

Aplicación de la genética molecular en el síndrome X-frágil. Aspectos citogenéticos y conductales

Méndez Felpeto, Josefina (*), Pásaro Méndez, Eduardo (**)

* Dpto. de Biología Celular y Molecular. Area de Genética. Universidad de La Coruña.

** Dpto. de Psicología. Area de Psicobiología. Universidad de La Coruña.

1.- Introducción

Durante la década de los 60 y al comienzo de la década de los 70, sólo se disponía de la técnica autorradiográfica para intentar identificar los cromosomas. Este método, por ejemplo, en los síndromes de Wolj y de Lejeune, diferenciaba el cromosoma del par 4 ó 5 implicado, porque en el primer síndrome el cromosoma delecionado (4p-) formaba parte del par que replica su ADN más tardiamente, mientras que en el segundo síndrome el cromosoma delecionado (5p-) formaba parte del par que replica más precozmente (Prieto et al., 1975). Este método autorradiográfico aunque representaba una ayuda para la diferenciación de ambos síndromes tenía muchas limitaciones.

La aparición de los métodos de bandas al comienzo de la década de los años 70 fue un logro importante, ya que no sólo se podían identificar sin error cada uno de los pares cromosómicos, sino también sus múltiples aberraciones. Así en el síndrome de Lejeune, y debido a la variabilidad que desde el punto de vista citogenético presentan estos pacientes, se pudo demostrar que el segmento cromosómico responsable del síndrome asignado en principio por Niebuhr

(1972) a la porción distal de la banda 5p14 y proximal de la banda 5p15, debería circunscribirse a la región proximal de la banda 5p15 (Prieto, 1974; Prieto et al., 1976).

2. La utilización de las técnicas moleculares y el síndrome del X-frágil

Los aportes de nuevas técnicas mejoran y clarifican los estudios de diferentes síndromes. Actualmente la tecnología del ADN recombinante cada vez se está utilizando más en el diagnóstico, conjuntamente con los datos citológicos.

Las técnicas citogenéticas han permitido detectar un síndrome asociado al retraso mental que fue descrito por Martin y Bell en 1943. Describen el síndrome, X-frágil, como un retraso mental relacionado con un defecto genético. Actualmente diversos estudios indican que un 50% de retrasos mentales inespecíficos ligados al cromosoma X pueden atribuirse a la fragilidad de dicho cromosoma (Mattei, 1981).

Este síndrome está asociado con un marcador citogenético. En 1969 Lubs fue el primero en relacionar el retraso mental con la existencia de un marcador cromosómico (Lubs, 1969; Sutherland, 1977). Hoy en día sabemos que se trata de una zona frágil localizada en los brazos largos del cromosoma X a nivel de la banda Xq27.3 (Shuterland et al., 1990; Gine et al., 1992), y se considera a este síndrome del cromosoma X-frágil como la causa heredada más frecuente de retraso mental ya que su incidencia es de 9/1.000 en varones (August y Lockhart, 1984) y 0.5/1.000 en hembras (Sherman et al., 1984, 1985; Gustavson, 1986; Webb et al., 1986; Tizzano et al., 1992). Es comparable con la del síndrome de Down (Herbst y Miller, 1980; Opitz, 1986). Por ello el síndrome X-frágil es foco de interés para numerosos grupos investigadores de todo el mundo. Sin embargo como el defecto molecular desencadenante permanece aún desconocido, no es posible todavía realizar un tratamiento eficaz.

Aunque existen rasgos físicos y de comportamiento (Tabla 1) con cierto valor diagnóstico (Brown, 1989), la caracterización más precisa hasta la primavera de 1991, se llevaba a cabo por la observación del sitio frágil (Xq27.3) que se expresa como un "gap" en el cromosoma X (Figura 1), en cultivo de linfocitos, en condiciones de deficiencia de precursores sintéticos del ADN (Sutherland,

1977); estudios de cromosomas X-frágil indican que el “gap” representa alrededor de un 4.75% del total de la cromátida (Pásaro et al., 1991).

Los estudios familiares sugieren un patrón de herencia dominante ligada al cromosoma X con penetrancia incompleta. La experiencia obtenida de los estudios familiares en los que se demuestra (Shuterland y Mully, 1990) que la utilidad del marcador citogenético para el diagnóstico de portadoras es limitado, ya que aproximadamente el 50% de ellas manifiestan un fenotipo normal y no se observa el X-frágil, ni siquiera en el 1% de las metafases estudiadas, siendo su utilidad para el diagnóstico prenatal poco fiable. Además no es posible detectar varones transmisores no penetrantes. Todo ello representa una seria limitación para asesorar genéticamente a estas familias y limita en gran medida las posibilidades para hacer un diagnóstico prenatal correcto.

El interés que el síndrome X-frágil ha suscitado en las diferentes grupos investigadores de diversos países ha sido muy diverso, y aunque prácticamente todos los laboratorios de Genética han dispuesto en uno u otro momento de las técnicas citogenéticas específicas para la expresión de la fragilidad de los individuos afectados, sólo unos pocos han venido aplicando estas técnicas prácticamente desde el momento de su conocimiento. Las técnicas citogenéticas que en un principio habían sido diseñadas para uso exclusivo en la detección de portadores del síndrome X-frágil, son ahora un método rutinario en algunos laboratorios de Genética y de Psicología, aplicables a sujetos que presentan algún grado de retraso mental inespecífico, con o sin alteraciones de la conducta. La aplicación correcta de estos métodos específicos no supone en ningún momento un empobrecimiento en la calidad del material a estudiar citogenéticamente, sino que por el contrario se consigue una mejora en la calidad diagnóstica, ayudando a la detección del síndrome en varones y hembras con mutación de novo.

Inicialmente las técnicas de análisis molecular permitieron abordar el estudio y diagnóstico de este síndrome con mayor fiabilidad. La utilización de poli-



Figura 1. Cromosoma X, mostrando la zona X-frágil. Xq 27.3

morfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs) como marcadores genéticos ligados al gen responsable del síndrome resultan ser útiles para el diagnóstico. Si una madre es heterocigótica para el marcador, el estudio de la familia permite la identificación del alelo que cosegrega con la mutación. Dado que existe la posibilidad de una recombinación entre el marcador y el gen X-FRA, el análisis de marcadores a ambos lados del gen puede ser útil para detectarla y evitar un diagnóstico erróneo. Es necesario conocer con la máxima seguridad las frecuencias de recombinación entre, por ejemplo, el gen del factor IX de coagulación y el gen X-FRA (Brow et al., 1987, 1988), maximizándose la probabilidad de los datos (con un nivel de significación de $p < 0.0005$) bajo el supuesto de un 20% de familias que presentan un fuerte ligamiento entre el gen del factor IX (F9) y el X-FRA y un 80% donde el ligamento es menor, aproximadamente 35 cM.

3. Metodología

La expresión citogenética de la fragilidad del cromosoma X se observa en células de linfocitos cultivadas con medio TC-199 al que se le añade 10% de suero bovino fetal y 10 mM de fluorodeoxiuridina (FUDR) durante 24 h. (Shapiro, 1986).

Para técnicas moleculares, el gen total se suele obtener de sangre periférica, con EDTA como coagulante. Muestras de 10 µg de ADN se someten a digestión con 4-6 veces de exceso de enzima de restricción (p.e. St14). A continuación se fraccionan mediante electroforesis en gel de agarosa a 35 V durante 12 h; posteriormente el ADN se transfiere a membranas de nylon según el procedimiento descrito por Southern (Southern, 1975).

La hibridación con las sondas marcadas se realiza en 5xSSC, lauroilsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, agente de bloqueo 5% y formamida desionizada 50%, incubándose 12 h a 42 °C con 20-40 ng de sonda marcada por ml. Tres lavados de 15 minutos; uno en 2XSSC, SDS 1% a temperatura ambiente, otro en 1XSSC a 65 °C y finalmente en 0,5XSSC. Para el marcaje de la sonda y su posterior detección se pueden usar kits no radioactivos o marcados radioactivamente. Un método de marcaje de la sonda consiste en oligomarcaje con digoxigenina, que posteriormente es reconocida por anticuerpo, antidigoxigenina,

conjugado con fosfatasa alcalina. Este enzima cataliza una reacción coloreada que permite la visualización de las bandas. La sensibilidad que alcanza este método (0,1 pg de ADN) permite la detección de secuencias de copia única en el genoma humano, pero es algo menor que la del ^{32}P , lo que implica una cierta mayor dificultad técnica, así como el uso de mayores cantidades de sonda.

Sin embargo, estos inconvenientes se ven ampliamente compensados por la ausencia de riesgos que comporta el no trabajar con radioactividad, deja de ser necesaria la disponibilidad de una zona reservada exclusivamente para el ^{32}P y se eliminan las complicaciones de los desechos radioactivos. Por otro lado, la definición de las bandas puede ser mayor, lo cual es de considerable interés para ciertos polimorfismos. Otra gran ventaja que no posee el ^{32}P es que la sonda marcada puede almacenarse durante prolongados períodos de tiempo a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ sin perder apenas actividad y permiten ser reutilizadas.

La estrategia frecuente de utilización es estudiar primero los marcadores más cercanos por ambos lados (DXS52, DXS105 y DXS98). También se estudia el F9 por dos motivos: por una parte, dado que se poseen muchos más datos de ligamento con el X-FRA, sirve como referencia para conocer con mayor exactitud las frecuencias de recombinación entre los marcadores DXS105 y DXS98 con el X-FRA mediante análisis de ligamiento multipuntual. Por otro lado es interesante su estudio para determinar la naturaleza y región responsable de la heterogeneidad de ligamento entre el X-FRA y el F9, así como si también afecta a los marcadores más próximos por el momento conocidos.

Con marcadores informativos a ambos lados la probabilidad de error es el producto de sus frecuencias de recombinación (suponiendo que no exista interferencia) y por tanto será baja: 0.6% para DXS98 y DXS52, 2.8% para F9 y DXS52. Sin embargo, si los marcadores sólo son informativos por un lado del X-FRA, la probabilidad de error es la propia frecuencia de recombinación y por tanto será bastante mayor. De aquí la necesidad de otras sondas de localización algo más lejanas pero que puedan ser útiles en el caso de que las más cercanas no sean informativas. Por el lado distal, dada la alta informatividad de DXS52, una sola hibridación suele ser suficiente. Sin embargo, al ser menor la informatividad de DXS105 y DXS98, el número de hibridaciones necesarias para la zona proximal puede variar ampliamente de unas familias a otras: de dos a ocho.

Posteriormente, un diagnóstico prenatal cuando la familia ya ha sido estudiada sólo requerirá hibridar el ADN del probando con las dos sondas informa-

tivas más cercanas, de aquí la necesidad de aconsejar a las familias que se realice el estudio lo antes posible.

Del estudio sobre genética molecular de retraso mental debido al X-frágil se deduce que es importante para un futuro, fijar con mayor grado de significación tanto el orden preciso de los marcadores disponibles, como las frecuencias de recombinación con el gen responsable de la mutación, así como la naturaleza de la posible heterogeneidad de ligamiento en la región proximal de X-FRA, y utilizar nuevos marcadores localizados mucho más próximos al X-FRA que incrementarán la fiabilidad del diagnóstico y disminuirán la proporción de casos dudosos por recombinación entre los marcadores; en última instancia permitirán el aislamiento del gen o los genes responsables del síndrome.

Actualmente no se puede ignorar la utilidad diagnóstica de sondas directas y nuevos marcadores genéticos que detecten variaciones del fragmento genómico que contiene la mutación responsable del síndrome en individuos de estas familias (Shapiro, 1991; Dahl et al. 1992).

Tabla 1.- Principales rasgos morfológicos característicos del síndrome X frágil.

(Tomado de Brown WT. (1989). The fragile X syndrome. *Neurol. Clin.*)

Articulaciones extensibles
Asimetría facial
Cara larga
Diámetro facial estrecho
Distancia entre ojos estrecha
Frente prominente
Macroorquidismo
Orejas grandes y prominentes
Paladar alto y arqueado
Perímetro cefálico grande
Prolapso de válvula mitral
Pulgares prominentes

Hasta la aparición, en la primavera de 1991, de sondas directas, que reconocen la región mutable en el cromosoma X, el diagnóstico en estas familias ha sido a veces difícil, pues, a diferencia de otros síndromes ligados al X, un

tercio de las hembras portadoras presentan también algún tipo de retraso mental, aunque más leve que los varones, y casi la mitad muestran expresión citogenética en cultivos linfocitarios. Además, aproximadamente el 20% de los varones, quizá más, que heredan la mutación, aparecen fenotípicamente normales y sin expresión citogenética, pero son transmisores del cromosoma X-frágil a sus hijas.

Dadas las anteriores circunstancias, junto a la ausencia de un tratamiento efectivo y el desconocimiento total del defecto bioquímico desencadenante, el síndrome X-frágil supone un reto para la biología molecular, ya que sólo el conocimiento del "gen" responsable o "genes" implicados podrían explicar el variable patrón de herencia que se observa, y serviría de punto de partida para el desarrollo de un tratamiento específico a este problema. En este sentido, algunos descubrimientos ya muestran alguna luz sobre la base molecular causante del síndrome, así como el reconocimiento de un gen específico (FMR1) (Verkerk et. al., 1991).

Utilizando sondas de ADN anónimas localizadas en la región Xq26-28, se ha podido mapear genéticamente la localización de la mutación. Las sondas de ADN ligadas al locus X-FRA han servido para seguir la herencia del cromosoma X responsable del desorden en las familias afectadas, y se han utilizado para la detección de portadores, confirmación de varones transmisores en las familias, y como apoyo en el diagnóstico prenatal que inicialmente se realizaba exclusivamente por citogenética, así como en estudios para aclarar la naturaleza de la mutación subyacente. Las sondas más frecuentemente utilizadas en estos estudios se muestran en la tabla 2.

El hecho de haber empleado sondas ligadas muy cercanas al locus X-FRA en estos estudios de ligamiento genético, es posiblemente la causa responsable de la baja tasa de recombinación meiótica encontrada, lo que constituye una mejora considerable en el diagnóstico de portadores de este síndrome, en comparación con estudios realizados durante toda la década de los ochenta (Suthers et. al., 1991).

Proximamente, se podría concluir que las sondas más próximas, K23B (DXS 297) y RN1A (DXS 369), resultan ser más útiles en el diagnóstico de portadores del síndrome X-frágil, ya que además de su proximidad al locus X-FRA presentan una baja tasa de recombinación entre ellas y el propio gen (Suthers, et al., 1991; Costra et al., 1991).

Tabla 2.- Sondas flanqueantes utilizadas en el estudio del Síndrome X frágil.

SONDA	FRECUENCIA ALÉLICA		LOCUS	AUTORES
	A1	A2		
1A1	0.57	0.43		(Patterson, 1991)
4D-8	0.84	0.16	DXS98	(Schnur, 1989)
4D8-B			BgI II	
4D8-IV			Xmn I	
52A	0.50	0.50	DXS51	(Dayma, 1984)
55.E	0.48	0.52	DXS105	(Arveiler, 1988)
DX13	0.50	0.50	DXS15	(Harper, 1984)
F.814	0.34	0.66	F8C	
RN1A	0.53	0.47		(Hupkes, 1989)
St14	0.32	0.68	DXS52	(Overle, 1985c)
U6.2.20E	0.62	0.38		(Roussou, 1990)
VIII	0.30	0.70	F9	(Tonessen, 1984)
VK21AC	0.83	0.17		(Suthers, 1989)
VK23B	0.83	0.17		(Suthers, 1990)
X55.7			DXS105	(Hofker, 1987)
XIII	0.36	0.64	F9	(Winship, 1984)

Distalmente se concluye que la sonda más cercana, informativa y con menor tasa de recombinación es la sonda U6.2.20E, así como que la zona más propensa a sufrir recombinación es el fragmento situado distalmente a la sonda 1A1 (DXS 374), esto es, una región de 2 Mb en la región Xq28.

La observación más importante derivada de estos estudios puede ser la necesidad de recoger información flanqueante al locus X-FRA, bien con las sondas referidas, o al menos con dos de ellas, puesto que sus frecuencias de recombinación del 4% a ambos lados del gen las hacen capaces de poder ofrecer con una mayor garantía un resultado fiable a cada hembra portadora, susceptible de ser utilizada en diagnóstico prenatal (Sutherland et. al.,1990; Suthers, et al., 1991).

Conviene destacar la importancia que tiene en estos estudios familiares disponer de la máxima información molecular precisa antes de abordar el estudio prenatal de cualquier hembra portadora, con el fin de poder utilizar las sondas informativas en cada una de ellas.

El disponer de marcadores estrechamente ligados ha permitido aplicar las nuevas tecnologías del ADN recombinante para comprender, aislar y caracterizar la mutación, lo que ha hecho que un gran número de laboratorios en todo el mundo se hayan esforzado por conseguir marcadores genéticos cada vez más cercanos, en la rápida carrera por caracterizar al “gen” responsable. Fruto de esta intensa investigación es el conocimiento actual de una región mutable, que sufre una inserción/amplificación de material genómico; dependiendo del tamaño de la inserción y de que se encuentre o no metilado (marcado por el fenómeno de “imprinting”), será definitivamente responsable de la aparición del síndrome en estas familias. A este respecto las sondas directas que se utilizan en la actualidad para estos estudios son StB12.3 (Oberle et al., 1991), pFXA.3 (Yu et al., 1991) y PE.5 (Verkerk et al., 1991).

Una inserción de pocas bases (100-500 bp) parece ser la responsable de una “premutación”, premisa indispensable para que se pueda desarrollar una “mutación completa”, verdadera desencadenante del síndrome. La región mutable se localiza junto a una zona CpG que, como se sabe, se sitúa con frecuencia en el extremo 5' de genes de mamíferos. La desmetilación de un cromosoma X inactivo y por tanto de la CpG, es un fenómeno habitual en los procesos de reactivación que se producen durante la oogénesis en los cromosomas X de las hembras. Una inserción en esa zona mutable sufre un proceso de metilación para ser inactivada.

Las teorías que soportan la hipótesis de que el síndrome X-frágil se puede presentar de novo (Pembrey et al., 1985; Laird, 1987), inducen de alguna manera a llevar a cabo la aplicación rutinaria de esas técnicas específicas en cualquier varón con retraso mental inespecífico.

El apoyo que proporcionan los estudios moleculares en el síndrome X-frágil está fuera de toda duda, ya que citogenéticamente el comportamiento de las hembras portadoras es algo especial. En bastantes casos, la condición de portadora no queda citogenéticamente clara, y durante la década de los ochenta sólo la determinación del haplotipo marcador del síndrome con sondas ligadas al locus X-FRA, presente en el individuo afecto, confirmaba definitivamente la condición genética de las mismas. A partir de mediados de 1991 la detección direc-

ta de los fragmentos mutados y normales en cada individuo de estas familias proporciona la información precisa para reconocer de que tipo de individuo se trata, normal, portador, o afectado, sea varón o hembra.

Los avances producidos en los dos últimos años no ofrecen duda de que la caracterización del "gen" responsable y del defecto bioquímico desencadenante del síndrome está cada vez más próxima. Las situaciones de difícil interpretación, hasta hoy frecuentes, debido a la alta tasa de recombinación genética que se produce en esa zona del sitio frágil Xq27.3 posiblemente serán sólo recuerdos en un futuro muy próximo.

En cuanto a seguridad diagnóstica se refiere, es necesaria la utilización de las sondas directas; no sólo es positivo en el aspecto económico, ya que supone hacer una sólo hibridación por familia frente a las múltiples hibridaciones necesarias para los estudios de ligamiento, en función de las sondas heterocigotas para cada hembra portadora, sino el hecho de evitar los fenómenos de recombinación, que con frecuencia se observan en estas hembras y que aumentan a medida que la sonda se aleja más del locus X-FRA (Shapiro, 1991).

Ese último dato da una idea de la mayor precisión diagnóstica del análisis molecular directo en hembras, frente a estudios citogenéticos y de ligamiento que puedan presentar algún tipo de duda.

La situación creada desde la aparición de las sondas directas para el análisis del síndrome X-frágil, ha hecho cambiar las estrategias definidas para abordar tales estudios, llevando, una vez confirmado un varón X-frágil citogenéticamente en una familia, a realizar un estudio molecular directo de la mutación en el mayor número de miembros de la familia, con el objeto, no sólo de detectar hembras portadoras y varones sanos transmisores del síndrome, sino conocer la situación concreta de cada uno de los portadores para poder asesorar debidamente cada caso particular (Shapiro, 1991).

La buena situación creada desde la aparición de las sondas directas en los estudios moleculares no implica descartar por completo los estudios de ligamiento con marcadores flanqueantes al locus, que si bien cada vez serán más escasos, pueden ser de gran utilidad en casos de duda que pueden presentarse por el análisis directo, por la escasa experiencia existente con este método, y que junto a estudios citogenéticos pueden servir de apoyo a algunos diagnósticos, especialmente prenatales, ya que en el material fetal la metilación no se comporta del mismo modo que en el material procedente de adultos, por lo que sondas di-

rectas como pFXA.3 parecen ser más indicadas para estudios prenatales, ya que reconocen solamente la inserción, independientemente de su estado de metilación (Sutherland, 1991). En estos casos, por el momento, es más que conveniente disponer de información de ligamiento flanqueante al locus X-FRA.

Una de las utilidades más inmediatas de las sondas directas, además de la diagnóstica, puede estar en la búsqueda, por screening, de pacientes candidatos en colegios y guarderías infantiles, en todos aquellos individuos que presenten rasgos típicos y/o dificultad en el lenguaje o el aprendizaje, o tengan un vocabulario pobre y repetitivo, ya que esta alteración cromosómica se encuentra relacionada con rasgos conductuales de tipo autista. La presencia de la banda constante en cada uno de ellos, descartaría la existencia del síndrome, mientras que la ausencia de tal banda lo seleccionaría como candidato a ser estudiado citogenéticamente con los métodos específicos para su confirmación cromosómica posterior, que en caso afirmativo desencadenaría el análisis directo de la mutación en la familia.

4.- El síndrome del X-frágil y las conductas autistas

La historia del autismo, como entidad clínica reconocida, comienza en el año 1943, en que Kanner describió cuidadosamente las características sintomatológicas de un grupo de niños que no podían ser diagnosticados bajo ningún síndrome conocido hasta entonces. Dichas características se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3.- Características autistas, según Kanner.

Alto interés por manipular objetos con finos movimientos
Buena memoria mecánica
Comienzo precoz de la sintomatología
Conductas obsesivas
Dificultad de relación con otros, incluidos sus familiares
Ecolalia retardada
Incapacidad de relación afectiva
Mutismo

Dado que en esa época estaban en auge las teorías psicodinámicas, Kanner destacó un síntoma como fundamental para establecer el diagnóstico: la incapacidad de relación afectiva. Para el autor, este aspecto explicaría el resto de los

trastornos, de forma que las alteraciones cognitivas e intelectuales serían secundarias al déficit afectivo.

Durante años se ha utilizado el criterio propuesto por Kanner para diagnosticar autistas, pero frecuentemente se ha tomado una síntesis de la sintomatología propuesta por el autor, de forma que no existía ningún criterio único y uniforme para el diagnóstico. De esta forma, la investigación realizada presentaba el problema de no poder generalizar sus resultados más allá de la muestra utilizada.

Por otra parte, Kanner partía de que los autistas tenían unas capacidades cognitivas normales, pero que se encontraban inhibidas debido a su déficit afectivo. Sin embargo, se ha confirmado extensamente que el autismo va asociado la mayoría de las veces a retraso mental y que por tanto no existe tal capacidad cognitiva.

El DSM-III-R, cataloga al autismo como un trastorno (299.00) que requiere 8 de los 16 requisitos propuestos, de los cuales tiene que presentar al menos dos del apartado A, uno del apartado B y uno del apartado C (Tabla 4). Este criterio de diagnóstico no especifica la naturaleza de las alteraciones.

Tabla 4.- Características autistas, según el DSM-III-R.

A.- Deterioro cualitativo en la interacción social

- 1) ausencia de sentimientos o sensibilidad a los demás
- 2) en períodos de estrés no busca apoyo
- 3) Incapacidad o dificultad para imitar
- 4) anomalías o ausencia de juegos sociales
- 5) dificultad para hacer amigos

B.- Deterioro importante en la comunicación verbal y no verbal, y en la actividad imaginativa

- 1) ausencia de comunicación
- 2) comunicación no verbal ausente o alterada
- 3) ausencia de actividad imaginativa
- 4) anomalías graves en el habla
- 5) anomalías graves en la forma y contenidos del habla
- 6) deterioro importante para iniciar o mantener una conversación con los demás

C.- Repertorio limitado de intereses y actividades

- 1) presencia de movimientos corporales estereotipados
- 2) preocupación excesiva por detalles o formas de distintos objetos
- 3) malestar importante frente a pequeños cambios del entorno
- 4) insistencia excesiva en seguir rutinas con gran precisión
- 5) restricción notable en el conjunto de intereses y preocupación excesiva por algún aspecto determinado

D.- Comienzo en la infancia o en la niñez (36 meses)

Establece 4 bloques fundamentales para diagnosticar a un autista (Tabla 5). Este criterio de diagnóstico es el más utilizado, lo que permite establecer unidad de criterios entre los investigadores y favorece la generalización de los resultados. Por otro lado permite establecer un buen diagnóstico diferencial con otros trastornos que podrían confundirse con el autismo.

Tabla 5.- Características autistas, según Rutter.

-
1. *Comienzo de la sintomatología antes de los 30 meses*
 2. *Desarrollo social alterado que no se corresponde al nivel intelectual del niño* (disarmonía evolutiva), y que presenta ciertas características especiales (Churchill y Bryson, 1972)
 3. *Desarrollo lingüístico retrasado y anómalo que no se corresponde con su nivel intelectual*
 4. *Insistencia en la identidad*
 - Pautas de juego rígidas, limitadas, sin variedad ni imaginación
 - Intenso apego hacia ciertos objetos
 - Frecuentes obsesiones que le absorben y le impiden realizar otras actividades
 - Ritualismos y compulsiones (siempre hace lo mismo al levantarse, sin variar ninguna pauta)
 - Marcada resistencia a los cambios que se dan en el entorno (todo en su sitio, y horarios exactos)
-

Diagnóstico diferencial:

En el retraso mental: los autistas presentan déficits particulares que no se dan en los retrasados mentales y que afectan a sus pautas lingüísticas y de socialización.

En la esquizofrenia: presenta una evolución episódica con recaídas y remisiones, mientras que el autismo es un trastorno permanente. En el autista no aparecen alucinaciones. En los trastornos evolutivos del lenguaje no presentan el repertorio de déficits sociales de los autistas.

En el síndrome de Asperger: tienen aproximadamente los mismos síntomas, su aparición es hacia los 7 años y se va intensificando a medida que pasa el tiempo, lo que no ocurre en el autismo.

En el síndrome de Rett: sólo se da en niñas (etiología genética), es degenerativo, en contraposición con el mantenimiento sintomatológico del autista.

Epidemiología

La frecuencia de autistas es de 0.004%. El 70-75% de autistas tienen retraso mental grave asociado (C. I. por debajo de 50).

Estudios de Lotter (1966) en Gran Bretaña indican que existe un 75% de varones autistas frente a un 25% de mujeres autistas.

Teorías etiológicas

Afectivas: predominantes en la década de los 40, destacan como síntoma fundamental del autismo su incapacidad para relacionarse afectivamente. La terapia psicodinámica no da ningún resultado con estos pacientes. Además, se comenzó a sospechar la existencia de posibles alteraciones orgánicas o genéticas confirmándose la existencia de retraso mental en alto porcentaje de autistas, frente a la supuesta capacidad cognitiva de la que hablaban las teorías afectivas.

Organicistas: predominantes en las décadas de los 50 y 60. Se seguía sospechando una base orgánica aunque todavía sin delimitar claramente. Los estudios genéticos encuentran datos consistentes con un modelo de transmisión recesiva y establecen la relación con la presencia del cromosoma X-frágil. En los estudios bioquímicos no se han hallado resultados que expliquen la sintomatología; los estudios neuroanatómicos y fisiológicos tampoco han hallado resultados concluyentes. Un gran problema de estos estudios es que en la selección de los sujetos no se tiene en cuenta el mismo criterio diagnóstico.

Cognitivistas: predominante en la década de los 70. No niegan la existencia de posibles alteraciones de tipo orgánico, pero se centran en el estudio de los aspectos cognitivos asociados al trastorno.

Existen aspectos cognitivos alterados como la dificultad en la percepción de contingencias, lo que impide el correcto desarrollo de los aprendizajes (Hermelin y O'Connor, 1970).

Estado actual:

Hobson en 1986 encontró que los autistas presentaban dificultades en el reconocimiento de expresiones emocionales en rostros, en comparación con otros grupos de control (sujetos normales y sujetos con patología cromosómica Down) emparejados por edad mental no verbal (EMNV). Por otra parte, parecía existir un trastorno independiente de su retraso mental y específico del autismo.

En 1989 Hobson y Lee comparando la ejecución de los autistas en tareas de distinta naturaleza encuentran que los autistas tienen dificultades en trabajar con conceptos relacionados con elementos emocionales, mientras que su ejecución con material concreto no difiere significativamente del trabajo realizado por pacientes con síndrome de Down y controles emparejados por edad mental no verbal (EMNV).

Los cognitivistas se han centrado en el estudio de un aspecto específico que está alterado en el autismo, su capacidad de metarrepresentación. Estos estudios partieron del modelo de desarrollo metarrepresentacional (MDM) propuesto por Leslie (1985), según el cual la capacidad de establecer metarrepresentaciones es fundamental para que el niño consiga comprender los estados mentales de los otros.

Baron-Cohen, Leslie y Frith en 1985 encuentran que los autistas no aprecian la diferencia entre su propio conocimiento y el conocimiento de otro, y explican esta dificultad como una falta de habilidad para representar estados mentales.

5. Otros síndromes ligados al cromosoma X que cursan con deficiencias en las capacidades cognitivas o motoras.

El grupo de síndromes con retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX) que no presentan el marcador citogenético X-frágil lo integran síndromes de muy diversa naturaleza en los que el retraso mental se puede asociar a un defecto bioquímico (Lesh y Nyhan, 1965), alteraciones neurológicas (Partington et al., 1988), displasia ósea (Christian et al., 1977) y a cuadros malformativos de muy diversa naturaleza (Juberg y Marsidi, 1980; Prieto et al., 1987, 1992; Renpenning et al., 1962). Incluso parece existir un tipo de retraso mental similar, sino clínicamente idéntico, al asociado con X-frágil en el cual no se observa este marcador citogenético (Proops et al., 1983; Arveiler et al., 1988).

Aproximadamente se han descrito 88 trastornos ligados al cromosoma X asociados con retraso mental (McKusic, 1991). Excluyendo aquellos síndromes en los cuales el retraso mental es debido a un error del metabolismo (síndrome de Lesch-Nyham), un gen dominante letal en el hemocigoto (síndrome de Aicardi) y otros debidos a causas diversas; quedan más de 20 fenotipos en los cuales el retraso mental parece ser el elemento primario. Estas formas de retra-

so mental ligado al cromosoma X (RMLX) cuya patogenia es desconocida, pueden ser subdivididas en formas dismórficas y no-dismórficas, según que presenten dismorfías menores y malformaciones o falta de éstas.

La heterogeneidad que presentan los diversos síndromes de retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX), sean entidades bien caracterizadas o casos familiares no específicos puede ser mejor conocida mediante el mapeado genético con marcadores polimórficos de ADN en una región determinada del cromosoma X, al mismo tiempo que estos marcadores se pueden utilizar para realizar el diagnóstico de portadoras y el diagnóstico prenatal. Por otro lado, la aplicación de la estrategia de la genética inversa (Orkin, 1986) puede llevar a conocer el tipo de mutación y a la clonación del gen causante, tomando como punto de partida la región reconocida por el marcador genéticamente más cercano. El análisis citogenético, realizado con tinción convencional y la identificación de los cromosomas con un método de bandas G (Seabright, 1971), en algunos de estos pacientes muestran cariotipos diploides normales sin visualización del punto X-frágil en la banda Xq27.3. Los análisis cromosómicos en metafases obtenidas de linfocitos cultivados en medio TC-199 deficitario en ácido fólico no mostraron tampoco el marcador X-frágil, aun siendo este un método que facilita la expresividad de los sitios frágiles.

Tabla 6.- Cartografiado físico de los loci marcadores de ADN utilizados en la localización del síndrome dismórfico con RMLX. (Tomado de Prieto et al., 1990)

LOCUS	SONDA	LOCALIZACIÓN
DXS102	(cX38.1)	Xq26.2-q27.1
DXS106	(cpX203)	Xq12.1-q13.1
DXS115	(767)	Xq28
DXS148x	(cX5.7)x	Xp21.1
DXS16	(pSE3,2-L)	Xp22.3-p22.2
DXS255h	(M27B)h	Xp11.22
DXS269	(p20)	Xp21.3-p21.2
DXS278X	(CRI-S232)	Xp22.3
DXS28	(C7)	Xp21.3x
DXS305H	(St35-691)	Xq28
DXS43	(pD2)	Xp22.2
DXS84	(L754)	Xp21.1
DXS9	(RC8)	Xp22.3-p22.2
DXS9	(pXG-16)	Xpter-p11.21
DXS94	(pXG-12)	Xq22
MIC2	(p19B)	Xpter
OTC	(pHO731)	Xp21.1

6.- El futuro de la aplicación de genética molecular al estudio de los retratos mentales ligados al cromosoma X.

El hallazgo de la mutación causante de la enfermedad y de marcadores polimórficos de ADN estrechamente ligados permitirá un diagnóstico de portadoras heterocigotas y un consejo genético fundamentado en datos concretos y personales.

Por otro lado, la localización de los distintos loci que condicionan estas enfermedades a lo largo del cromosoma X y la detección de la mutación causante servirán para diferenciar o relacionar distintos síndromes con retraso mental ligado al cromosoma X, con o sin rasgos dismórficos, que en la actualidad sólo pueden definirse por su descripción clínica fenotípica. Es así seguro que algunos de ellos pueden deberse a diferentes mutaciones de un mismo gen. Su determinación definitiva, y todo lo que posteriormente ella conduce, será realizada por estudios de genética molecular; esto es especialmente importante para aquellos síndromes raros, con pocos miembros en la familia, a los que no es posible aplicar estrategias de ligamiento genético, por lo que la única posibilidad es valorar en ellos la presencia o ausencia de las mutaciones que se vayan describiendo en otros síndromes ya mapeados sobre el cromosoma X. En el caso de deficiencias mentales debidas a la presencia del síndrome X-frágil, el diagnóstico prenatal y una dieta rica en ácido fólico abren un camino de espera hasta la posible intervención por métodos de terapia génica.

REFERENCIAS

- ARVEILER B., ALEMBIK Y., HANAUER A., JACOBS P., TRANEBJAERG L., MIKKELSEN M., PUISSANT H., LARGET-PIET L. & MANDEL J.L. (1988). Linkage analysis suggest at least two loci for X-linked non-specific mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* **30**: 473-483.
- BARON-COHEN, S., LESLIE, A. & FRITH, U. (1985): Does the autistic child have a "theory of mind"? *Cognition.* **21**: 37-46.
- BROWN W.T. (1989). The fragile X syndrome. *Neurol. Clin.* **7-1**: 107-121.
- COSTRA B.A., MAJOUR-KRAKAUSESR D.F. & VAN HEMEL J.O. (1991). Mapping of a new RFLP marker RN1 (DXS359) close to the fragile site FRAXA on Xq27-q28. *Am. J. Med. Genet.* **38**: 332-335.
- CHRISTIAN J.C., DE MEYER W., FRANKEN E.A., HUFF J.S., KHAIRI S. & REED T. (1977). X-linked skeletal dysplasia with mental retardation. *Clin. Genet.* **11**: 128-136.
- DSM-III-R. (1988). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*. Barcelona: Masson.
- GUSTAVSON K.H., BLOMQUIST H. & HOLMGREN G. (1986). Prevalence of fragile-X syndrome in mentally retarded boys in a Swedish country. *Am. J. Med. Genet.* **35**: 381-583.
- HERBST D.S. & MILLER J.R. (1980). Nonspecific X-linked retardation: the frequency in Brithis Columbia. *Am. J. Med. Genet.* **7**: 461-470.
- HOBSON, R. & LEE, A. (1989): Emotion-Related and Abstract Concepts in Autistic People: Evidence From the British Picture Vocabulary Scale. *Journal of Autism and Developmental Disorders.* **4**: 601-623.
- HUPKES P.E., VAN OOST B.A. & PERDON L.F. (1989). New polimorfhic DNA marker (DXS369) close to the fragile site X-FRA. *Cytogenet. Cell. Genet.* **51**: 1016.
- JUBERG R.C. & MARSIDI I. (1980). A new form of X-linked mental retardation with growth retardation, deafness and microgenitalism. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 714-722.
- KANNER, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.* **2**: 217-250.

- LAIRD C.D. (1987). Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile-X syndrome of mental retardation. *Genetics*. **117**: 587-599.
- LESH M. & NYHAM W.L. (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* **36**: 561-570.
- LOTTER, V. (1966): Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social Psychiatry*. **1**: 124-137.
- LUBS H.A. (1969). A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **21**: 231-244.
- LUBS H.A. (1983). X-linked mental retardation and the marker X. In: *Principles and practice of medical genetics*. pp, 216-223. Edimburg. Churchill Livingstone.
- MARTIN J.P. & BELL J. (1943). A pedigree of mental defects showing sex linkage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **6**: 154-157.
- MATTEI M.J., MATTEI J.F., VIDAL I. & GIRAUD F. (1981). Expression in lymphocyte and fibroblast culture of the fragile X-chromosome: A new technical approach. *Hum. Gen.* **59**: 166-169.
- MCKUSICK V.A. (1991). *Mendelian inheritance in Man*. (9th ed.) , Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- NIEBUHR E. (1972). Localization of the deleted segment in the cri-du-chat syndrome. *Humangenetik*. **16**: 357-358.
- OBERLE I., ROUSSEAU F. & HEITZ D. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. **252**: 1097-1102.
- OPITZ J.M. & SUTHERLAND, G.R. (1984). Conference Report: int Workshop on the fragile X-linked mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* **17**: 5-94
- ORKIN S.H. (1986). Reverse genetic and human diseases. *Cell*. **47**: 845-850.
- PARTINGTON M.W., MULLEY J.C., SUTHERLAND G.R., HOCKEY A., THODE A. & TURNER G. (1988). X-linked mental retardation with dystonic movements of the hands. *Am. J. Med. Genet.* **30**: 251-262.
- PÁSARO E., MÉNDEZ J. & GOYANES V. (1991). *Determinaciones morfológicas en cromosomas X-frágil, de individuos con rasgos autistas*. En Actas de las XXVI Jornadas Luso-Españolas de Genética. **1**: 121.

- PATTERSON H.N., BELL M.V. & BLOONFIELD J. (1991). Genetic and physical mapping of a novel region close to the fragile X site on the human X chromosome. *Genomics*. **4**: 570-578.
- PEMBREY M.E., WINTER R.M. & DAVIES K.E. (1985). A premutation that generates a defect at crossing over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* **21**: 709-717.
- PRIETO F. (1974). *Identificación de las aberraciones cromosómicas por listado de bandas con el método de tripsina Giemsa*. Tesis doctoral. Valencia.
- PRIETO F., BADIA L., ABELEDO G., AMIGO V. & MARTY M.L. (1976). Niveles de deleción cromosómica en el síndrome de maullido de gato. *An. Esp. Pediat.* **9**: 3-6.
- PRIETO F., BADIA L., ORELLANA F., HERRANZ J., SANZ M., MONFORT A. & SAINZ C. (1975). Síndromes 4p- y 5p-. Su identificación por el estudio cromosómico. *Rev. Esp. Pediat.* **31**: 581-590.
- PRIETO F., BADIA L., MULAS F., MONFORT A. & MORA F. (1987). X-linked dysmorphic syndrome with mental retardation. *Clin. Genet.* **32**: 326-334.
- PROOPS R., MAYER M. & JACOBS P.A. (1983). A study of mental retardation in children in the Island of Hawaii. *Clin. Genet.* **28**: 81-96.
- RENPENNING H.J., GERRARD J.W., ZELESKI W.A. & TABATA T. (1962). Familial ax-linked mental retardation. *Canad. Med. Assoc. J.* **87**: 954-956.
- ROUSSOU F., VINCENT A., OBERLE I. & MANDEL J.L. (1990). New informative polymorphism at the DXS304 locus, a closed distal marker for the fragile X locus. *Hum. Genet.* **84**: 263-266.
- RUTTER, M. (1983): Cognitive deficits in the pathogenesis of autism. *Journal of Child Psychology and Psychiatry.* **24**: 513-531.
- SCHNUR R.E., LEDBETTER S.A. & LEDBETTER D.A. (1989). New polymorphism at the DXS90 locus and confirmation of its location proximal to FRAXA by in situ hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **44**: 248-254.
- SHAPIRO L.R. (1991). The fragile X syndrome: A peculiar pattern of inheritance. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1736-1738.
- SHAPIRO L.R. (1986). Prenatal diagnosis of the FRA (X) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **23**: 325-340.

- SHERMAN S.L., JACOBS P.A. & MORTON N.E. (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* **69**: 289-299.
- SHERMAN S.L., MORTON N.E. & JACOBS P.A. (1984). The marker (X) syndrome: A cytogenetic and analysis. *Ann. Hum. Genet.* **48**: 21-37.
- SOUTHERN E.M.C. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragmentes separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- SUTHERLAND G.R. (1977). Fragile sites on human chromosomes: Demostration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science.* **197**: 265-266.
- SUTHERLAND G.R., MULLEY J.C. (1990). Diagnostic molecular genetics of the fragile X. *Clin. Genet.* **37**: 2-11.
- SUTHERLAND G.R. (1984). Fragile site expression: cytogenetic aspects X LMR. *Conference Report.*
- SUTHERLAND G.R., GEDEON A. & KARNMAN L. (1991). Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N. Engi. J. Med.* **325**: 1720-1722.
- SUTHERS G.K., HYLAND V.J. & CALLEN D.F. (1990). Physical mapping of new DNA probes near the fragile X mutation (FRAXA) by using a panel of cell lines. *Am. J. Hum. Genet.* **47**: 187-195.
- SUTHERS G.K., CALLEN D.F. & HYLAND V.F. (1989). A new marker tightly linked to the fragile X locus (FRAXA). *Sciencie.* **246**: 1298-1299.
- SUTHERS G.K., MULEY J.C. & VOELCKEL M.A. (1991). Genetic mapping new DNA probes at Xq27 defines a strategy for DNA studies in the fragile X syndrome. *A. J. Hum. Genet.* **48**: 460-467.
- VERKERK A.J., PIERETTI M. & SUTCLIFFE J.S. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* **85**: 905-914.
- WEBB T.P., BUNDEY S.E. & THAKE A. (1986). Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **23**: 573-580.
- YU S., PRIRCHARD M. & KREMER E. (1991). Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* **252**: 1179-1181.