

Metodologías innovadoras en el diagnóstico molecular del Síndrome de Fragilidad del cromosoma X

MANLAB[®]

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

 9 min.



El síndrome del cromosoma Xfrágil (FXS) es la causa más frecuente de retraso mental hereditario. Este desorden es usualmente causado por la ausencia de la proteína FMR1. En el presente trabajo el Área de Medicina Genómica de Laboratorios MANLAB describen una nueva metodología que permite medir de forma precisa e identificar los alelos con mutación completa. La utilización de esta tecnología estanda-

rizada y validada para uso en diagnóstico *in vitro* (IVD) permite llegar a un diagnóstico acertado y confiable en un tiempo menor que los requeridos por las técnicas tradicionalmente utilizadas.



Lic. Ignacio J. Chiesa¹,
Dra. María Silvia Pérez².

¹ Licenciado en Ciencias Biológicas UBA. Biólogo Molecular Área Medicina Genómica-MANLAB.

² Bioquímica UNLP. Dra. Biología Molecular UBA. Jefa del Área Medicina Genómica-MANLAB.



Email:
ignacio.chiesa@manlab.com.ar



El síndrome del cromosoma X frágil (FXS, *Fragile X Syndrome*), es la causa

BD Vacutainer[®] Líder en Soluciones Preanalíticas

La familia de productos **BD Microtainer**[®] ofrece soluciones para la toma de muestra capilar.

Para contactarse, llámenos al:
0800-444-55BD (23) o escribanos
a: vacutainer@bd.com



más frecuente de retraso mental hereditario (1), que afecta aproximadamente a 1 de 4000 hombres y 1 entre 5000 y 8000 mujeres. Este desorden es usualmente causado por la ausencia de la proteína FMR1. Se hereda como un trastorno mendeliano de tipo dominante ligado al cromosoma X. Presenta además, una penetrancia incompleta (80% para varones y 30% para las mujeres).

FXS es causado por la expansión de la secuencia repetitiva del triplete citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5' no codificante del gen *FMR1* (retraso mental X frágil 1) (2). Los pacientes con FXS poseen un número mayor a 200 repeticiones del triplete. Como resultado de la expansión, la secuencia repetitiva CGG y la región cercana al promotor del gen *FMR1* sufre una metilación inhibiendo la transcripción de la proteína y causando la ausencia de la misma. La distribución subcelular de la proteína FMR1 es en gran parte citoplasmática y su expresión es generalizada pero abundante en neuronas, particularmente en las dendritas. La función fisiológica de la proteína FMR1 aún no está bien definida, sin embargo, distintas investigaciones realizadas sugieren que cumple un rol en el transporte y/o traducción de los ARNm(3).

La evaluación del riesgo y la interpretación clínica del FXS y de los trastornos relacionados se determinan por el número de repeticiones CGG y por el estado de metilación del gen. Según el número de repeticiones CGG se distinguen cuatro tipos de alelos: alelos no afectados o normales, alelos intermedios (también llamados "zona gris"), alelos con premutación y alelos con mutación completa (Figura 1).

En el caso de los alelos con premutación, el riesgo de expansión a una mutación completa aumenta con el tamaño. Por encima de 100 repeticiones, existe un riesgo sistemático de expansión en la siguiente generación.

Muchos alelos del *FMR1* contienen secuencias AGG que se intercalan entre las repeticiones CGG. Se piensa que las "interrupciones" AGG confieren estabilidad al ADN y reducen el riesgo de expansión en la siguiente generación (6).

Dentro de los individuos con mutación completa se han encontrado algunos con mosaicismos de repeticiones de diferentes tamaños en distintas poblaciones celulares. El mosaicismo se observa como un chorreado en el rango de mutación completa en un *Southern blot*. También se han reportado casos de mosaicismo de tamaño con alelos premutados y con mutación completa. El rol del mosaicismo en la clínica del paciente aún no está claro (7).

Actualmente, la mayoría de las pruebas de diagnóstico molecular de FXS se basan en la PCR y posterior separación por tamaño mediante electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel de agarosa (AGE), o gel de poliacrilamida (PAGE) para detección de hasta 100-150 repeticiones CGG. El análisis de transferencia (*southern blot*) se utiliza para caracterizar muestras con un número demasiado grande de repeticiones CGG como para amplificarlas por PCR, y para determinar el estado de metilación del gen.

Realizar un *southern blot* es costoso, se necesita tiempo, mano de obra in-

terveniente y requiere grandes cantidades de ADN genómico (gDNA), lo cual dificulta el análisis de una gran cantidad de muestras o de estudios poblacionales. La técnica PCR tiene el potencial para hacer frente a cada una de estas limitaciones, sin embargo, el carácter de la secuencia repetitiva altamente rica en GC de la región del gen ha dificultado históricamente la amplificación. Se han realizado innovaciones a la PCR, como el uso de adyuvantes osmolíticos, nucleótidos modificados, y condiciones específicas de ciclo que han mejorado la detección de hasta aproximadamente 300-500 repeticiones CGG, sin embargo aún esta técnica podría no detectar la mayoría de los alelos que tengan una mutación completa. Es importante destacar que el análisis por PCR de las muestras premutadas y con mutación completa de pacientes femeninos es incluso más problemática porque ocurre una amplificación preferencial de los alelos más pequeños(8). En consecuencia, más del 20% de las muestras de mujeres que son homocigotas deben estudiarse por *southern blot* para resolver la potencial ambigüedad de un alelo expandido no amplificado.

Se ha descrito una nueva metodología que permite resolver muchos de los desafíos tecnológicos que en la actualidad limitan la rutina de estudio de la fragilidad del cromosoma X. La misma se basa en una reacción de PCR con tres *primers*, uno que pega en la zona de repetición CGG (primer repetido CGG), y dos *primers* específicos, a partir de ADN genómico purificado y medición de fragmentos en una plataforma validada de electroforesis capilar. Esto permite medir de forma precisa los alelos de hasta 200 CGG, así como identificar los alelos con mutación completa con más de 200 CGG y detectar un perfil de picos característico que resuelve la cigosidad en muestras de mujeres y la presencia de la secuencia AGG intercalada.

La PCR con *primers* repetidos CGG se diferencia de la PCR específica por la adición de un tercer *primer* que es complementario a la región de repeticiones del triplete en el gen *FMR1*. El electroferograma resultante incluye los productos de PCR de longitud completa generados a partir de los *primers* específicos que abarcan la región de repeticiones CGG y los picos de repeticiones CGG obtenidos por la PCR con *primers* repetidos CGG (Figura 2).



Figura 1: Relación entre las longitudes de las repeticiones CGG y los fenotipo correspondientes (FXTAS: síndrome de temblor/ ataxia asociado al X frágil. FXPOI: insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil) (Extraída del manual del kit: Asuragen Kit AmplideXTMFMR1 PCR) (5).

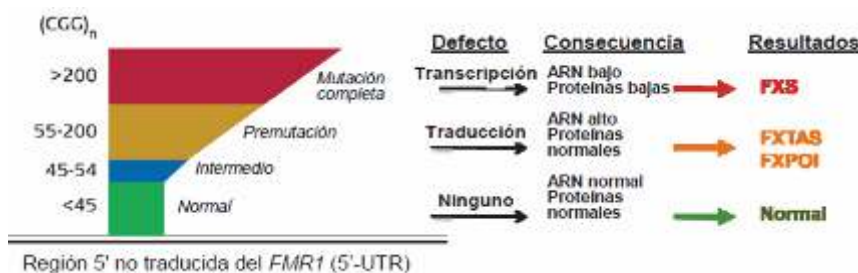
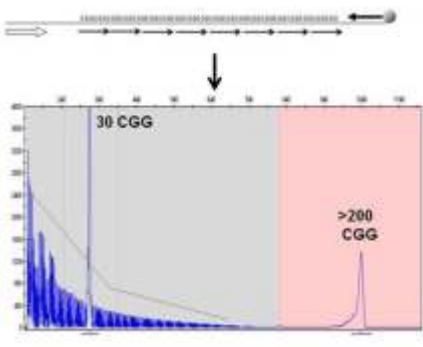




Figura 2: Metodología de PCR para *FMR1* con *primers* específicos y repetidos (Extraída del manual del kit: Asuragen Kit Amplidex™ *FMR1* PCR) (4).



Por encima de 200 CGG, el tamaño del producto de la PCR supera el umbral de resolución del gel polímero POP-7. Los fragmentos de PCR que superan este umbral tienen un índice de migración equivalente independiente del tamaño del producto. De este modo, los productos de PCR del *FMR1* que superan 200 CGG se identifican en la categoría >200 CGG.

La tecnología descrita permite amplificar de forma reproducible mutaciones completas en muestras de pacientes masculinos y femeninos, incluyendo alelos de hasta por lo menos 1300 repeticiones CGG. También permite detectar mosaicismos de alelos con premutación y con mutación completa.

Por lo tanto, esta tecnología resuelve muchos de los problemas clave que históricamente limitaron la utilidad de la PCR para *FMR1* y como consecuencia reducir en gran medida el número de muestras que deben ser estudiadas por *Southern blot*.

Actualmente, muchos laboratorios procesan las muestras clínicas por PCR y las muestras "sospechosas" por *Southern blot*. Las muestras "sospechosas" pueden incluir muestras de hombres que fallaron al amplificarse por PCR y muestras de mujeres en las que se obtiene sólo un producto de PCR. En el último caso, muestras homocigotas que representan más del 20% de todas las muestras de mujeres, no pueden distinguirse de las heterocigotas en las cuales no se pudo amplificar un alelo mutado debido a su extensión. La capacidad de estos nuevos reactivos sugiere que solamente las muestras sobre las cuales se requiera información sobre el estado de metilación del ADN necesitarían ser estudiadas mediante la técnica de *Southern blot* que generalmente son menos del 2% de las muestras procesadas por laboratorios clínicos de referencia (9).

De este modo la utilización de esta tecnología estandarizada y validada para uso en diagnóstico *in vitro* (IVD) hoy disponible en los laboratorios de Medicina Genómica permite llegar a un diagnóstico acertado y confiable en un tiempo menor que los requeridos por las técnicas tradicionalmente utilizadas.

Los avances tecnológicos en el área de diagnóstico genético acortan tiempos y aumentan la exactitud de los diagnósticos moleculares en patologías con alteraciones genéticas.



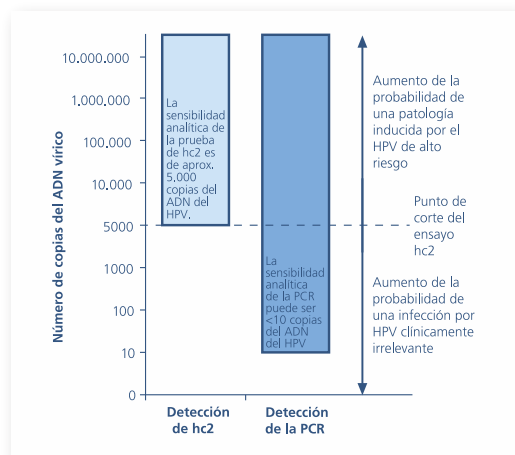
Bibliografía

1. Rousseau F, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325:1673-81.
2. Fu YH, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991;67:1047-58.
3. Oostra, B.A. et al. A fragile balance: *FMR1* expression levels. *Hum Mol Genet*, 2003; 12 (2):249-57.
4. Filipovic-Sadic S, et al. A novel *FMR1* PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem*, 2010; 56(3): 399-408.
5. Asuragen. Kit Amplidex™ *FMR1* PCR. Instrucciones de uso.
6. Eichler EE, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the *FMR1* gene. *Nat Genet*, 1994;8(1): 88-94.
7. Juusola JS, et al. Performance evaluation of two methods using commercially available reagents for PCR-based detection of *FMR1* mutation. *J Mol Diagn*, 2012; 14:476-86.
8. Saluto A, et al. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *J Mol Diagn*, 2005;7:605-12.
9. Strom CM, et al. Molecular testing for fragile X syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory. *Genet Med*, 2007; 9:46-51.



hc2DigeneHPVTest

tecnolab



Prueba del HPV por Captura Híbrida de DNA The *digene* HPV Test

- **Gold Standard: HPV testing**
- **Cut off validado. Sensibilidad Clínica correlacionada con enfermedad**
- **Validación Clínica. Múltiples estudios clínicos y Guías de Consenso Internacionales**
- **Alto Valor Predictivo Negativo (VPN), Frente a un HPV testing negativo, protección probada a 5 años**
- **Target de detección. Genoma Completo (menor riesgo de falso negativo)**
- **Sin falsos negativos en muestras con sangre. Tecnología no inhibida por la presencia de Hemoglobina**
- **Estudios de buena performance con autotoma. Posibilidad de mayor cobertura de población objeto**
- **No requiere condiciones especiales de instalación ni flujo unidireccional**