

EL SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÁGIL^d

Dres. Martín Roubicek*, Enrique F. Tapia**, María C. Arriazu***, Pablo González Aguilar***.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de la «fragilidad del X», también llamado Síndrome de Martin y Bell, de Lubs, o síndrome FRAXA, es la forma heredada más frecuente de retardo mental en humanos. Tiene una frecuencia poblacional de 0,25% o mayor en los varones y algo menor en las mujeres, en quienes la intensidad de las manifestaciones también es menor. Como su denominación lo indica, se lo halló vinculado a una alteración particular en el cromosoma X que sugiere una fragilidad o susceptibilidad a roturas. Dada su frecuencia, y ciertas dificultades en el diagnóstico, creemos adecuado presentar una breve revisión del tema, dirigida en particular a los médicos clínicos, pediatras, psiquiatras y los especialistas en medicina familiar.

Este síndrome se presta admirablemente para ilustrar cómo se pudo ir desarrollando, a lo largo de un lapso de 50 años, el conocimiento de una afección humana, pasando desde la descripción clínica, a un análisis genealógico, al estudio citogenético y finalmente al molecular. Estos descubrimientos quizás podrán, eventualmente, conducir a un tratamiento adecuado.

Martin y Bell describieron en 1943 un cuadro de retardo mental familiar en varones, conectados en las genealogías con mujeres habitualmente no afectadas¹. Años después, Escalante *et al.* en Brasil², Turner *et al.* en Australia^{3,4}, Cantú *et al.* en Méjico⁵ y otros autores describieron un cuadro similar, añadiendo la observación de macroorquidismo en los varones afectados. Previamente, en 1969, Lubs⁶ publicó la observación, en una familia con un síndrome de retardo mental familiar, de un «cromosoma X marcador» en los varones retardados. Se trataba de una constricción o pérdida de coloración en la porción casi terminal del brazo largo del cromosoma X, por lo cual lo denominó «fragilidad del X» (fig. 1). Con las técnicas de «bando» que fueron desarrolladas en los años siguientes, esta zona se denominaría Xq27.3; pero hasta 1977 nadie había descrito otro hallazgo similar. En ese año, Sutherland⁷ reestudió una familia vista por él previamente, y comprobó que la muesca del X había desaparecido. Al no encontrar una explicación, probó con diversas condiciones de cultivo, hasta que descubrió que el factor determinante de la «fragilidad» era la ausencia o la baja concentración del ácido fólico en el medio de cultivo que se usaba hasta 1970 y se elevó a partir de entonces para obtener mejores resultados.

La publicación de Sutherland dio origen a una

profusión de investigaciones que a partir de entonces se desarrollaron en todo el mundo, y no dan muestras de disminuir hasta hoy. En 1991 se publicaron los primeros trabajos⁸ sobre la alteración molecular que acompaña al síndrome y desde entonces se avanzó mucho, aunque todavía no se conoce la función precisa de la proteína FMRP que está deficiente en las personas afectadas.

Desarrollaremos el tema de acuerdo con el orden en que fueron revelándose sus diversos aspectos.

CLÍNICA

La manifestación característica es un retardo mental de grado moderado a severo en un varón; el grado de éste puede variar entre un CI de 30 y 60 aunque hay casos infrecuentes con rango «fronterizo». Se menciona además un pobre contacto visual, autismo, palabra escandida o repetitiva, problemas de atención e hiperquinesia.

Las otras manifestaciones habituales son el macroorquidismo, que se puede observar a partir de los 6 años pero es casi constante desde los 12 años. Para su determinación se recomienda el uso del orquidómetro de Prader, o bien la medición con un calibre, de la longitud (L) y diámetro transversal (D) de cada testículo, aplicando para el cálculo de su volumen la fórmula de $p/3 \times L \times D^2$.

Otros rasgos incluyen macrocefalia, orejas grandes, epicanto, malimplantación dental, prognatismo (postpuberal) y más raramente nistagmo, epilepsia, miopía, cifoescoliosis, prolapso mitral. Varios de los rasgos pueden sugerir el diagnóstico de síndrome de Sotos (gigantismo cerebral) pero éste tiene algunas características distintivas: edad ósea avanzada, dilatación de ventrículos cerebrales, ocasional herencia de tipo autosómico dominante y ausencia de macroorquidismo.

En las mujeres portadoras de la alteración el cuadro clínico es más leve o ausente, consistiendo fundamentalmente en retardo mental leve a moderado o problemas de aprendizaje, en cerca de un 50% de ellas. Otros hallazgos mencionados son la hiperextensibilidad de los dedos, la autoagresión y la timidez⁹.

Se ha propuesto utilizar sistemas de puntaje o *screening* clínico. Con uno de tales métodos aplicado en Australia a 1200 personas de escuelas especiales o instituciones para retardados, y con una prevalencia de 9% de varones y 2% de mujeres presentando el X frágil, un puntaje de 1 o más dio una sensibilidad de 0,96 y uno de 8 a 10 dio una especificidad de 0,98¹⁰. Un sistema similar que incluye 16 ítems es utilizado en el Hospital Garrahan de Buenos Aires¹¹. En los países donde los estudios moleculares son más acce-

*Servicios de Endocrinología y de Genética,

**Servicios de Clínica Médica y Laboratorio de Citogenética

***Servicio de Pediatría

Hospital Privado de Comunidad. Córdoba 4545 (7600) Mar del Plata

^dPresentado en parte en la reunión clínica del Hospital Privado de Comunidad el 27 de noviembre de 1998.

sibles, se ha dejado de lado el uso de estos puntajes, pero en nuestro entorno siguen siendo útiles para seleccionar aquellos casos que deberían ser estudiados con estos métodos más costosos.

En un estudio pediátrico de 273 varones y 62 niñas referidos por sospecha de tener el síndrome con 12 casos positivos, los autores identificaron como el mejor indicador clínico del mismo las orejas grandes o prominentes; la hiperactividad, el déficit de atención y las alteraciones de conducta también fueron frecuentes, pero el macroorquidismo no fue buen indicador en los varones menores de 8 años¹².

CITOGENÉTICA

El hallazgo de Lubs⁶ de una constricción en el extremo del brazo largo del cromosoma X en 1969, confirmado luego por Sutherland⁷ y muchos otros, se denomina «sitio frágil», ya que sugiere una propensión a sufrir roturas y rearrreglos cromosómicos a ese nivel. Existen numerosos sitios frágiles conocidos y se los denomina según la posición que ocupan en el cromosoma (por ejemplo Xq27.3; 16q23), o con letras de acuerdo con el orden en que se van describiendo, por ej. en el cromosoma X: FRAXA, FRAXB hasta FRAXF. Los que se han relacionado con retardo mental son el A y el E; éste último se localiza algo más distal que el A, en Xq28, y se asocia, aunque no siempre, con un retardo leve. Su frecuencia es de 1/50.000 varones. Son varias las técnicas para evidenciar los sitios frágiles,

1. Usar medio de cultivo TC-199, pobre en folato.
2. Usar suero fetal bovino al 5% en vez del habitual 20% (menos folato).
3. Prolongar los cultivos a 96 hs en lugar de las 72 hs habituales (disminuye el folato por consumo).
4. Inhibición de la dehidrofolato reductasa con metotrexato (MTX)¹³.
5. Inhibición de la timidilato sintetasa c/fluorodesoxiuridina (FdU)¹⁴.
6. Inhibición de la ribonucleótido sintetasa con exceso de timidina¹⁵.

Dado que el uso de estas técnicas disminuye el índice mitótico, y que se requiere estudiar entre 50 y 200 metafases, sólo se recurre a tres o cuatro de ellas en cada caso. En nuestro laboratorio se aplican los métodos 1, 2, 3 y 5.

¿Cuándo se considera positivo un resultado? Según algunos, cuando hay un 4% o más de metafases con el sitio frágil¹⁶, para otros basta con un 3% o aún menos. En realidad, lo importante es que haya un clon: por lo menos dos células con sitio frágil, independientemente que se hayan estudiado 50 células o más, y siempre que esas metafases hayan sido coloreadas con los métodos de «bando» para confirmar que el sitio se halla en la banda Xq27. Hay otros sitios frágiles que podrían confundirse con el FRAXA: el FRAXE y los Fra 6q26 y Fra 10q23 cuyos cromosomas son similares al X pero se pueden distinguir con métodos

de bando (el FRAXE requiere un bando de buena calidad para distinguirlo del FRAXA).

A partir de 1990 se comenzó a usar los métodos moleculares, por considerárselos más rápidos y confiables. Sin embargo, algunos estudios indican que esto no siempre es así. Wang¹⁷ estudió 525 casos con retardo mental: 13 con sitio frágil en X de los cuales 12 tenían análisis molecular positivo para FRAXA y uno no (falso positivo citogenéticamente) - este caso resultó ser uno de FRAXE. En nuestro Hospital tuvimos también un caso similar. De los 512 casos con citogenética negativa, 2 tuvieron el estudio molecular positivo: uno fue una «premutación» (ver sección siguiente) en los que no suele hallarse el sitio frágil, y el otro fue un verdadero falso negativo citogenético. Pero además, este estudio mostró 18 casos (3,4%) con otras alteraciones cromosómicas que no se hubiesen detectado con el estudio molecular.

Como conclusión se puede afirmar que ambas técnicas, la citogenética y la molecular, tienen su utilidad. La segunda es probablemente más sensible, pero la primera resulta imprescindible para detectar la presencia de otras anomalías cromosómicas.

ASPECTOS MOLECULARES

A partir de 1991 se fueron reconociendo las alteraciones moleculares subyacentes a la anomalía citogenética. Primero se halló una amplificación de una secuencia de un triplete, CGG (citosina-guanina-guanina)⁸, que normalmente se encuentra repetida hasta unas 50 veces, y que en los varones afectados se repite 200 veces o más («mutación»), aunque también puede hallarse entre 50 y 200 veces («premutación»). Las mujeres con premutación no tienen ninguna expresión fenotípica, excepto posible falla ovárica prematura⁹; las portadoras de mutación plena pueden presentar algunas manifestaciones del síndrome, como ya se ha mencionado. Se comprobó también que próximo al sitio de la secuencia repetida CGG existe una secuencia de citosina-guanina que se denominó «isla de CpG» y que en los individuos afectados está casi siempre «metilada» (las citosinas suelen fijar un grupo metilo); en cambio en las personas normales, y en los varones portadores de la mutación pero que no tienen ni el fenotipo ni el sitio frágil (varones «transmisores normales»), la «isla» no está metilada. Lo peculiar de este fenómeno de «amplificación» de las repciones CGG es que al ser transmitidas de padres a hijos, tiende a aumentar el número de repeticiones, tanto más así cuanto más amplificada estaba. Más raramente puede haber una reducción del número de repeticiones. A esto se lo llama un estado de «inestabilidad cromosómica».

Ninguna de las dos secuencias, la CGG amplificada o la «isla», son el propio gen que está afectado en el síndrome. Este se denomina *FMR-1* y está ubicada a corta distancia de aquéllas (fig. 1).

Hay diversas teorías que tratan de interpretar cómo

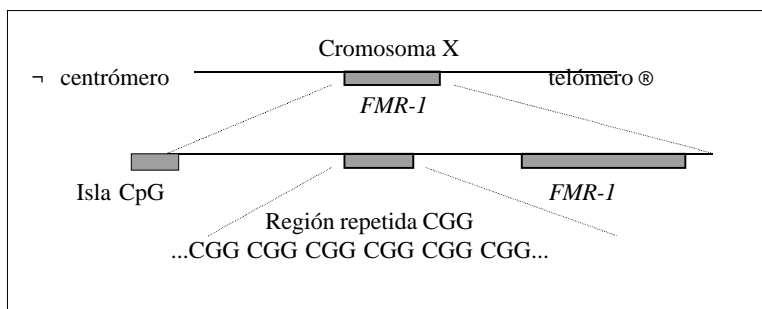


Figura 1. Esquema de la estructura fina de la región cromosómica Xq27.3

estas amplificaciones se relacionan con la metilación de la «isla», y cómo esto a su vez altera el funcionamiento del gen *FMR-1*. Este gen está activo en muchos tejidos, entre los más importantes en el tejido nervioso central y en el testículo. Su producto proteico se llamó proteína FMRP y se le atribuyen acciones relacionadas con las sinapsis interneuronales y/o con transporte de sustancias entre núcleo y citoplasma, aunque la función exacta aun no está aclarada. De todas maneras, la amplificación del triplete CGG y/o la metilación de la «isla CpG» están íntimamente relacionadas con la función alterada de esta proteína, con la expresión fenotípica y con el sitio frágil.

Los métodos de diagnóstico molecular utilizan variadas técnicas (Southern blot, PCR) según si se desea sólo confirmar la presencia de mutación o premutación, o se quiere precisar el número de repeticiones del triplete, la presencia de metilaciones, la alteración del gen *FMR-1* o la presencia alterada de la proteína FMRP¹⁸⁻²⁰ (fig. 2 y tabla 1). Incluso existe un método aplicable a estudios poblacionales, en células descamadas de la mucosa bucal²¹.

EPIDEMIOLOGIA y HERENCIA

El síndrome sigue en general los patrones de la herencia ligada al X recesiva, o más correctamente semidominante, ya que las mujeres portadoras de la mutación tienen una expresión fenotípica anormal en la mitad de los casos aproximadamente; además

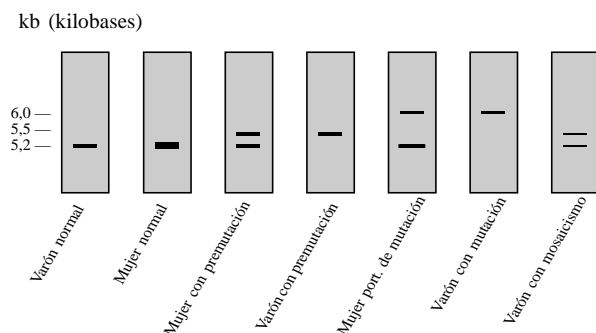


Figura 2. Gráfico esquemático bandas normales y anormales en el análisis molecular con el método de Southern, utilizando la enzima de restricción *EcoRI*:

presenta el fenómeno de la amplificación, lo cual conduce a una mayor gravedad en generaciones sucesivas. Existen otras enfermedades hereditarias que presentan amplificaciones de repeticiones de tripletes, todas ellas relacionadas con enfermedades neuromusculares, aunque no con sitios frágiles. Ejemplos son la distrofia miotónica de Steinert, la corea de Huntington y varias ataxias cerebelosas.

En la tabla 2 se indican algunos datos de frecuencias y riesgos poblacionales.

EXPERIENCIA EN ADOLESCENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL

Exponemos a continuación algunos datos de la Sección de Adolescencia de nuestro hospital, en personas a quienes se diagnosticó el síndrome del X frágil en los últimos 10 años. Se trata de 9 adolescentes (7 varones y 2 mujeres) entre 11 y 18 años de edad, estudiados por presentar retardo mental y/o macroorquidismo u otros rasgos fenotípicos (tabla 3).

COMENTARIOS Y SUGERENCIAS

- El síndrome puede sospecharse en el consultorio si

Tabla 1. Algunos datos moleculares

| | | |
|--|-------------|--------|
| Ventajas del Southern blot: permite determinar metilación usando doble digestión | | |
| Ventajas de la PCR: rápida, permite determinar número de repeticiones CGG | | |
| Número de repeticiones CGG | Normal | 6-54 |
| | Premutación | 60-230 |
| | Mutación | >230 |

Falsos negativos en estudios moleculares:

- Delección del gen *FMR-1* (en vez de su inhibición por expansión de triplete)
- Mujer con una banda "embarrada" (*smear*) inaparente además de las bandas normales

Frecuencia estimada de expansión de premutación a mutación²²

| Nº de repeticiones de tripletes CGG | Probabilidad de expansión de premutación a mutación | Prevalencia de premutación /10 ⁵ mujeres | Nº estimado de mutaciones/10 ⁵ nacim. |
|-------------------------------------|---|---|--|
| 55 - 71 | | 10 % | 301 (78%) |
| 72 - 88 | | 56 % | 66 (17%) |
| 89 - 105 | 90 % | 19 (5%) | 8 |
| Total | | 386 | 42 |

Tabla 2. Resumen de datos epidemiológicos

| | VARONES | MUJERES |
|---|---------------------|-----------------|
| Frec. síndrome clínico ²³ | ~1/4000 (0,25%) | ~1/8000 (0,12%) |
| Frec. personas con mutación | ~1/2000 (0,5%) | ~1/2500 (0,4%) |
| Frec. personas con premutación | ~1/500 (2%) | ~1/250 (4%) |
| % de células fraXq27.3 positivas en portadores de mutación completa | 4 - 70% | > 2% |
| % de células positivas en portadores de premutación (o normales) | 0 - 3% | 0 - 2% |
| R. retardo mental si hay mutación | 80-100% (mosaicos!) | 30-55% |
| R. retardo mental si hay premutación | 0 - 3% | 0% |
| R. RM p/hijos de portadora <u>con</u> | RM 50% | 28% |
| R. RM p/hijos de portadora <u>sin</u> | RM 38% | 16% |
| R. RM p/hijos de varón port.sano | 0% | 0% |
| R. de ser port. sano para hijos de port. sano | | 0% |

R. de RM para nietos de varón port. sano 74% aprox.
aprox.

R= riesgo Frec = frecuencia

Tabla 3. Datos fenotípicos y citogenéticos de 9 adolescentes con síndrome FRAXA

| Nº | Sexo | Edad al diag. | Macro- Retraso mental | | Citogenética |
|----|------|---------------|-----------------------|---------------------|-----------------|
| | | | orquid. | No Leve Moder Sever | |
| 1 | M | 17 | NO | X | 20 |
| 2 | M | 16,6 | SI | X | 6 |
| 3 | F | 15,5 | - | X | 10 |
| 4 | M | 17,1 | SI | X | 4 (+ trirradio) |
| 5 | M | 18,1 | NO | X | 20 |
| 6 | F | 11,2 | - | X | 18 |
| 7 | M | 14,1 | SI? | X | 14 |
| 8 | M | 17 | SI | X | 4 |
| 9 | M | 16,1 | SI | X | 5 |

- se tienen en cuenta las diferentes formas de presentación. Debe ser incluido en el diagnóstico diferencial de varones, e incluso mujeres, con retraso mental
- Debe sospecharse el síndrome en adolescentes y adultos con macroorquidismo aún en ausencia de retraso mental
- Se destaca la utilidad de la orquidometría sistemática

- ca en adolescentes
- El diagnóstico permite el correcto asesoramiento genético y la averiguación de posibles portadoras sanas entre los familiares

ENFOQUE DIAGNOSTICO

Frente a un niño con retraso mental moderado o severo, o de una niña con retraso leve, con o sin algu-

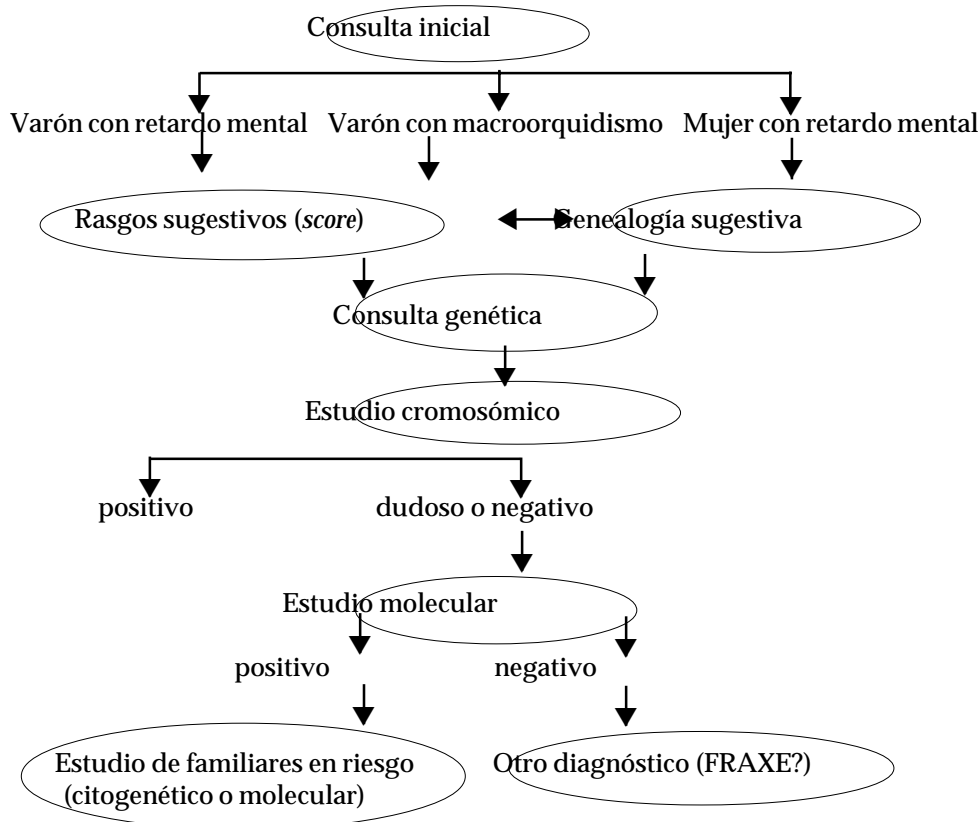


Figura 3. Algoritmo diagnóstico para X frágil

nos de los rasgos característicos del síndrome (macroorquidismo en el varón, macrocefalia, orejas grandes) y especialmente si hay una genealogía sugestiva de presencia de otros casos de (varones) retardados, conectados por mujeres normales, se plantea la conveniencia de pedir un estudio confirmatorio. Para ello es importante saber si se dispone de un servicio de genética, de citogenética y de genética molecular.

En nuestro Hospital disponemos de los primeros dos y para el tercero se dispone de varios Centros de referencia en Buenos Aires. Para una conducta diagnóstica satisfactoria en estas circunstancias, proponemos un algoritmo (fig. 3). Dejamos claro que en otras situaciones y de acuerdo con desarrollos futuros en la materia, estas indicaciones podrán requerir

BIBLIOGRAFIA

- Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatr* 1943;6:154-7
- Escalante JA, Grunspun H, Frota-Pessoa O. Severe sex-linked mental retardation. *J Génét Hum* 1971;19:137-40
- Turner G, Eastman C, Casey J, McLeay A, Procopis P, Turner B. X-linked mental retardation associated with macroorchidism. *J Med Genet* 1975;12:367-71
- Turner G, Gill R, Daniel A. Marker-X chromosomes, mental retardation and macro-orchidism. *N Engl J Med* 1978;299:1472
- Cantú JM, Scaglia HE, Medina M, González-Diddi M, Morato T, Moreno ME et al. Inherited congenital normofunctional testicular hyperplasia and mental deficiency. *Hum Genet* 1976;33:23-33
- Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 1969;21:231-4
- Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence of the type of tissue culture medium. *Science* 1997;197:265-6
- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-19.
- Cronister A, Schreiner R, Wittenberger M, Amiri K, Harris K, Hagerman RJ. Heterozygous fragile X females: historical, physical, cognitive and cytogenetic features. *Am J Med Genet* 1991;38:269-74
- Laing S, Partington M, Robinson H, Turner G. Clinical screening score for the fragile X (Martin-Bell) syndrome. *Am J Med Genet* 1991;38:256-9
- Torrado MV, Chertkoff L, Herrera J, Bin L, Barreiro C, Tenenbaum S. Validación de un puntaje clínico para la detección del Síndrome de sitio frágil del X. *Arch Arg Pediatr* 1996;94:145-54
- Giangreco CA, Steele MW, Aston CE, Cummins JH, Wenger SL. A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J Pediatr* 1996;129:611-4
- Jacky PB, Ahuja YR, Anyane-Yebo K, Breg WR, Carpenter NJ, Froster-Iskenius UG et al. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. *Am J Med Genet* 1991;38:400-3
- Tommerup N, Poulsen H, Nielsen KB. 5-fluoro-2'-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet* 1981;18:374-6
- Sutherland GR, Baker E, Fratini A. Excess thymidine induces folate-sensitive fragile sites. *Am J Med Genet* 1985;22:433-43
- Jacobs PA. X-linked mental retardation: a study of seven families. *Am J MedGenet* 1980;7:471-4
- Wang Q, Green E, Barnicoat A, Garrett D, Mullarkey M, Bobrow M et al. Cytogenetics versus DNA diagnosis in routine referrals for fragile X syndrome. *Lancet* 1993;342:1025-6
- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz J, Boué J et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Eng J Med* 1991;325:1673-81
- Arberas C, Labonia N, Ruggieri V, Tello AM, Chamoles N, Brown WT. Diagnóstico del síndrome de X-frágil (Martin-Bell): estudio citogenético versus técnicas de biología molecular. *Arch Arg Pediatr* 1994;92:359-66
- Bañares VG. Ultimos avances en el síndrome de fragilidad del cromosoma X. *Medicina (Buenos Aires)* 1995; 55:457-66
- Meadows KL, Pettay D, Newman J, Hersey J, Ashley AE, Sherman SL. Survey of the fragile X syndrome and the fragile X E syndrome in a special education needs population. *Am J Med Genet* 1996;64:425-33
- Rousseau F, Rouillard P, Morel M-L, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR-1 gene - and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;57:1006-18
- Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Pettay DL, Gold LB et al. Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population. *Am J Med Genet* 1999;64:495-507



Ageratum houstonianum, en un jardín de Cricklewood, Londres.

Foto Dr. L. D. Iacuzzi