

# Distribución de los alelos normales, intermedios y premutados del gen FMR1 en una población normal del departamento de Risaralda.

\*LUCERO RENGIFO R.

Bióloga Genetista. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

\*ALVARO H. ALEGRÍA S.

Médico. PhD Biología Molecular. Director del Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

\*JORGE RODRIGUEZ RUEDA.

Magister en Bioquímica. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

\*DUVERNEY GAVIRIA.

Biólogo. Asistente de Investigación, Laboratorio Cenbiotep.

\*ENRIQUE AGUILAR F.

Biólogo. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

\* Miembro del grupo de Investigación del Centro de Biología Molecular y Biotecnología (Cenbiotep), Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

## Resumen

*El síndrome frágil XA (FRAXA) constituye una de las entidades hereditarias más prevalentes como causa de retardo mental y otras alteraciones de la conducta. Se caracteriza a nivel molecular por la expansión de la repetición 5'-(CGG)<sub>n</sub>-3' en el promotor y en la región 5' no traducida del gen FMR1 (Frágil Mental Retardation-1) mapeado en la región Xq27.3 sitio folato sensitivo. Los individuos afectados presentan un fenotipo característico y alteraciones cognitivas. Con el objeto de encontrar la distribución de los alelos normales, intermedios, y premutados del gen FMR1 se realizó una caracterización molecular del sitio FRAXA en 1171 alelos correspondientes a 728 cromosomas X de 364 muje-*

*res y a 443 cromosomas X de varones, todos normales de 11 municipios del Departamento de Risaralda. El tamaño del alelo normal más frecuente fué de 30 repeticiones de la triplete CGG, el cual se presentó en 1 932 alelos (79.6%) seguido de los alelos con 20 repeticiones en 60 casos (5.12%) y con 28 repeticiones en 39 casos (3.33%). La frecuencia de los individuos con el alelo normal, el cual se presentó en un rango entre 10 y 39 repeticiones CGG fue del 98% de los individuos de esta población (98.2% de los hombres y 97.7% de las mujeres). El alelo intermedio fue identificado en el 1.87% de la población (1.8% de los hombres y 1.92% de las mujeres). El estado de premutación apareció en 3 individuos de la población general (3 mujeres) correspondiente a 0.37%. Se observó una prevalencia de 1/270 para la población del Departamento de Risaralda. Teniendo en cuenta que la composición racial y étnica de este Departamento es semejante al resto del país estos resultados podrían ser extensivos para toda Colombia.*

**PALABRAS CLAVES:** Síndrome frágil X; gen FMR1; alelos normales, intermedios y premutados; distribución alélica; población normal.

**Recibido para publicación: 05-04-2002**

**Aceptado para publicación: 10-05-2002**

## Introducción

**E**l síndrome frágil XA (FRAXA) constituye una de las entidades hereditarias más prevalentes que ocasiona retardo mental y otras alteraciones de la conducta<sup>(1)</sup>. El síndrome FRAXA, considerado como la causa más común de retardo mental hereditario, se caracteriza por alteraciones físicas y del comportamiento con una prevalencia de 1/3460 para la población masculina de raza blanca y de 1/4048 para la población masculina afroamericana<sup>(2)</sup>. Está asociado con la presencia de un si-

tio frágil folato-sensitivo en el cromosoma X en la región Xq27.3 llamado FRAXA<sup>(3)</sup>. El gen FMR1 tiene 38 kilobases (kb) y consta de 17 exones. En la región 5' no traducida (5'-UTR) del transcrito de FMR1 existe una región de 4.4 kb con repeticiones de la tripleta CGG<sup>(4)</sup>. Esta región es muy polimórfica en longitud y contenido y se encuentra interrumpida por la tripleta AGG<sup>(5)</sup>. Los individuos afectados tienen una expansión de la tripleta CGG entre 200 y 2000 repeticiones CGG la cual se acompaña de una metilación anormal en la isla CpG situada en una región proximal del gen, que ocasiona un silencio transcripcional de la proteína FMRP. La ausencia de esta proteína es la causa del síndrome FRAXA<sup>(6)</sup>. El gen FMR1 se expresa en tejidos humanos y murinos<sup>(7)</sup>. Isoformas múltiples de FMRP se originan por corte y empalme alternativo en el extremo 3' y aparecen en una variedad de tejidos, algunas de ellas están presentes en concentraciones diferentes<sup>(4, 8)</sup>.

El alelo normal es muy variable, tiene entre 6 y 40 repeticiones CGG y es heredado de una manera estable. Esta expansión se encuentra interrumpida cada 9 a 10 repeticiones CGG por una tripleta AGG<sup>(9)</sup>. El estado de premutación presenta entre 61 y 199 repeticiones CGG y no está asociado con metilación anormal en la isla CpG<sup>(10)</sup>. El estado intermedio o zona gris se ha definido entre 41 y 60 repeticiones CGG para los grupos poblaciones de origen caucásico; sin embargo en la población afroamericana el alelo intermedio se encuentra entre 35 y 60 repeticiones<sup>(11)</sup>.

La expresión fenotípica de los afectados es variable. Depende del número de repeticiones de la tripleta CGG y del grado de metilación<sup>(12)</sup>. En varones se presenta talla baja, anomalías craneofaciales, macrocrania, retardo mental moderado a severo y otras alteraciones de la conducta como hiperactividad, conductas autistas, ansiedad y timidez, las cuales son frecuentes<sup>(13)</sup>. Las mujeres con mutación completa pueden manifestar en grado menor algunos de los rasgos fenotípicos masculinos como la talla baja y algunas alteraciones craneofaciales. Los desórdenes cognoscitivos son también menores<sup>(13, 14)</sup>.

Los individuos con la premutación son considerados portadores y pueden ser de ambos sexos. Los varones con la premutación poseen inteligencia normal pero manifiestan algunos rasgos menores descritos en el síndrome X-frágil como orejas prominentes, alteracio-

nes de la conducta como ansiedad, desorden afectivo y comportamiento obsesivo compulsivo<sup>(15)</sup>. Son denominados varones transmisores porque transmiten la premutación a sus hijas. Estas pueden ser en un 50% normales y en un 50% tener retardo mental leve o disfunciones cognoscitivas como dificultad en el aprendizaje, desórdenes psiquiátricos y disfunción ovárica como menopausia precoz<sup>(16,17)</sup>. Son denominadas mujeres portadoras<sup>(10,18)</sup>. Los hijos de estas portadoras pueden adquirir la mutación completa con una probabilidad de 80%<sup>(10)</sup>.

Los individuos que portan los alelos intermedios, presentan dificultades en el aprendizaje y alteraciones del comportamiento semejantes a las manifestadas por los portadores<sup>(17,19)</sup>.

El cambio del alelo normal a premutado y a mutación completa no es sencillo. Se presenta en un proceso de múltiples pasos de transición de premutaciones pequeñas de más de 54-60 repeticiones de la tripleta CGG a mutación completa<sup>(20)</sup>. No se han observado nuevas mutaciones a través de individuos afectados porque ellas son raras y porque no ha sido posible estudiar más de 3 o 4 generaciones. Puesto que los varones y mujeres afectadas tienen una reproducción reducida, incidencias similares de la enfermedad en varios países combinadas con la evidencia de un número limitado de mutaciones iniciales, sugieren que la tasa de mutación de alelos normales a alelos premutados es muy baja y es seguida por una tasa mutacional que se incrementa con el tamaño de la expansión, pero es suficientemente pequeña para no generar un grupo grande de premutaciones<sup>(21)</sup>.

En una muestra de 3.415 parejas madre-niño(a) de la población en general y una muestra control de 138 recién nacidos varones y sus madres se hizo un estudio para observar la transmisión de los alelos normales, los alelos en la zona gris y los alelos premutados del gen FMR1, con relación a los efectos del tamaño, estructura y sexo de la descendencia<sup>(21)</sup>. Se encontraron pequeños cambios en la longitud de los alelos menores de 40 repeticiones, siendo el más grande 10 tripletas y el más pequeño de 1 tripleta. No se observó ninguna expansión a mutación completa. La gran mayoría de los eventos de inestabilidad correspondieron a cambios de menos de 3 tripletas (micro-inestabilidad). Se observaron muchas deleciones e inserciones<sup>(22)</sup>.

En un estudio anterior donde se realizó el análisis de las mutaciones FRAXA por métodos citogenéticos y moleculares en 204 pacientes con alteraciones cognitivas y otras alteraciones de la conducta, 124 (60.8%) hombres y 80 (39.2%) mujeres con edades comprendidas entre los 5 y 32 años, institucionalizados en 3 centros de Educación Especial de las ciudades colombianas de Pereira y Armenia, se encontraron 4 individuos con la mutación completa FRAXA, 2 hombres y 2 mujeres, que corresponde al 1.96% de la población estudiada<sup>(23)</sup>. Estas estadísticas son comparables a las de otras poblaciones<sup>(24-28)</sup>. Debido a la frecuencia relativamente baja encontrada de individuos con la mutación FRAXA y a que en Colombia no se han hecho estudios de la distribución de los alelos normales, intermedios y en el rango de la premutación del gen FRAXA en la población fenotípicamente normal, quisimos averiguar la frecuencia de estos alelos en una población de adultos normales de ambos sexos del Departamento de Risaralda, aprovechando el banco de ADN del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira.

### *Materiales y métodos*

Se realizó el análisis molecular del sitio FRAXA en 807 individuos, 443 hombres (54.89%) y 364 mujeres (45.11%) en edades comprendidas entre 15 y 68 años; procedentes de 11 municipios del departamento de Risaralda: Pereira, Dosquebradas, La Virginia, Santa Rosa, Apía, Pueblo Rico, Santuario, Quinchía, Guática, Balboa y Belén de Umbría; quienes participaron voluntariamente en el estudio previo consentimiento informado.

Para el análisis molecular se aisló el DNA de 5ml de sangre recolectada en tubos con EDTA, utilizando el PUREGENE DNA Isolation Kit de Gentra Systems (Minneapolis, USA). Se realizó la detección del sitio FRAXA por el método de amplificación por PCR con los iniciadores FMR392 y FMR503 de acuerdo con los métodos de Rengifo et al<sup>(23)</sup> y Brown et al<sup>(24)</sup>. Se determinó la presencia de esta amplificación y el nivel de metilación del mismo sitio por Southern blot, realizando digestión genómica con las enzimas sensibles a la metilación EcoR1 y Eag1 e hibridización con la sonda StB12.3 de acuerdo con las técnicas descritas por Rousseau y cols<sup>(25)</sup>.

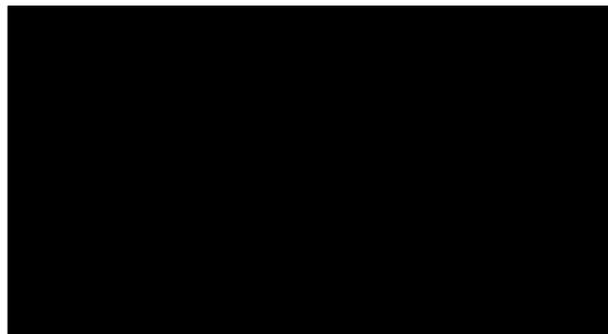
El análisis estadístico se realizó considerando cuatro poblaciones. Primero se dividieron los estados hete-

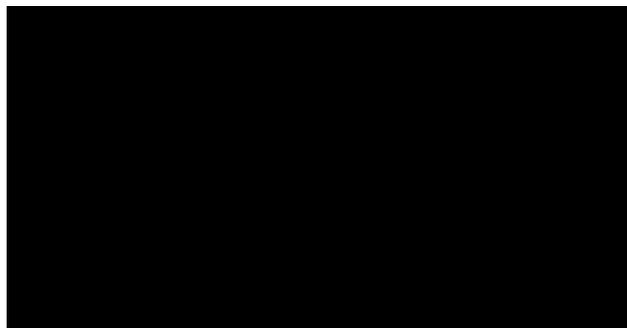
rozigóticos de las 364 mujeres para consolidar una población de 728 cromosomas X a los que se añadieron los cromosomas X de los 443 hombres. Para cada uno de estos 1171 alelos se encontró el número de repeticiones de la tripleta CGG y estos fueron los datos analizados. La segunda población estudiada fue la de los alelos correspondientes a los cromosomas X de los 443 hombres. La tercera y cuarta corresponden a los alelos de los cromosomas X de las 364 mujeres consideradas de dos maneras: 364 parejas de alelos y 728 alelos separados.

### *Resultados*

El análisis de la mutación FRAXA por la técnica de amplificación por PCR se realizó en 1171 alelos correspondientes a 728 cromosomas X de las 364 mujeres y a 443 cromosomas X de los varones, todos adultos y normales, de 11 municipios del Departamento de Risaralda, con el fin de encontrar la frecuencia de los alelos normales, intermedios y premutados del gen FMR1. Los iniciadores FMR392 y FMR503 amplifican un segmento de 152 pares de bases para un alelo normal de 30 repeticiones. El tamaño del alelo normal más frecuente fué de 30 repeticiones de la tripleta CGG, el cual se presentó en 932 alelos (79.6%) seguido del alelo con 20 repeticiones que apareció en 60 cromosomas (5.12%) y con 28 repeticiones que se encontró en 39 alelos (3.33%). El rango de variación en el número de tripletas CGG fue entre 10 y 155 repeticiones en los 1171 cromosomas X amplificados (figuras 1 y 2). Algunas de estas amplificaciones se muestran en la figura 3.

Para determinar el estado homocigótico o heterocigótico de los alelos se analizaron 728 cromosomas X correspondientes a 364 mujeres. El estado homocigótico más frecuente fué 30-30 en 239 mujeres (65.6%) y el





heterocigótico más frecuente fue de 20-30 en 36 mujeres (0.099%) (figuras 4 y 5). El número de alelos normales, intermedios y premutados aparecen en la tabla 1. El análisis por Southern blot se realizó en los individuos con alelos intermedios y premutados. Algunos de estos resultados se muestran en la figura 6. El patrón de metilación fue normal para los individuos con alelos intermedios (fragmentos de 2.8kb en los varones y fragmentos de 2.8kb y 5.2kb en las mujeres). Las mujeres con alelos premutados (72 y 82 repeticiones CGG por PCR), mostraron un fragmento adicional de 3.0 y 3.2 respectivamente. La mujer con el alelo de 155 repeticiones CGG por PCR mostró un fragmento adicional de 3.4kb.

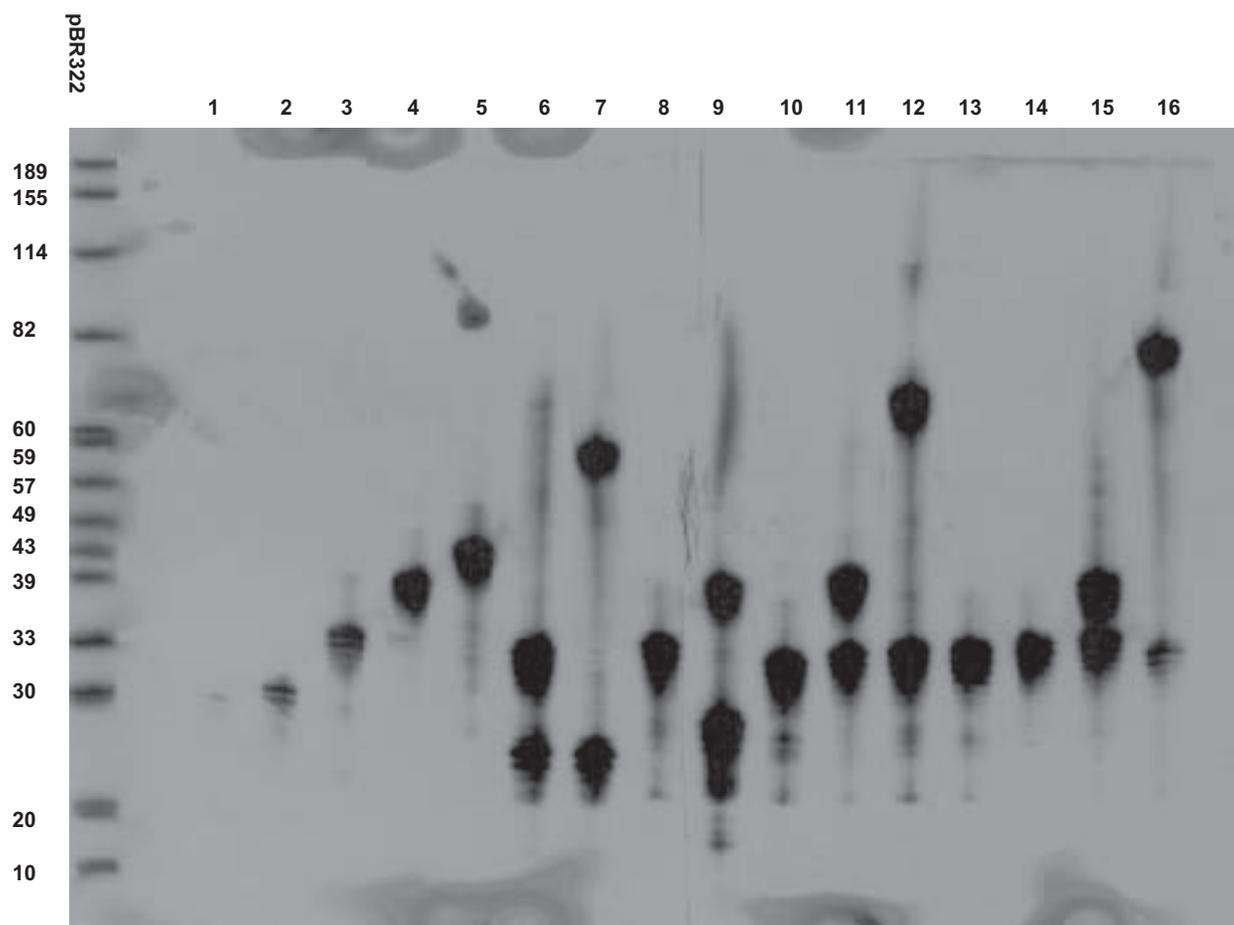
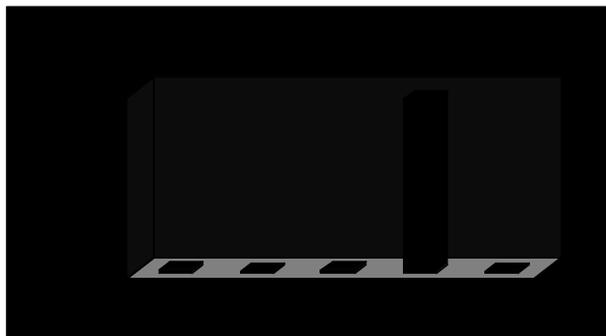
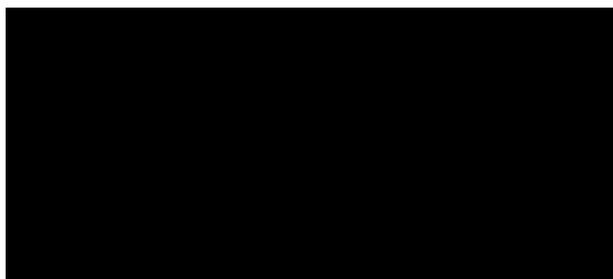


Figura 3. Diferentes alelos del gen FMR 1 en una población normal del departamento de Risaralda. Las pistas 12 y 16 muestran mujeres con uno de sus alelos en el rango de premutación (72 y 82 repeticiones CGG respectivamente). Las pistas 5 y 7 muestran individuos con alelos intermedios. En el resto de las pistas se muestran individuos con el alelo normal en el rango normal entre 20 y 39 repeticiones CGG. Se usó como marcador de peso molecular pBR322 digerido con MspI.



### Discusión

La población estudiada se puede considerar triétnica. El alelo más frecuente fue de 30 repeticiones en toda la población analizada.

Encontramos 22 alelos intermedios en un rango entre 43 y 60 si se consideran los resultados obtenidos para la población caucásica. Si aceptamos el rango de 35-60 propuesto como rango para los alelos intermedios para la población afroamericana<sup>(11)</sup>, los alelos intermedios fueron 49 en un rango de 37 a 60, 2 alelos entre 50 y 60 repeticiones CGG en 2 mujeres, y 4 alelos entre 40 y 49 en 4 mujeres. Todas ellas eran adultas, normales y no emparentadas.

En familias en las cuales el estado del gen FMR1 no ha sido identificado, la estabilidad de los alelos de la zona

gris es incierta. Estudiando familias con alelos en la zona gris, sin previa historia de variación en la estabilidad del alelo FRAXA, no se encontró en ninguna de ellas expansión a mutación completa en una generación. La inestabilidad de la transmisión de los alelos en la zona gris fue observada en el 25% de los alelos con 50-60 CGGs, pero menor a 8% de aquellos con 40-49 CGG. El examen de la organización de los alelos en la zona gris reveló que largos tramos de repeticiones CGGs (mayores a 34) no son siempre transmitidas inestablemente. Estos resultados crean nuevas preguntas relacionadas con los factores familiares que pueden determinar la transmisión de la expansión<sup>(26)</sup>.

Se encontraron 3 alelos premutados con 72, 82 y 155 repeticiones CGG en 3 mujeres no emparentadas con edades de 55, 20 y 64 años respectivamente en las cuales no se identificó un fenotipo característico, disfunción ovárica, dificultad en el aprendizaje o alteracio-

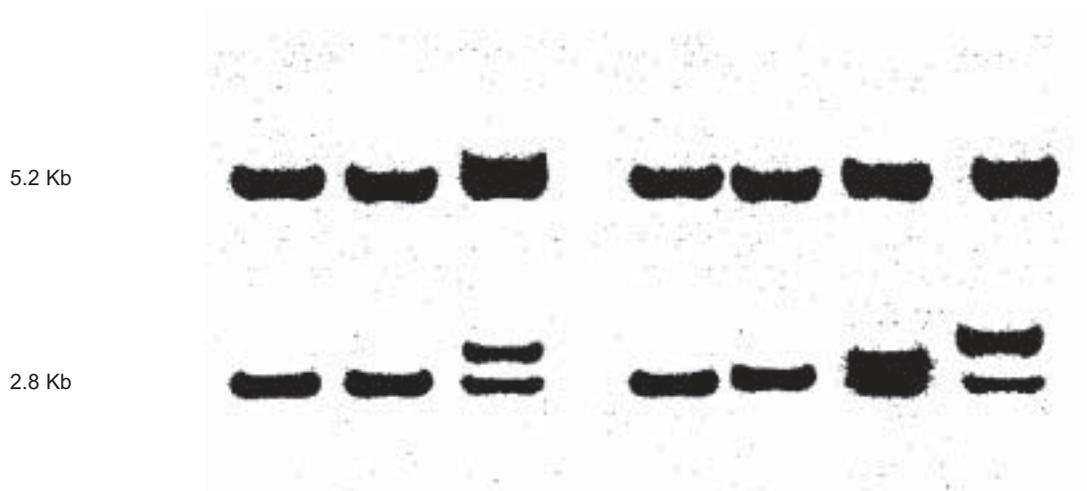


Figura 6. Analisis por Southern blot con la sonda StB 12.3 de 8 pacientes de la población normal: Las pistas 3,7,8 muestran un fragmento adicional de 3.2 Kb, 3.0Kb y 3.4Kb respectivamente que corresponde a mujeres con un alelo premutado. Tiempo de exposición de la película: 3 días a -80°C.

Tabla 1. Distribución de los alelos normales, intermedios y premutados en 807 adultos normales del Departamento de Risaralda.

CATEGORIAS	HOMBRES		MUJERES		TOTAL
	No.	%	No.	%	
Alelos normales(10-40)	435	37,15	711	60,72	1146
Alelos intermedios(41-60)	8	0,68	14	1,20	22
Alelos premutados(61-199)	0	0,00	3	0,26	3
	443		728		1171

nes del comportamiento. Los individuos con premutaciones pueden manifestar alteraciones fenotípicas sutiles del síndrome, trastornos cognoscitivos y de la conducta que varían ampliamente y dependen del número de repeticiones CGG<sup>(13-19)</sup>. Para detectar los portadores es necesario realizar entonces un análisis genotípico molecular del gen FMR1 para la determinación tanto del tamaño de la expansión como el grado de metilación de la isla CpG<sup>(27,28)</sup> y correlacionar estos hallazgos con los aspectos fenotípicos y del comportamiento.

El análisis con la sonda StB12.3 y las enzimas sensibles a metilación EagI y EcoRI mostró un fragmento de 2.8kb en los varones con alelos intermedios y de 2.8 y 5.2 en las mujeres con alelos intermedios. El sitio 2.8 es metilado en el cromosoma X inactivo de las mujeres<sup>(26)</sup>. Estos resultados señalan un patrón de metilación normal. En los individuos premutados el fragmento de 2.8 puede incrementarse a 2.9-3.4 en los varones y en el cromosoma X activo de las mujeres. El fragmento de 5.2kb puede incrementarse a 5.3-5.8 en el cromosoma X inactivo de la mujer. En dos de las mujeres con un alelo premutado (72 y 82 repeticiones

CGG por PCR) aparecen fragmentos adicionales de 3.0 y 3.2kb respectivamente en el sitio EagI y corresponden al cromosoma X inactivo. La mujer con el alelo premutado de 155 repeticiones CGG por PCR muestra un fragmento adicional de 5.4kb en el sitio EcoRI que corresponde al cromosoma X activo<sup>(27)</sup>.

Algunos autores han propuesto que la prevalencia de mujeres portadoras de premutación o mutación completa puede ser tan alta como 1/250. Sin embargo hay una variación significativa en el estimado de la prevalencia de portadores de premutaciones del X-frágil: 1/163 a 1/1538 (29,30). Para la población del Departamento de Risaralda con 745.950 habitantes (w.w.w.colombia.com.co) la prevalencia de portadores es de 1/270.

### Conclusiones

Se realizó una genotipificación a nivel molecular del sitio FRAXA para encontrar las variaciones en el número de repeticiones de la tripleta CGG correspondientes a los alelos normales, a los alelos intermedios y al estado de premutación en el sitio FRAXA en una población de 807 individuos adultos normales de ambos sexos y escogidos al azar del Departamento de Risaralda. Se identificaron las frecuencias de los individuos con el alelo normal, el cual se presentó en un rango entre 10 y 39 repeticiones CGG en el 98% de los individuos de esta población (98.2% de los hombres y 97.7% de las mujeres). El alelo intermedio fue identificado en el 1.87% de la población (1.8% de los hombres y 1.92% de las mujeres). El estado de premutación apareció en 3 individuos de la población general (3 mujeres) correspondiente al 0.37%. Si la prevalencia aceptada para otras poblaciones de portadores de la premutación FRAXA puede ser entre 1/163-1/1538, en esta población con 745.950 habitantes (w.w.w.colombia.com.co) la prevalencia de portadores es de 1/270 para la población del Departamento de Risaralda.



## Referencias bibliográficas

1. Mornet E, Chateau C, Simon-Bouy B, Serre J.L. The Intermediate alleles of the fragile X CGG repeat in patients with mental retardation. *Clin Genet* 1998; 53:200-201.
2. Crawford D.C, Meadows K.L, Neuman L, Taft L.F, Pettay D.L, Gold L.B, et al. Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large ethnically diverse, special education- needs population. *Am J Hum Genet* 1999; 64:495-507.
3. Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel J L. Inheritance of fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant to full mutation. *J Med Genet* 1992; 29:794-801.
4. Ashley C.T, Sutcliffe J.S, Kunst C.B, Leiner H.A, Eichler E.E, Nelson D.L, Warren S.T. Human and murine FMR1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nature Genet* 1993; 4:244-251.
5. Snow K, Tester D.J, Kruckeberg K.E, Schaid D.J, Thibodeau S.N: Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1543-1551.
6. Verkerk A.H, Pleretti M, Sutcliffe J.S, Fu Y.H, Kuhl D.P.A, Pizzuti A, et al. Identification of the gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a break point cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65:905-914.
7. Hinds D.L, Ashley C.T, Sutcliffe J.S, Nelson D.L, Warren S.T, Housman D.E, Schalling M. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence of a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet* 1993; 3:36-46.
8. Vherhei J.C, de Graaff E, Bakker C.E, Willemsen R, Willemsen P.J, Meijer N, et al. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 985-901.
9. Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel J.L. Inheritance of fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant to full mutation. *J Med Genet* 1992;29:794- 801.
10. Andrew S. Expanding beyond trinucleotides: expansion of 12- and 42-base pair repeats. *Clin Genet* 1998; 54:459-463.
11. Crawford D.D.C, Zhang F, Wilson B, Sarren S.T and Sherman S.L. Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeats instability. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1759-1769.
12. Laxova R: Fragile X syndrome. *Adv Pediatr* 1994; 41:305-421.
13. Kerby D.S and Daws, B.L. Autistic features, personality and adaptive behavior in males with fragile X Syndrome and no autism. *Am J Ment Retard* 1994; 98(4):455-62.
14. Freund L.S, Reiss A.L, Abrams M T. Psychiatric disorders associated with fragile X in the young female. *Pediatrics* 1993; 91:321-329.
15. Dorn M.B, Mazzocco M.M, Hagerman R.J. Behavioral and psychiatric disorders in adult male carriers of fragile X. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1993; 33: 256-264.
16. Franke P, Leboyer M, Gansicke M, Weiffenbach O, Biancalana V, Cornillet-Lefebvre P, et al. Genotype-phenotype relationship in female carriers of the premutation and full mutation of FMR-1. *Psychiatry Res* 1998; 80: 113-127.
17. Uzielli M.L, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G, et al. Premature ovarian failure (PFO) 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; 84:300-303.
18. Sherman S.L, Jacobs P.A, Morton N.E, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles P.N, Nielsen K.B, et al. Further segregation analysis of the fragile X Syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 71:184-86.
19. Murray A, Youings S, MacPherson J.N, Pound M.C, Sharrochck A, Youings S.A, et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum Mol Genet* 1997; 6(2):173-184.
20. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550 base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252:1097-1102.
21. Oudet C, Monet E, Serre J.L, Thomas F, Lentes-Zengerling S, Kretz C, et al. Linkage C.A repeats suggests that X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am J Hum Genet* 1993; 52:297-304.
22. Rousseau F, Levesque S, Dombrowski C, Morel M. Transmission of normal, gray zone and premutation-size FMR1 alleles in the general population: effects of size, array structure and sex of offspring. *Annals 9<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X Syndrome and X Linked Mental Retardation*. August, 1999
23. Rengifo L, Alegria A.H, Aguilar E. Análisis de las mutaciones FRAXA y FRAXE por métodos citogenéticos y moleculares en una población con retardo mental y otras alteraciones de la conducta. *Rev Esp Ped* 1999; 55(5):434-440.
24. Brown, W.T, Houck, G.E Jr, Jeziorowska, A, Levinson F.N, Xiaohaua D, Dobkin C, et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a non radioactive PCR Test. *JAMA* 1993; 270(13):1569-1575.
25. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X Syndrome of mental retardation. *N Eng J Med*. 1993; 325(24).
26. Nolin S, Lewis, S.A, Ye, L.L, Houck G.E, Glicksman A.E, Pornprot L, et al. Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1252-1261.
27. Sutherland G.R, Gedeon A, Kornman L, Donnelly A, Byard R.W, Mulley J.C, et al. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N Engl J Med*. 1991; 325:1720-1722.
28. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, Macpherson J, Malgren H, Dahl N, et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2,253 cases. *Am J Hum Genet* 1994; 55(2):225-37.
29. Youings S.A, Muray A, Dennis N, Ennis S, Lewis C, McKechnie N, et al. FRAXA and FRAXE: results of a five year survey. *J Med Genet* 2000; 37: 415-421.
30. Reiss A.L, Kazazian H.H, Krebs C.M, Mcaughan A, Boehm C.D, Abrams M.T, Nelson D. Frequency and stability of the fragile X premutation. *Hum Mol Genet*. 1994; 3:393-398.