estudio familiar. El primer de los varones tuvo descendencia: dos niños que murieron jóvenes, uno de ellos con meningitis y encefalitis, y la mujer que prosperó tenía entonces 56 años y alelos en el rango normal para el gen *FMR1* (28/30 CGG). Por este motivo, sus dos hijos no fueron estudiados genéticamente para el SXF dentro de la rutina del laboratorio.

❖ Familia E (Figura 18)



En esta familia el caso índice fue un niño de 4 años con alteración en el desarrollo de todas las áreas, especialmente la del lenguaje. Poseía facies algo alargadas y resto del fenotipo anodino. Se le hizo el análisis genético molecular y se vio que poseía la mutación completa (alelo con más de 200 repeticiones CGG). Tenía un hermano recién nacido que fue estudiado y resultó tener el alelo normal (30 ± 1 repeticiones CGG).

El alelo premutado del probando tenía que proceder de la madre, así que fue analizada, encontrándose un alelo en el rango de la premutación de unas 86 ± 3 repeticiones CGGs (29/86) y con una sola interrupción AGG.

La madre tenía un hermano con discapacidad intelectual, aunque ni él ni otros miembros de la familia pudieron ser estudiados. El origen de esta familia era de Marruecos.

❖ Familia F (Figura 19)

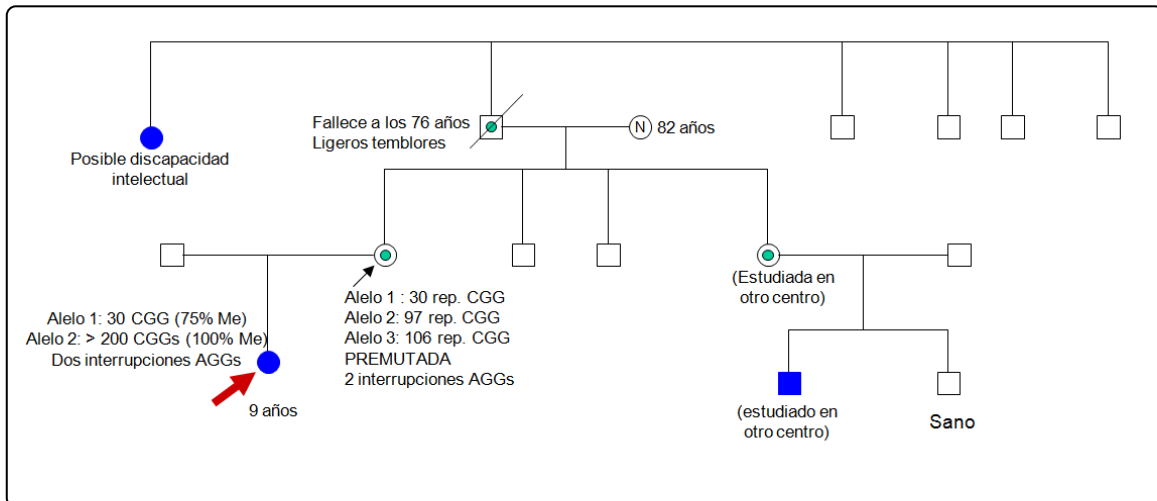


Figura 19. Árbol genealógico de la familia F.

Este estudio familiar comenzó con una niña de 9 años que presentaba trastorno del espectro autista y fenotipo anodino. Se reportaron antecedentes familiares de retraso y discapacidad intelectual por SXF (primo de la rama materna).

Se estudió a su madre que era la portadora de la premutación, con 3 alelos, dos de ellos en mosaicismo en el rango de la premutación, unas 97 ± 3 y unas 106 ± 5 , respectivamente (30, 97, 106 repeticiones CGG).

La tía materna del probando ya había sido estudiada y diagnosticada como portadora de la premutación en un centro de otra comunidad autónoma, así como el hijo de ésta, diagnosticado como afecto de SXF.

Los demás miembros no pudieron ser estudiados genéticamente, pero el abuelo, ya fallecido, presentaba ligeros temblores, lo que podría encajar con un posible FXTAS. Una hermana de éste tenía discapacidad intelectual, pero no se pudo verificar con el estudio genético.

❖ Familia G (Figura 20)

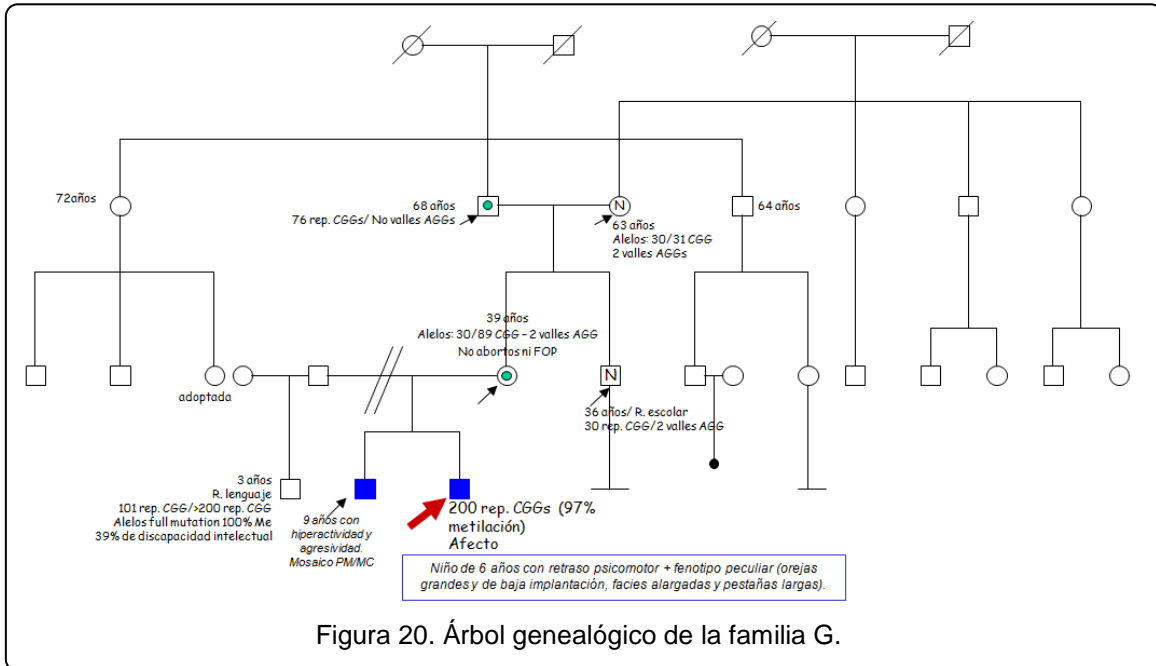


Figura 20. Árbol genealógico de la familia G.

El caso índice en esta familia fue un niño de 6 años que presentaba retraso psicomotor y fenotipo peculiar: orejas grandes y de baja implantación, facies alargadas y pestañas largas. Fue analizado molecularmente y diagnosticado de SXF con un alelo de 200 repeticiones (97% metilado).

Su hermano de 9 años presentaba muestras de hiperactividad y agresividad, y un 39% de discapacidad intelectual. El análisis genético mostró un alelo de unas 101 ± 5 repeticiones CGG (0% metilación), y un 2º alelo con más de 200 repeticiones (100% metilado), sin interrupciones AGG. Por lo que se trataba de un mosaicismo premutación/mutación completa pero con clínica de SXF.

Analizando el pedigree se observaba que el caso índice tenía un hermano solo por parte de padre que refería que tenía retraso en el área del lenguaje sin filiar pero no sería justificado por la expansión del triplete CGG en el gen *FMR1*.

La madre de estos niños era una mujer de 39 años, con orejas grandes y que sufría cambios bruscos del estado del ánimo. Tenía baja reserva ovárica pero no presentaba FOP ni había tenido abortos. Se le detectaron dos alelos de unas 30 ± 1 repeticiones CGGs, en el rango de la normalidad (58% metilado) y unas 89 ± 3 repeticiones CGGs en el rango de la premutación (97% metilado).

La madre tenía un hermano con retraso escolar pero normal desde el punto de vista de las repeticiones CGGs con 30 repeticiones y dos valles AGG.

El estudio genético continuó con los abuelos maternos: la mujer resultó normal y el hombre premutado (76 ± 3 repeticiones CGGs sin valles AGG). Por lo tanto este es el origen del alelo inestable que fue expandiéndose de generación en generación.

❖ Familia H (Figura 21)

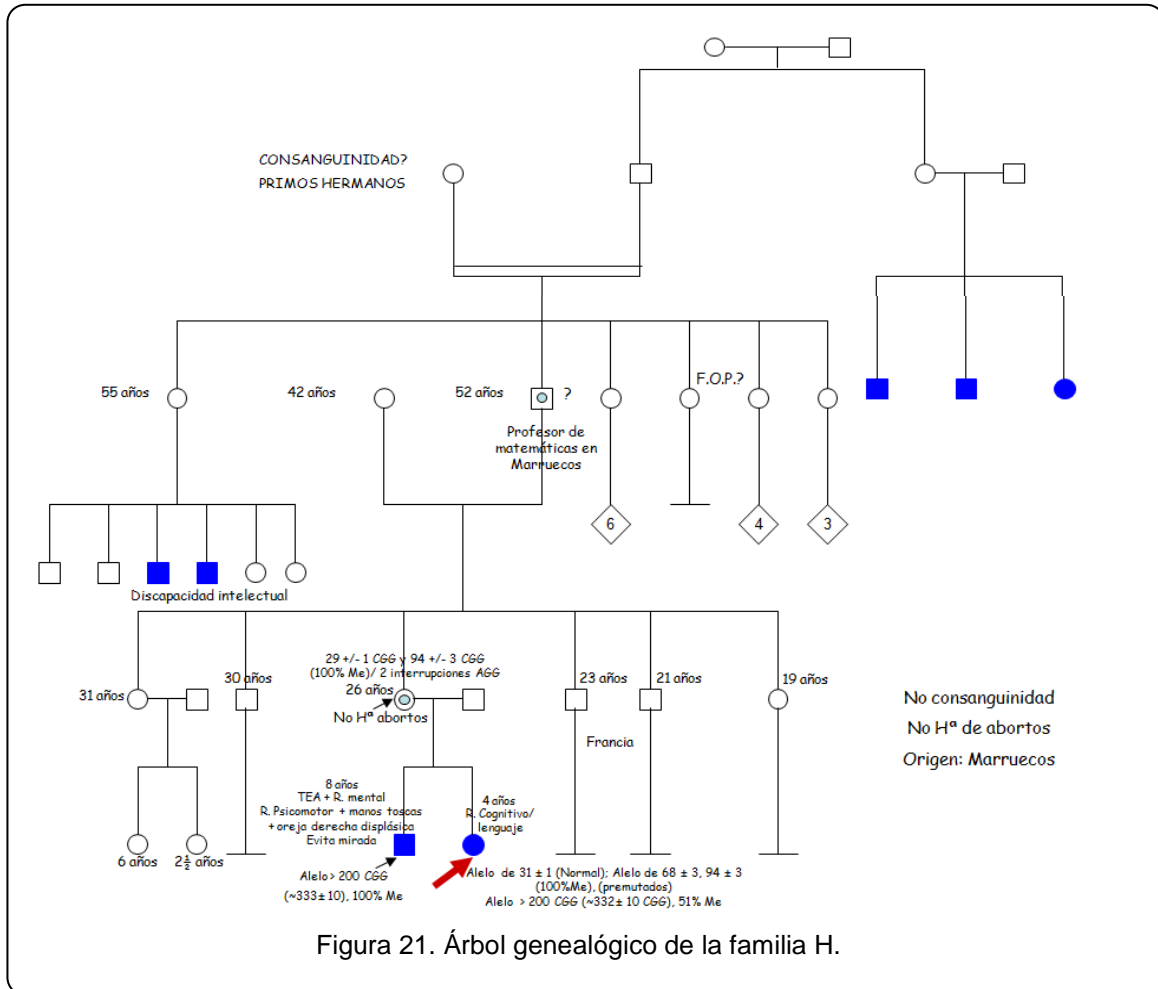


Figura 21. Árbol genealógico de la familia H.

En esta familia el caso índice fue una niña de 4 años, que presentaba retraso cognitivo y del lenguaje, con fenotipo peculiar: frente amplia. El origen de esta familia es Marruecos. Al ser analizada genéticamente para detectar la presencia de expansión del triplete CGG en el gen *FMR1*, se observó que poseía un mosaicismo premutación/mutación completa con alelos de unas 31 ± 1 , 68 ± 3 , 94 ± 3 repeticiones CGGs, siendo este último alelo premutado 100% metilado y un alelo en el rango de mutación completa de >200 ($\sim 332 \pm 10$, 51% metilación) repeticiones CGG.

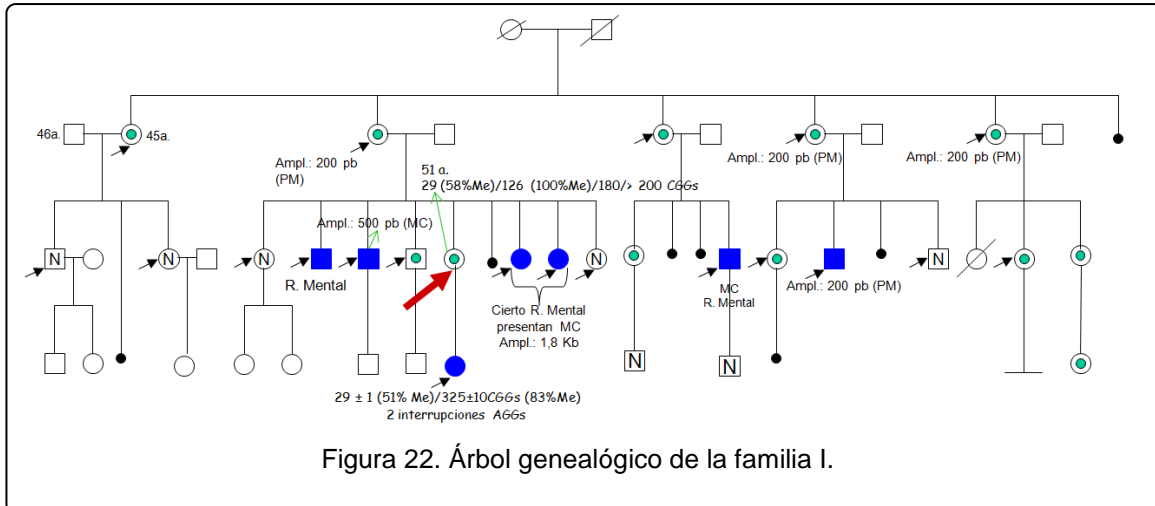
Se analizó también a su hermano, un niño de 8 años con trastorno del espectro autista, retraso mental y psicomotor, y un fenotipo característico de manos toscas y oreja derecha displásica. También evitaba la mirada de las personas que se dirigían a él. Fue diagnosticado de SXF por presentar un único alelo en el rango de la mutación completa ($333 \text{ CGG} \pm 10$ repeticiones CGGs).

El origen de la transmisión de la expansión del triplete CGG en el caso índice y su hermano debía ser materna. Por ello esta paciente fue estudiada genéticamente y se vió que poseía el alelo premutado de unas 94 ± 3 repeticiones CGGs ($29/94 \text{ CGG}$). No había tenido abortos previos y era demasiado joven para poder pensar en un posible FXPOI. Su reserva ovárica era buena tras los estudios hormonales pertinentes realizados.

Esta mujer tenía dos hermanas y tres hermanos que residen en Francia. Sólo una de sus hermanas había tenido descendencia en ese momento: dos niñas de 6 y 2 años y medio. Que desconocemos si presentaban alguna clínica.

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

❖ Familia I (Figura 22)



Los dos primeros casos de esta familia, madre e hija, fueron analizadas genéticamente hace 17 años mediante PCR convencional y Southern Blot. La niña fue diagnosticada de SXF a los 2 años, y su madre fue reportada como premutada.

Dos tías y dos tíos de la niña fueron diagnosticados como enfermos de SXF, un tío como premutado y otras dos tías no eran portadoras de la premutación. Además la abuela fue confirmada de ser premutada para el SXF.

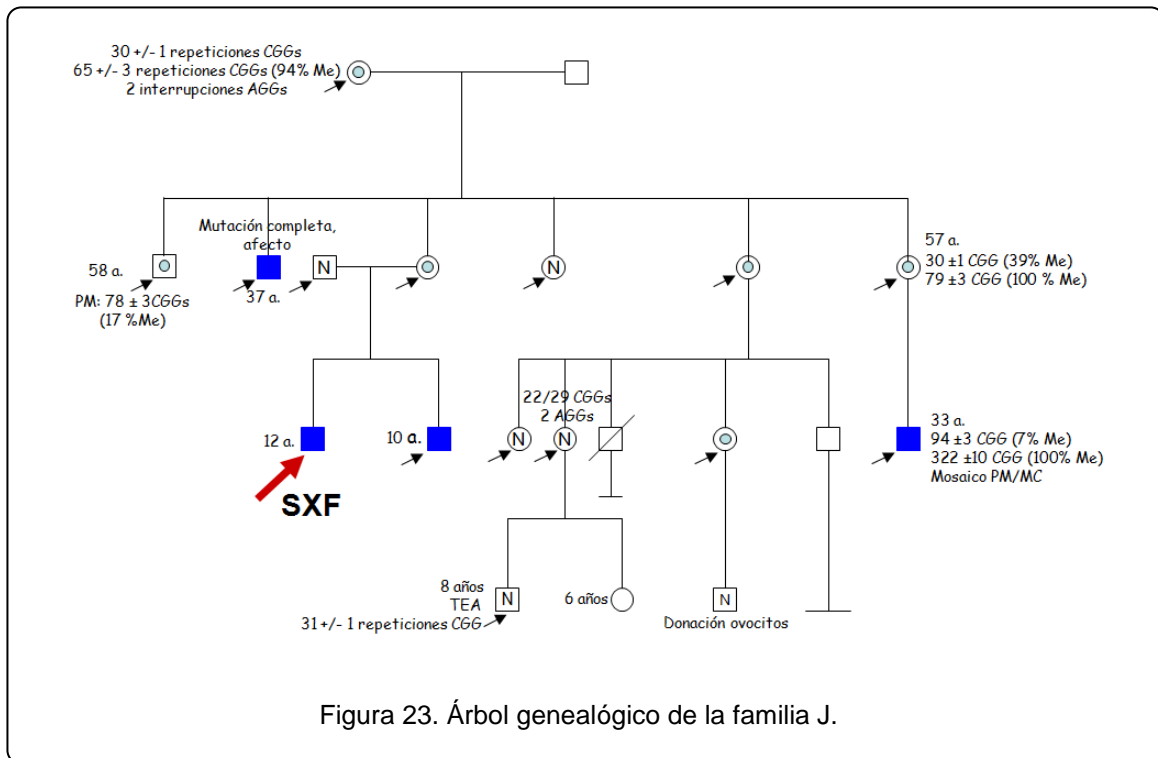
Ascendiendo en el árbol genealógico, se detectaron 4 mujeres más portadoras de la premutación, tías-abuelas de la niña con SXF. Todos estos estudios genéticos se hicieron hace años mediante la técnica de PCR seguida de Southern Blot. Por este motivo se indica el tamaño del fragmento obtenido y no el número de repeticiones exacto, aunque entre paréntesis detallamos el tipo de alelo correspondiente según su longitud.

Algunos de los hijos e hijas de esa generación resultaron normales y otros premutados o mutados. En el primer caso su descendencia ya no fue estudiada, pero sí cuando se encontraba algún alelo patológico.

En todas las generaciones se encontraron casos de abortos, lo que indica que muchos de esos fetos podrían tener una gran expansión del triplete CGG en el gen FMR1, con una patología que podría justificar que no llegaran al final de la gestación.

Con el avance de la técnica, los dos primeros casos (madre e hija) fueron reevaluados. Las muestras fueron analizadas mediante TP-PCR. Se confirmaron los diagnósticos dados años atrás. La madre poseía una premutación de alelos en mosaicismo premutación/mutación completa (29, 126, 180, >200 CGG). La hija poseía la mutación completa, con un alelo de unas 325 repeticiones CGG completamente metilado (29/325).

❖ Familia J (Figura 23)



El caso índice de esta familia fue un varón de 12 años, diagnosticado con SXF. A su hermano de 10 años se le encontró la mutación completa. Su madre era la transmisora del alelo patológico, resultando ella ser premutada para el SXF.

La abuela materna del probando también presentaba la premutación con un alelo de unas 65 repeticiones CGGs (30/65 CGG). De sus dos tíos varones, uno era premutado (78 ± 3 repeticiones CGG y sin interrupciones AGG) y el otro mutado completo y afecto, ambos sin descendencia. De las tres tías maternas, una resultó presentar un alelo en el rango de la normalidad y las otras dos eran premutadas. El único hijo de esta última fue analizado a los 33 años y encontrado mosaico PM/MC (94/322 CGG), pero el paciente se mostraba asintomático. Por el contrario, la otra tía materna premutada tuvo 3 mujeres y 2 varones. Sólo las mujeres fueron evaluadas. Dos de ellas resultaron tener alelos sanos, y la tercera era premutada, por eso tuvo que recurrir a la donación de ovocitos para tener descendencia. Se observa una expansión del número de repeticiones de generación en generación.

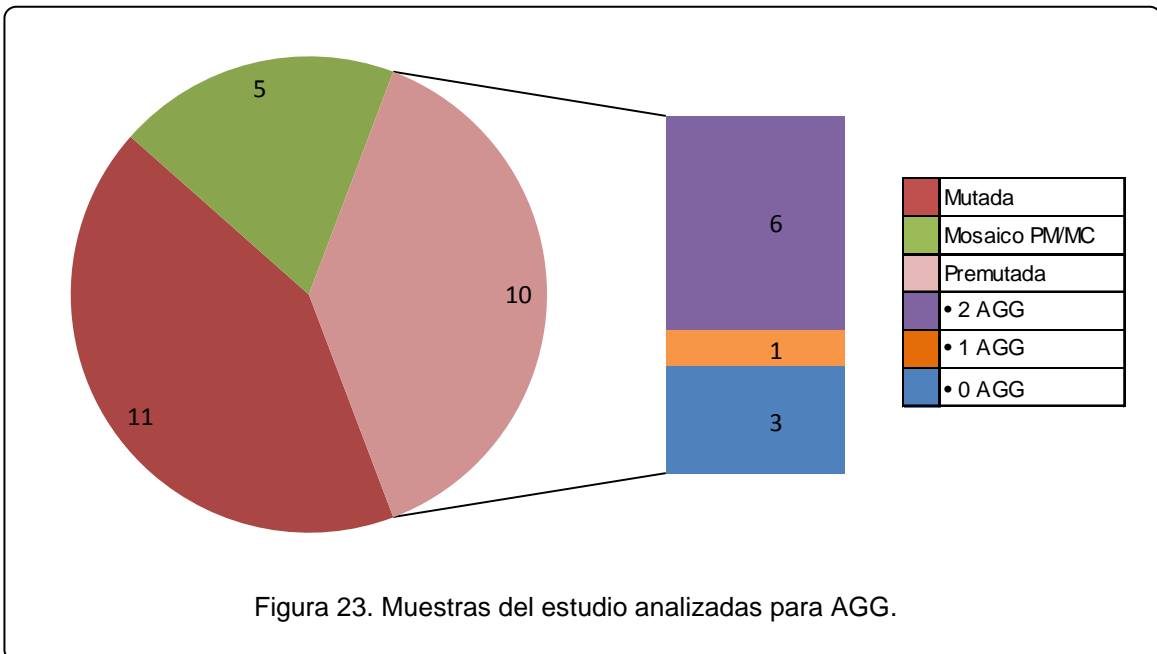
Interrupciones AGG

Se analizaron 10 muestras premutadas y 5 mosaicos premutación/mutación completa con la técnica TP-PCR, permitiendo así la determinación del número de interrupciones AGG a lo largo de los alelos CGG (Figura 23).

En las muestras premutadas un 54,55% (6) resultaron contener 2 interrupciones AGG. Frente al 9,09% (1) con una sola repetición, y el 27,27% (3) con ninguna interrupción (Figura 23).

En las muestras con mosaicismo premutación/mutación completa, observamos que un 40% (2) tienen 2 AGGs, un 20% (1) tiene un sola interrupción, y un 40% (2) presenta ausencia de AGGs (Figura 23).

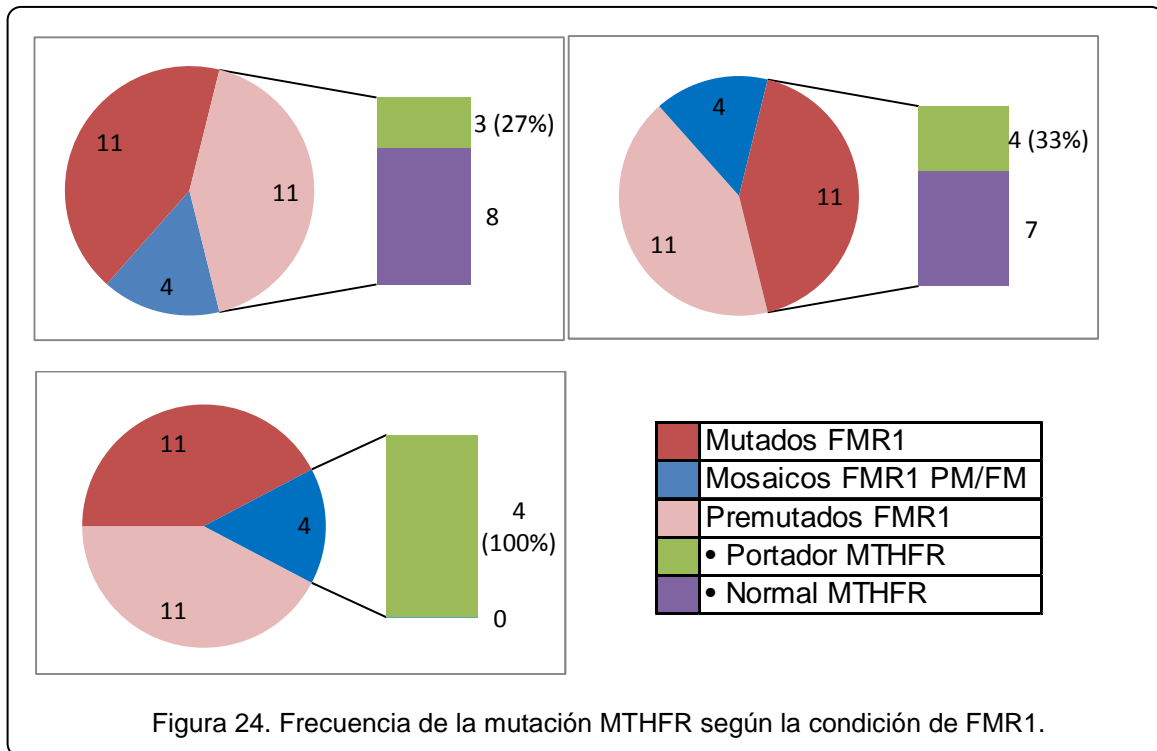
El análisis de las interrupciones AGG en ambos tipos de muestra es importante para determinar la posibilidad de expansión de los alelos premutados en la descendencia. A menor número de valles AGG, mayor es la probabilidad de expansión del alelo en la siguiente generación.



MTHFR y premutación en el gen FMR1

La condición de portador del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* que se indica en estos resultados significa tener una copia del alelo mutada (C677T) y otra normal, es decir, en heterocigosis.

En un total de 27 de las muestras del estudio pudo analizarse el genotipo MTHFR presente. Sólo una de ellas era un mosaico de premutación del gen FMR1, y su resultado fue de C677T. Las otras 26, se clasificaron según el estado de FMR1 y se analizó la condición de portador de C677T (Figura 24).



La homocisteína sólo fue estudiada en 4 de los casos. En 3 se observó dentro del rango normal, y en uno de los sujetos estaba baja.

No se encontró ninguna asociación significativa entre la presencia del polimorfismo C677T en el gen MTHFR y los individuos premutados para el gen FMR1 con trastornos del estado del ánimo y tendencia a la depresión. Si bien como dato curioso se observó que todos los mosaicismos a los que se analizó su condición de portadores del polimorfismo C677T eran portadores del mismo y todos ellos sí referían alteraciones del estado del ánimo y especialmente las mujeres tendencia a la depresión.

Análisis bioquímico. Perfil tiroideo

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la tiroxina (T4) pudo ser estudiada en 11 de los pacientes premutados. Sólo 2 de ellos mostraban hipotiroidismo, uno tenía normales la T4 y TSH pero su estudio de T3 mostró un nivel ligeramente elevado. En las otras 8 muestras no se encontraron anomalías en dichas hormonas. Recordar que por otro lado, uno de los pacientes adultos estudiados afecto de SXF resultó tener un hipotiroidismo congénito.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión

La indicación diagnóstica de los pacientes remitidos a la sección de Genética Clínica y Reproducción Asistida del H.U.M.S. para el estudio genético del SXF es variable. Esto provoca que sólo una pequeña parte de las muestras analizadas resulten premutadas (6,73%) o mutadas (4%) para el gen *FMR1*.

Es más común el análisis de muestras de niños (75,09%), ya que actualmente el consenso en pediatría y neuropsiquiatría es remitir a todos los niños con retraso en el desarrollo y/o psicomotor para el estudio genético [66]. Existe un protocolo actualmente para actuar de esta manera, mientras que hace años muchos de los niños con premutación pasaban desapercibidos por no conocer bien la clínica asociada a este trastorno genético.

También se reciben más casos de niños (61,50%) que de niñas, ya que la incidencia de cualquier manifestación clínica temprana asociada a la mutación o premutación es menor en niñas por poseer dos cromosomas X que pueden compensarse mutuamente. La proporción entre géneros cambia en la edad adulta, cuando hay un mayor número de mujeres remitidas (77,36%) debido principalmente a la incidencia de FXPOI.

Sólo el 15,38% de los diagnósticos de premutación se dan en niños (ambos géneros), aunque la mayor parte de casos índice son niños, y tras estudiar a su familia el descubrimiento de adultos premutados aumenta. El 69,70% de los adultos premutados son mujeres mostrando la variedad de motivos por el que las mujeres son remitidas al análisis genético, y que al tratarse de una alteración ligada al X las portadoras y transmisoras son más a menudo mujeres.

Los estudios recientes en las patologías asociadas a la alteración del gen *FMR1* han resultado en la descripción de un fenotipo emergente asociado a los portadores de la premutación. Además de FXPOI y FXTAS, una serie de nuevos trastornos han sido descritos en estos pacientes. Hay una fuerte evidencia que sugiere que las mujeres con premutación en *FMR1* pueden estar en un riesgo variable de sufrir diversas alteraciones médicas, reproductivas, cognitivas y psiquiátricas, como enfermedades de la tiroides, hipertensión, neuropatía periférica y fibromialgia.

Estos fenotipos se presentan en penetrancia variable y aunque todavía no esté ampliamente definida su asociación con la premutación de *FMR1*, estas manifestaciones clínicas deberían considerarse siempre que se estudie un paciente premutado. Publicaciones recientes describen la importancia y amplitud de esos trastornos relacionados con la premutación [11, 28].

Está bien documentado que entre el 12 y el 20% de las portadoras de premutación tienen FOP [13, 28]. A pesar del reducido tamaño de nuestra muestra, hemos detectado 3 mujeres con FOP antes de los 40 años de edad, entre un total de 16 (18,75%). Por otro lado, también acorde con lo que se describe en la literatura, hemos encontrado una asociación no lineal del FXPOI entre las premutadas. Los tres casos de fallo ovárico precoz los encontramos en mujeres en el rango intermedio de la premutación (80-100 repeticiones CGG), intervalo en el que se documenta en la bibliografía una mayor prevalencia de la enfermedad [1, 16]. Lo mismo ocurre con la edad de aparición, donde nuestros resultados coinciden con los de otros estudios [13].

Por otra parte, se ha estimado que el FXTAS afecta a un tercio de los hombres con premutación mayores de 50 años, y a un 16% de las mujeres, aunque la penetrancia aumenta con la edad, superando el 50% para hombres de 70 – 90 años [1]. A pesar de contar en nuestro estudio con 7 hombres y 8 mujeres mayores de 50 años, sólo un varón de 77 años tiene un diagnóstico de FXTAS. En algunas de las familias estudiadas sí se han detectado en

Estudio retrospectivo de la premutación en el gen FMR1 en población residente en Aragón. Posibilidades de repercusión en la clínica

la parte superior de sus árboles genealógicos ancianos con síntomas compatibles con FXTAS: un hombre que con 70 años presentaba una ligera ataxia y temblores no pudo ser estudiado por haber fallecido anteriormente; y otro varón que falleció a los 76 años presentaba ligeros temblores. Es importante notar que no en todas las familias ha podido hacerse un estudio completo de los miembros más mayores, y por tanto es normal que no hayamos encontrado más casos de FXTAS.

En estudios previos se han observado determinadas características psiquiátricas y de comportamiento en sujetos con la premutación, especialmente en mujeres. Coffey y col. [26] apuntaron que las mujeres portadoras de premutación tienen un riesgo incrementado de desarrollar este tipo de trastornos en comparación con individuos control. Como estos trastornos son difíciles de catalogar cuando la muestra es pequeña, como en nuestro caso, los valores de penetrancia son difíciles de establecer. Sí hemos observado al estudiar los árboles genealógicos de las familias, que varios pacientes portadores de la premutación presentaban depresión y/o cambios del estado del ánimo (4 casos). Dos pacientes presentaron TEA y otros dos déficit de atención. Además una mujer premutada había padecido crisis de epilepsia desde la infancia.

En cuanto a los dominios cognitivos, numerosos pacientes portadores de la premutación presentaban retraso psicomotor y/o del lenguaje (7 casos). Una mujer presentaba además dislexia. En muchos de los casos estas características fueron el motivo de remitir a los sujetos a la consulta (clínica detectada en la infancia).

Un fenotipo característico que se repite en todas las familias, tanto en sujetos portadores de la premutación en *FMR1* como los diagnosticados con la mutación completa, es el de orejas grandes y despegadas, a veces con las facies alargadas.

Otro desorden que se reitera en varias de las mujeres portadoras es la sucesión de abortos, lo que podría indicar la presencia de una gran expansión del triplete CGG en el gen *FMR1* impidiendo que el embarazo llegue a término.

Todas estas manifestaciones clínicas encajan con las descripciones hechas en la literatura sobre personas portadoras de la premutación en el gen *FMR1*, que van más allá del FOP y el FXTAS.

La observación del número y distribución de tripletes AGG interrumpiendo las secuencias de CGG permite predecir la probabilidad de expansión del alelo en la siguiente generación. En nuestro estudio, un 54,55% de las muestras premutadas contenían dos interrupciones AGG, el 9,09% mostraban una sola repetición, y el 27,27% no tenía ninguna interrupción.

En las muestras con mosaicismo PM/MC la frecuencia de una sola interrupción AGG sube hasta el 20%, y la ausencia de interrupciones representa el 40%. Aunque el análisis de los valles AGG pudo realizarse en muy pocas de las muestras, vemos que sí hay una correspondencia con la literatura previa en este aspecto [4, 5]. Estos autores demostraron que las secuencias AGG modulan fuertemente el riesgo de inestabilidad alélica: 100/103 alelos sin AGGs fueron inestables (aumentaron al menos en una repetición al pasar de generación), en comparación con los 31 inestables de 159 con 2 AGGs. Los alelos con 55-59 repeticiones CGG pero con 0 AGG se expandían con una probabilidad aumentada 19 veces respecto a aquellos con 2 AGG. Por este motivo, en el rango bajo de la premutación, para estimar el riesgo se tienen en cuenta la estructura AGG y la longitud de la secuencia CGG por el extremo 3' que no se encuentra interrumpida.

Aunque el significado de las interrupciones AGG permanece todavía en el nivel de la investigación, se espera que su determinación se vaya incorporando poco a poco a la práctica clínica y que permitan dar un riesgo cuantificable de transmitir la premutación a la

descendencia, gracias en parte a la estandarización de las técnicas de PCR que permiten su correcta delimitación.

El resultado más llamativo es el hallazgo de un paciente de 31 años en la familia C presentando un alelo en el rango de mutación completa y sin discapacidad intelectual. La explicación es que dicho alelo no estaba metilado con lo que se podría expresar el FMR1 y producir la FMRP que justifica el no presentar un cuadro clínico de retraso cognitivo [7].

El análisis del genotipo C677T en el gen *MTHFR* de las muestras de este estudio estuvo sujeto a la disponibilidad de muestra, habiendo sido realizado en sólo 27 de las muestras.

No encontramos ninguna asociación significativa entre un determinado polimorfismo C677T y trastornos del estado del ánimo/depresión en los individuos premutados para el gen *FMR1*. No obstante se observó que todos los mosaicismos estudiados resultaron portadores de la variante C677T en heterocigosis y todos ellos referían alteraciones del estado del ánimo, y especialmente las mujeres tendencia a la depresión.

De cualquier forma el tamaño muestral no es representativo y no permite sacar conclusiones sólidas. La literatura presenta resultados contradictorios en el estudio de C677T y dichas manifestaciones clínicas [57, 60-63].

Sólo hemos encontrado dos estudios que se centren en muestras con premutación o mutación completa [65 y 64 respectivamente] siendo los resultados no concluyentes por tener un tamaño muestral pequeño o por no haber obtenido resultados con significancia estadística.

El perfil tiroideo en los casos de premutación en que pudo ser realizado presentaba algunas anomalías: 2 casos de hipotiroidismo (con TSH y T4 bajas) y uno de hipertiroidismo por T3 elevada. Estos resultados están en la línea de los obtenidos en investigaciones previas, en los que las mujeres adultas portadoras de la premutación sufren algún trastorno de este tipo en comparación con los controles [26 – 28].

En los casos de niños con hipotiroidismo congénito junto a macroorquidismo y cierto retraso psicomotor hay que sospechar de SXF, y realizar el estudio genético.

La función tiroidea debería analizarse de forma rutinaria en mujeres portadoras, así como sus posibles síntomas neurológicos y emocionales. Un hipotiroidismo no diagnosticado en portadoras puede agravar los problemas emocionales, especialmente ansiedad y depresión, que son comunes en estas mujeres.

Conclusiones

1. La frecuencia de premutación entre todas las muestras analizadas en el periodo de 2011 a 2015 es el 6,73% (n= 37), la frecuencia de mutación es el 4% (n= 22). La frecuencia de muestras en el intervalo de la zona gris es el 2,00% (n= 11).
2. El número total de premutaciones en las muestras fue de 39 de ellas un 15,38% (n=6) pertenecen a niños y el resto a adultos. De las premutaciones pertenecientes a niños, son la mitad de cada sexo. En el caso de los adultos, un 69,70% (n= 23) de las muestras con premutaciones pertenecen a mujeres, y un 30,30% (10) pertenecen a varones.
3. La proporción de la premutación de las muestras femeninas del gen *FMR1* es del 66,67% (n= 26). Dentro de ese grupo el 88,46% son de mujeres adultas y tan sólo el 11,54% (n= 3) son de niñas. La proporción de premutación en el grupo de varones, es el 33,33% (n= 13) de ellas el 76,92% (n= 10) pertenecen a adultos y el 23,08% (n= 3) a niños.
4. La prevalencia de las mujeres premutadas con fallo ovárico prematuro (FOP) en el periodo de 2011 a 2015 fue el 18,75% (n= 3). Todas ellas presentan tamaños de alelos en la parte intermedia de la PM (de 80 a 100 repeticiones CGG). El resto de mujeres premutadas para el gen *FMR1* mayores de 35 años 81,25% (n= 13), no fueron diagnosticadas de FXPOI.
5. Solo un paciente fue diagnosticado de FXTAS en el total de pacientes estudiados en el periodo de 2011 a 2015. La prevalencia sería del 2,56%.
6. Entre las manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de la premutación en el gen *FMR1* las más frecuentes en los niños son el retraso del lenguaje y el retraso psicomotor. En los adultos la tendencia a la depresión y los cambios en el estado de ánimo.
7. El número de interrupciones AGG más común en nuestra muestra poblacional de Aragón es de dos en el 54,55% de los casos (n= 6), una interrupción de observa en el 9,09% de los casos (n= 1) y el 27,27% de los casos no presenta ninguna interrupción (n= 3).
8. De las 11 muestras premutadas en las que se estudió el gen *MTHFR*, en 3 se encontró la mutación C677T, lo que supone un 27%. Se observó que todas las muestras mosaicos para *FMR1* con PM/MC resultaron heterocigotas para C677T
9. Se encontró una alta incidencia de alteraciones en las hormonas tiroideas, 27,27% aunque el número de muestras que pudo estudiarse (n= 11) no es representativo y no pueden obtenerse conclusiones fiables.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wheeler AC, Bailey-Jr DB, Berry-Kravis E, Greenberg J, Losh M, Mailick M, et al. Associated features in females with an FMR1 premutation. *J Neurodev Disord.* 2014;6:30.
2. Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet.* 1969; 21(3):231-244.
3. Chelly J, Mandel JL. Monogenic causes of x-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2001;2: 669-80.
4. Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *J Neurodev Disord.* 2014;6(1):24.
5. Volle CB, Delaney S. AGG/CCT interruptions affect nucleosome formation and positioning of healthy-length CGG/CCG triplet repeats. *BMC Biochem.* 2013;14:33.
6. Spector EB. Fragile X - A Family of Disorders: Changing Phenotype and Molecular Genetics. *The Principles of Clinical Cytogenetics.* New York:Springer;2013:453-71.
7. Mandel JL, Biancalana V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. *Growth Hormone & IGF Research* 2004;14: S158-S165.
8. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:417-25.
9. Fernandez-Carvajal I, Lopez-Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ, Tassone F. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn.* 2009;11: 306-10.
10. Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, et al. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet.* 1996;33:1022-6.
11. Hagerman RJ, Hagerman PJ. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol.* 2013;12:786-98.
12. Uzielli ML, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G, et al. Premature ovarian failure (POF) and fragile X premutation females: from POF to fragile X carrier identification, from fragile X carrier diagnosis to POF association data. *Am J Med Genet.* 1999;84(3):300-3.
13. Allen EG, Grus WE, Narayan S, Espinel W, Sherman SL. Approaches to identify genetic variants that influence the risk for onset of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI): a preliminary study. *Front Genet.* 2014;5:260.
14. Seltzer MM, Baker MW, Hong J, Maenner M, Greenberg J, Mandel D. Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2012;159B:589-97.
15. Tassone F, Long K, Tong T, Lo J, Gane LW, Berry-Kravis E, et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Med.* 2012;4:100.
16. Spath MA, Feuth TB, Smits AP, Yntema HG, Braat DD, Thomas CM, et al. Predictors and risk model development for menopausal age in fragile X permutation carriers. *Genet Med.* 2011;13:643-50.
17. Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Badenas C, Xuncla M, Jimenez L, Mila M. Premature ovarian failure and fragile X female premutation carriers: no evidence for askewed X-chromosome inactivation pattern. *Menopause.* 2009;16:944-9.

18. Hunter JE, Epstein MP, Tinker SW, Charen KH, Sherman SL. Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity. *Genet Epidemiol.* 2008;32:553-9.
19. Stolk L, Perry JR, Chasman DI, He C, Mangino M, Sullem P, et al. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nat Genet.* 2012;44:260-8.
20. Stolk L, Zhai G, Van-Meurs JB, Verbiest MM, Visser JA, Estrada K, et al. Loci at chromosomes 13, 19 and 20 influence age at natural menopause. *Nat Genet.* 2009;41:645-7.
21. Perry JR, Corre T, Esko T, Chasman DI, Fischer K, Franceschini N, et al. A genome-wide association study of early menopause and the combined impact of identified variants. *Hum Mol Genet.* 2013; 22:1465-72.
22. Hall DA, Birch RC, Anheim M, Jønch AE, Pintado E, O'Keefe J, et al. Emerging topics in FXTAS. *J Neurodev Disord.* 2014;6(1):31.
23. Milá M, Madrigal I, Kulisevsky J, Pagonabarraga J, Gómez B, Sánchez A, et al. [Fragile X tremor ataxia syndrome (FXTAS): a new kind of spinocerebellar ataxia associated to fragile X syndrome premutation carriers]. *Med Clin (Barc).* 2009;133:252-4.
24. Gallarher A, Hallahan B. Fragile X-associated disorders: a clinical overview. *J Neurol* 2012;259:401-13.96. Tassone F, Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X premutation. *J Neurodev Disord.* 2014;6:22.
25. Tassone F, Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X premutation. *J Neurodev Disord* 2014;6:22.
26. Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet Part A.* 2008;146A:1009-16.
27. Winarni TI, Chonchaiya W, Sumekar TA, Ashwood P, Morales GM, Tassone F, et al. Immune-mediated disorders among women carriers of fragile X premutation alleles. *Am J Med Genet.* 2012;158A:2473-81.
28. Rodríguez-Revenga L, Madrigal I, Pagonabarraga J, Xuncla M, Badenas C, Kulisevsky J et al. Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1359-62.
29. Martorell L, Tondo M, Garcia-Fructuoso F, Naudo M, Alegre C, Gamez J, et al. Screening for the presence of FMR1 premutation alleles in a Spanish population with fibromyalgia. *Clin Rheumatol.* 2012;31:1611-5.
30. Rodríguez-Revenga L, Madrigal I, Blanch-Rubio J, Elurbe DM, Doscampo E, Collado A, et al. Screening for the presence of FMR1 premutation alleles in women with fibromyalgia. *Gene.* 2013;512:305-8.
31. Au J, Akins RS, Berkowitz-Sutherland L, Tang HT, Chen Y, Boyd A, et al. Prevalence and risk of migraine headaches in adult fragile X permutation carriers. *Clin Genet.* 2013;84:546-51.
32. Smith LE, Barker ET, Seltzer MM, Abbeduto L, Greenberg JS. Behavioral phenotype of fragile X syndrome in adolescence and adulthood. *Am J Intellect Dev Disabil.* 2013;117:1-17.
33. Ross-Inta C, Omanska-Klusek A, Wong S, Barrow C, Garcia-Arocena D, Iwahashi C, et al. Evidence of mitochondrial dysfunction in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Biochem J.* 2010;429:545-52.
34. Napoli E, Ross-Inta C, Wong S, Hung C, Fujisawa Y, Sakaguchi D, et al. Mitochondrial dysfunction in Pten haplo-insufficient mice with social deficits and repetitive behavior: interplay between Pten and p53. *PLoS One.* 2012;7(8):e42504.
35. Kallinen J, Korhonen K, Kortelainen S, Heinonen S, Ryyänen M. Pregnancy outcome in carriers of fragile X. *BJOG.* 2000;107:969-72.
36. Walker SE. Estrogen and autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;40:60-5.

37. Yang JC, Simon C, Niu YQ, Bogost M, Schneider A, Tassone F, et al. Phenotypes of hypofrontality in older female fragile x premutation carriers. *Ann Neurol.* 2013;74(2):275-83.
38. Wirojanan J, Angkustsiri K, Tassone F, Gane LW, Hagerman RJ. A girl with fragile X premutation from sperm donation. *Am J Med Genet A.* 2008;146:888-92.
39. Basuta K, Narcisa V, Chavez A, Kumar M, Gane L, Hagerman R, et al. Clinical phenotypes of a juvenile sibling pair carrying the fragile X premutation. *Am J Med Genet A.* 2011;155A:519-25.
40. Myers GF, Mazzocco MM, Maddalena A, Reiss AL. No widespread psychological effect of the fragile X premutation in childhood: evidence from a preliminary controlled study. *J Dev Behav Pediatr.* 2001;22:353-9.
41. Gilbert SJ, Burgess PW. Executive function. *Curr Biol.* 2008;18:110-4.
42. Hunter JE, Allen EG, Abramowitz A, Rusin M, Leslie M, Novak G, et al. No evidence for a difference in neuropsychological profile among carriers and noncarriers of the FMR1 premutation in adults under the age of 50. *Am J Hum Genet.* 2008;83:692-702.
43. Sterling AM, Mailick M, Greenberg J, Warren SF, Brady N. Language dysfluencies in females with the FMR1 premutation. *Brain Cogn.* 2013;82:84-9.
44. Roberts JE, Tonnsen BL, McCary LM, Ford AL, Golden RN, Bailey DB Jr. Trajectory and Predictors of Depression and Anxiety Disorders in Mothers With the FMR1 Premutation. *Biol Psychiatry.* 2016;79(10):850-7.
45. Hunter JE, Allen EG, Abramowitz A, Rusin M, Leslie M, Novak G, et al. Investigation of phenotypes associated with mood and anxiety among male and female fragile X premutation carriers. *Behav Genet.* 2008; 38:493-502.
46. Grigsby J, Cornish K, Hocking D, Kraan C, Olichney JM, Rivera SM, et al. The cognitive neuropsychological phenotype of carriers of the FMR1 premutation. *J Neurodev Disord.* 2014;6(1):28.
47. Seltzer MM, Barker ET, Greenberg JS, Hong J, Coe C, Almeida D. Differential sensitivity to life stress in FMR1 premutation carrier mothers of children with fragile X syndrome. *Health Psychol.* 2012;31:612-22.
48. Losh M, Martin GE, Klusek J, Hogan-Brown AL, Sideris J. Social communication and theory of mind in boys with autism and fragile x syndrome. *Front Psychol.* 2012;3:266.
49. López-Mourelo O, Mur E, Madrigal I, Alvarez-Mora MI, Gómez-Ansón B, Pagonabarraga J et al. Social anxiety and autism spectrum traits among adult FMR1 premutation carriers. *Clin Genet.* 2016 Apr 22. doi: 10.1111/cge.12791 [Epub ahead of print].
50. Kenna HA, Tartter M, Hall SS, Lightbody AA, Nguyen Q, de los Angeles CP et al. High rates of comorbid depressive and anxiety disorders among women with premutation of the FMR1 gene. *Am J Med Genet B. Neuropsychiatr Genet* 2013; 162B: 872-78.
51. Bailey DB Jr, Raspa M, Olmsted M, Holiday DB. Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: Findings from a national parent survey. *Am J Med Genet.* 2008;146a:2060-9.
52. Hunter JE, Epstein MP, Tinker SW, Abramowitz A, Sherman SL. The FMR1 premutation and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence for a complex inheritance. *Behav Genet.* 2012;42:415-22.
53. Hamlin A, Liu Y, Nguyen DV, Tassone F, Zhang L, Hagerman RJ. Sleep apnea in fragile X premutation carriers with and without FXTAS. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156b:923-8.
54. Summers SM, Cogswell J, Goodrich JE, Mu Y, Nguyen DV, Brass SD, et al. Prevalence of restless legs syndrome and sleep quality in carriers of the fragile x premutation. *Clin Genet.* 2014;86(2):181-4.

55. Summers SM, Cogswell J, Goodrich JE, Mu Y, Nguyen DV, Brass SD, et al. Fatigue and Body Mass Index in the Fragile X Premutation Carrier. *Fatigue: Biomedicine, Health & Behavior*. 2014; 2(2):64-72.
56. Bailey DB, Sideris J, Roberts J, Hatton D. Child and genetic variables associated with maternal adaptation to fragile X syndrome: A multidimensional analysis. *Am J Med Genet A*. 2008;146:720-9.
57. Bousman CA, Potiriadis M, Everall IP, Gunn JM. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Genetic Variation and Major Depressive Disorder Prognosis: A Five-Year Prospective Cohort Study of Primary Care Attendees. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2014;165B(1):68-76.
58. Salih MA, Murshid WR, Seidahmed MZ. Classification, clinical features, and genetics of neural tube defects. *Saudi Med J*. 2014;35 Suppl 1:S5-S14.
59. Hanks J, Ayed I, Kukreja N, Rogers C, Harris J, Gheorghiu A et al. The association between MTHFR 677C>T genotype and folate status and genomic and gene-specific DNA methylation in the colon of individuals without colorectal neoplasia. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(6):1564-74.
60. Velichko VL, Kudlach OI, Shelepina OA. A study of occurrence frequency of C677T polymorphism of the gene MTHFR and plasma folate levels in patients with unipolar depression. *Lik Sprava*. 2015;(1-2):156-7.
61. Peerbooms OL, van Os J, Drukker M, Kenis G, Hoogveld L, MTHFR in Psychiatry Group et al. Meta-analysis of MTHFR gene variants in schizophrenia, bipolar disorder and unipolar depressive disorder: evidence for a common genetic vulnerability? *Brain Behav Immun*. 2011;25(8):1530-43.
62. Gabriela-Nielsen M, Congiu C, Bortolomasi M, Bonvicini C, Bignotti S, Abate M et al. MTHFR: Genetic variants, expression analysis and COMT interaction in major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2015;183:179-86.
63. Permoda-Osip A, Dmitrzak-Weglarz M, Hauser J, Rybakowski JK. Are genes connected with homocysteine metabolism associated with bipolar disorder?. *Neuropsychobiology*. 2014;69(2):107-11.
64. Aleyasin A, Mirakhorli M. Association of the MTHFR C677T polymorphism and fragile X syndrome in an Iranian population. *Neurol Asia*. 2012;17(4):347-52.
65. Santa-María L, Rojas S, Morales P, Curotto B, Faundes V, Correa Rodrigo, et al. C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR study in female premutation (PM) carriers of FMR1 gene. 2nd International Conference on FMR1 Premutation: Basic Mechanisms and Clinical Involvement. 30 septiembre – 2 octubre 2015, Sitges-Barcelona, España.
66. López-Pisón J, Monge-Galindo L. Evaluación y manejo del niño con retraso psicomotor: Trastornos generalizados del desarrollo. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2011;13 (Suppl 20):131-144.