

ESTANDARIZACIÓN DEL GENOTIPADO DE LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN *FMRI* PARA
EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SÍNDROME DE X FRÁGIL, EN PACIENTES CON
AUTISMO EN BUCARAMANGA, COLOMBIA

VALENTINA HERNÁNDEZ ESPINOSA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA

2017

ESTANDARIZACIÓN DEL GENOTIPADO DE LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN *FMRI* PARA
EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SÍNDROME DE X FRÁGIL, EN PACIENTES CON
AUTISMO EN BUCARAMANGA, COLOMBIA

VALENTINA HERNÁNDEZ ESPINOSA

Para optar al título de Bióloga

DIRECTORA

CLARA INÉS VARGAS CASTELLANOS

Médico, MSc

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2017

DEDICATORIA

A mamá y papá,
que han estado siempre dispuestos a dejarme hacer lo que me apasiona,
compartiendo esa felicidad conmigo.

A mi cielo,
quien me alienta a enfrentar cada día y me pone los pies en la tierra.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María y Álvaro, quienes han hecho de mí una gran persona siempre llena de retos. Son ellos los responsables de la meta que hoy alcanzó, gracias por todo el apoyo, el amor y la dedicación.

A mi novio, Camilo, por sus palabras de apoyo, por las enseñanzas para la vida y por la compañía a lo largo de este camino.

A mis amigos Juan, Andreita, Nataly, Daniel, por cada risa y alegría compartida y por enseñarme a ver la biología de muchas formas.

A Nathalia y Mary, quienes hicieron de esta aventura una muy alegre.

A mis queridos docentes y ejemplos a seguir, la Doctora Clara Inés Vargas Castellanos y el Doctor Fernando Rondón González, para quienes tengo un gran afecto.

A cada una de las personas que hacen parte del grupo de investigación de Genética Humana-UIS, especialmente a las docentes Viviana Lucia Pérez y Adriana Lucía Pico Romero, quienes me acogieron, enseñaron y guiaron mi proceso de aprendizaje en el laboratorio. A la Doctora Adriana Castillo Pico, a la docente Adriana Gil Zapata, por estar siempre pendientes de mi progreso.

A la Vicerrectoría de investigación y extensión por la financiación y a la Universidad Industrial de Santander.

Un agradecimiento especial a los padres de familia y a las instituciones educativas que apoyaron este proyecto, sin ellos y su interés nada de esto se hubiese logrado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	18
2.2 TOMA DE MUESTRAS	18
2.3 FASE DE LABORATORIO	19
3. RESULTADOS	23
3.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS	23
3.2 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN <i>FMRI</i>	23
3.3 IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	24
3.4 TIPIFICACIÓN ALÉLICA	29
4. DISCUSIÓN	31
5. CONCLUSIONES	34
6. RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36
BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama del gen FMR1 mostrando la ubicación de la región rica en repeticiones CGG de la secuencia 5'UTR.	21
Figura 2. Porcentaje de representación de los diagnósticos en las muestras recolectadas, según los criterios para autismo del DSM-IV	23
Figura 3. Comparación de los productos amplificados obtenidos para las muestras SXF 023 y SXF 032.	24
Figura 4. Resultados de la amplificación e identificación de fragmentos muestras SXF 010 y SXF 030.	25
Figura 5. Control positivo (C+ CALI).	26
Figura 6. Estimación de los factores de corrección para el cálculo del número de repeticiones CGG basado en el tamaño en pares de bases obtenido por electroforesis capilar.	27
Figura 7. Frecuencia y distribución de los alelos analizados según el número de repeticiones CGG calculadas.	30
Figura 8. Comparación de medias para cada categoría dentro del diagnóstico de autismo, según el DSM-IV, encontrados en la población de estudio.	30

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cebadores empleados en la amplificación de la región 5'UTR del gen <i>FMRI</i> .	20
Tabla 2. Condiciones de PCR reportadas para la amplificación de la región 5'UTR del <i>FMRI</i>	20
Tabla 3. Resultados obtenidos mediante electroforesis capilar.	28
Tabla 4. Genotipos encontrados en las muestras de pacientes analizados.	29

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Permiso otorgado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander para el desarrollo de la presente investigación. 42

RESUMEN

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DEL GENOTIPADO DE LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN *FMRI* PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SÍNDROME DE X FRÁGIL, EN PACIENTES CON AUTISMO EN BUCARAMANGA, COLOMBIA*

AUTOR: VALENTINA HERNÁNDEZ ESPINOSA**

PALABRAS CLAVE: AUTISMO, ESTANDARIZACIÓN, SÍNDROME DE X FRÁGIL, PCR, DIAGNÓSTICO, *FMRI*

La etiología incierta del autismo dificulta su diagnóstico y posterior tratamiento. Teniendo en cuenta la estrecha relación que presenta el autismo y la condición genética del síndrome del x frágil, es necesario establecer si es esta última la posible causa del trastorno en pacientes con autismo.

La cuantificación del número de repeticiones trinucleotídicas de Citosina-Guanina-Guanina (CGG)_n en la región 5'UTR del gen *FMRI* es primordial para el diagnóstico molecular del Síndrome X frágil. Ésta información puede ser obtenida determinando el largo de los fragmentos del gen *FMRI*.

En esta pasantía de investigación se tiene como objetivo estandarizar el protocolo para el genotipado de la región altamente repetitiva del *FMRI*, a partir de 29 muestras de pacientes con previo diagnóstico de autismo, procedentes de instituciones de educación especial en la ciudad de Bucaramanga.

La estandarización de este protocolo, realizado en el Laboratorio de Genética Humana UIS (LGH-UIS), se basa en otros dos protocolos existentes en la literatura a los cuales se les ajustó la técnica de amplificación por PCR, la separación y la identificación de los fragmentos por medio de electroforesis capilar. El protocolo propuesto dio como resultado el número exacto de repeticiones trinucleotídicas CGG para cada muestra recolectada.

Tras la tipificación alélica se obtuvo que el alelo de 30 repeticiones fue el más frecuente, de igual manera se encontraron dos pacientes, mujeres, con expansión en el número de repeticiones CGG.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Clara Inés Vargas Castellanos, MSc

ABSTRACT

TITLE: GENOTYPING STANDARDIZATION FROM THE 5'UTR REGION OF THE *FMRI* GENE FOR THE X FRAGILE SYNDROME MOLECULAR DIAGNOSIS IN AUTISM PATIENTS OF BUCARAMANGA, COLOMBIA*

AUTHOR: VALENTINA HERNÁNDEZ ESPINOSA**

KEYWORDS: AUTISM, STANDARDIZATION, FRAGILE X SYNDROME, PCR, DIAGNÓISIS, *FMRI*

The uncertain etiology of autism makes it difficult to diagnose and treat. Taking into account the close relationship between autism and the genetic condition of fragile X syndrome, it is necessary to establish if this is the possible cause of the disorder in patients with autism.

Quantification of the number of Cytosine-Guanine-Guanine (CGG)_n trinucleotide repeats in the 5'UTR region of the *FMRI* gene, is essential for the molecular diagnostic testing of the X Fragile Syndrome. This information can be extracted by determining the fragment length of the *FMRI* gene.

The objective of this internship was to standardize the genotyping protocol of the high repetitive region in the *FMRI* gene by processing 29 samples from autism patients (with previous diagnosis) of special education schools in the city of Bucaramanga.

Two published PCR protocols and one developed by the Laboratory of Human Genetics of the Industrial University of Santander (LGHC-UIS) were followed; we adjusted the PCR technique, the fragments separation and identification were made by capillary electrophoresis. The proposed protocol resulted in the exact number of CGG repeats for each sample.

After allelic typing, it was obtained that the allele of 30 repeats was the most frequent. In the same way, there were found two women patients with the expansion in the number of CGG repeats.

* Degree work.

** Science Faculty. Department of Biology. Director: Clara Inés Vargas Castellanos, MSc

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las enfermedades humanas se pueden clasificar como complejas y están causadas por una combinación de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. Por otro lado se clasifican las enfermedades monogénicas, que son causadas por anomalías de un solo gen, generalmente bien conocido. El autismo es una enfermedad compleja de la cual no se conoce una causa genética específica, lo que complica su diagnóstico y posterior tratamiento [1]. Sin embargo, a este trastorno se le ha asociado la enfermedad monogénica llamada Síndrome del X frágil, debido a que presenta una prevalencia del 2% - 5% en los casos totales de autismo, es por esto que se recomienda realizar una prueba diagnóstica con el fin de dar el abordaje adecuado a la enfermedad.[2], [3]

El primero en hablar de la asociación entre el autismo y el Síndrome de X frágil fue Brown et al., (1982), basado en comportamientos sobrelapados entre estos trastornos [4]. Posteriormente, la evidencia genética y de neuroimagen apoyarían esta idea [5].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al autismo o también llamado Trastorno del Espectro Autista (TEA), como un conjunto de trastornos que se presentan desde el nacimiento o se inician invariablemente durante los treinta primeros meses de vida [6]; las respuestas a los estímulos auditivos y visuales son anormales, con dificultades en la comprensión del lenguaje hablado e incapacidad para usar términos abstractos [7]. En general, hay un mejor rendimiento en los sectores relacionados con la memoria rutinaria o con habilidades espaciovíuales, que en aquellos que, implican operaciones simbólicas o lingüísticas [8]. En la mayoría de los casos, los rasgos autistas persisten toda la vida, pero el pronóstico del trastorno varía desde mínimo o nulo lenguaje y pobres capacidades para la vida diaria, hasta el logro de grados universitarios y funcionamiento totalmente independiente [9].

La Asociación Americana de Psiquiatría (APA) en 1980 incluye al autismo dentro del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-TR) [10]; en su cuarta edición (DSM-IV) redefine el criterio diagnóstico del autismo introduciendo el término, Trastorno del Espectro

Autista (TEA)¹ que incluye al autismo clásico, el Síndrome de Asperger y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS) [11].

El autismo se ha clasificado en primario y secundario; en el autismo primario, los datos actuales apuntan hacia una etiología multifactorial, en la cual, la influencia genética es de gran importancia pero no es la única [12]. Los casos de tipo secundario explican entre 5% y 10% del total de pacientes [13]. Las posibles causas son: la esclerosis tuberosa, la rubéola intrauterina, el Síndrome de X frágil, el Síndrome de Cornelia de Lange, el Síndrome de Angelman, algunas patologías como la encefalitis por herpes simple, la fenilcetonuria y el uso de fármacos durante el embarazo [14].

Actualmente, se trabaja en la identificación etiológica del autismo y su diagnóstico precoz, de manera que pueda tratarse de forma temprana, promover la mejora en la calidad de vida del paciente, asegurar su integración escolar y social [7], [15], y brindar consejería genética especializada para padres con riesgo.

En Colombia no se cuentan con datos concretos sobre el número total de individuos afectados con autismo y en muchos casos se confunde con las discapacidades cognitivas o mentales, debido a la amplia gama de síntomas que sobrelapan con el autismo [16]. La presencia de retardo mental en personas con autismo puede estar asociada en gran medida al Síndrome de X Frágil caracterizado por una mutación en el gen *FMRI*. Por esta razón, es necesario recurrir al diagnóstico molecular ya que identificar estas mutaciones confirman la presencia del Síndrome de X frágil, como la causa del autismo y permite proporcionar una asesoría genética más acertada a las familias. (Sudbery, 2004; Wilson et al., 2008).

El Síndrome de X Frágil (SXF) es la causa más frecuente de retardo mental hereditario [17], [18]. El gen *FMRI*, afectado en esta enfermedad consiste en 17 exones y tiene un tamaño aproximado

¹ En el resto de este documento utilizaremos el término de “autismo” para referir el espectro de condiciones que abarca el Trastorno del Espectro Autista (TEA) en el DSM-IV.

de 35 kb, el mRNA es aproximado de 4.4 kb, contiene 1.9 kb de secuencia codificante [19] y se encuentra localizado en la región Xq27.3 del cromosoma X.

Dentro de la región 5' no traducida (UTR) del gen *FMRI* existe una secuencia trinucleotídica CGG repetida, cuya expansión genera la mayor parte de las mutaciones asociadas al SXF [20]. El polimorfismo del *FMRI* permite establecer 4 categorías según el largo de la región 5'UTR: mutación completa (>200 repeticiones CGG), premutación (55-200 repeticiones CGG), intermedio (45-54 repeticiones CGG), y normal (6-44 repeticiones) [21], [22] (Figura 1).

El alelo mutación completa conduce a la hipermetilación y la desacetilación del gen *FMRI*, que detiene la transcripción del gen, lo que se traduce en una deficiencia de la Proteína del Retardo Mental por X Frágil (FMRP) y el deterioro de la sinapsis neuronal [23][24] (Figura 1).

Individuos que presentan alelos normales e intermedios son sanos y no presentan retraso mental. De igual forma, existen individuos con alelos en premutación, comúnmente llamados portadores ya que no desarrollan un fenotipo de retraso mental y por lo tanto son difícilmente identificados [17]. Sin embargo estos individuos pueden llegar a desarrollar trastornos con inicio tardío asociados al SXF como el trastorno Tremor y Ataxia (FXTAS) y la Falla Ovárica Primaria (FXPOI) [25]. Por su parte los individuos con la mutación completa exhiben retraso mental, y características físicas como macrorquidismo, extremidades largas y orejas grandes [26]. Además, 2 de cada 4 pacientes con la mutación completa tienen criterios diagnósticos para autismo [27].

El Síndrome de X frágil no sigue un patrón de herencia mendeliana clásica, por el contrario, este depende del número de repeticiones CGG en la región 5'UTR del individuo portador de la premutación [20] ya que estos alelos en premutación son inestables cuando se transmiten de madre a hijo y suelen expandirse en la siguiente generación [21].

Finalmente, se ha estimado que la prevalencia de la mutación completa en población general es de 2.6 en cada 10000 personas [1], mientras que el valor de la premutación se ha calculado en 1:130 a 300 mujeres y de 1: 250 a 450 hombres [1], [21], [28]. Sin embargo, estos valores se ven

aumentados cuando se apunta a población con autismo, presentando prevalencias de 2 individuos con SXF por cada 100 individuos con autismo [3], [27], [29]

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar el uso de herramientas moleculares para el diagnóstico del Síndrome de X frágil como posible causa de autismo en pacientes de la ciudad de Bucaramanga, Colombia

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar el protocolo de amplificación por PCR de la región controladora 5'UTR del gen *FMRI*, en muestras de pacientes con diagnóstico previo de autismo en la ciudad de Bucaramanga, Colombia.

Estandarizar la técnica de electroforesis capilar como método de visualización alélica para el diagnóstico del Síndrome de X frágil en el laboratorio (LGH-UIS).

Realizar la tipificación alélica de la región 5'UTR del gen *FMRI*, en muestras de pacientes con diagnóstico previo de autismo, en la ciudad de Bucaramanga, Colombia.

Contribuir al cumplimiento de los objetivos del proyecto VIE-UIS 9301.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de grado hace parte del proyecto de Investigación: “Incidencia del Síndrome de X frágil en pacientes con autismo de la ciudad de Bucaramanga.”, Dicho proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y quedó registrado bajo el código VIE-UIS 9301.

2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio comprendió pacientes con previo diagnóstico de autismo confirmado por psiquiatra, psicólogo o neurólogo infantil según criterios de DSM IV [11]. Estos pacientes, fueron seleccionados de diferentes instituciones de educación especial, de la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia.

Solo se incluyeron en el estudio aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión propuestos en el proyecto VIE-UIS 9301, enumerados a continuación:

1. Individuos con edades entre 0 y 18 años con diagnóstico clínico de autismo confirmado por psiquiatra, psicólogo o neurólogo infantil, según criterios de DSM IV.
2. Individuos escolarizados en alguna institución de educación especial de Bucaramanga.
3. Aceptación de ingreso al estudio y toma de muestras por parte de sus padres o tutor legal.
4. Individuos cuyos padres o tutores legales hayan diligenciado y firmado correctamente el formato de consentimiento informado.

2.2 TOMA DE MUESTRAS

A cada paciente incluido en el estudio se le realizó una punción capilar con lanceta de glucometria y se recolecto una gota de sangre en papel filtro estéril. En total se recolectaron 29 muestras en 7 instituciones de educación especial en la ciudad de Bucaramanga, Santander.

Cada muestra se rotuló con un código específico de tal manera que no revele la identidad del paciente. Finalmente, todas las muestras se almacenaron en el Laboratorio de Genética Humana UIS (LGH-UIS).

Aspectos éticos

Todas las muestras en este estudio fueron colectadas bajo consentimiento informado de padres o tutores legales, para su uso de forma anónima y responsable según la ley estatutaria N° 1581 de 2012, decreto 1377 de 2013. Así mismo, la propuesta de investigación y consentimiento informado fueron evaluados y aprobados por el comité de ética de la Universidad Industrial de Santander bajo la protección de datos personales, resolución N° 1227 de 2013. Este proyecto de investigación no tiene ninguna orientación comercial. Durante la investigación se preservó los principios de beneficencia, no maleficencia, autonomía y justicia. De la misma forma, este estudio no generó impactos negativos sobre la población. El manejo de residuos se realizó de acuerdo a lo estipulado en el Decreto 351 de 2014, protocolo PGIR UIS. Este estudio fue clasificado de riesgo mínimo de acuerdo con la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de salud de la República de Colombia.

El acta de aval del proyecto de investigación otorgada por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander se puede observar en el los anexos (Anexo A).

2.3 FASE DE LABORATORIO

Amplificación de la región 5'UTR del gen *FMRI*

A partir de cada mancha de sangre se obtuvo el ADN total por medio del kit Forensic DNA Extraction PrepFiler™ (Applied Biosystems®, REF= 4463351), siguiendo las indicaciones del fabricante (Biosystems, 2008).

La amplificación de la región 5'UTR del gen *FMRI* se utilizó el kit de PCR rico en G-C®, versión 7, manufacturado por (Roche Applied Sciences, Rotkreuz). Se utilizaron los cebadores diseñados en el LGH-UIS (Tabla 1), se emplearon las condiciones de PCR propuestas tanto por O'Connell et al. (2002), como por Wilson et al. (2008) (Tabla 2). Las condiciones de termociclado consistieron inicialmente en un periodo de incubación a 95°C por 3min, seguido por una primera fase de 10 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 55°C y 45s a 72°C, una segunda fase de 25 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 55°C y 45s a 72°C (con un aumento de 5s en cada ciclo) y una extensión final a 72°C por 7 min [30], [31]

Tabla 1. Cebadores empleados en la amplificación de la región 5'UTR del gen FMRI.

CEBADORES	SECUENCIAS
LGH-UIS	F: 5'-6FAM- CTCCGTTTCGGTTTCACTTC -3' R: 5'-ATCTTCTCTTCAGCCCTGCT-3'

F: forward; **R:** reverse.

Tabla 2. Condiciones de PCR reportadas para la amplificación de la región 5'UTR del FMRI

REACTIVOS	WILSON et al., (2008)	O'CONNELL et al., (2002)
PCR BUFFER	1X	1X
MGCL₂	1,5 mM	1,5 mM
RESOLUTION BUFFER(RICHG-C)	1,5 M	1,5 M
DNTP´S	10 mM	0,025 mM
CEBADORES	10 µM	0,2 µM
TAQ POLIMERASA	2 U	2 U
ADN	300 ng/µL	300 ng/µL

Visualización alélica de productos de PCR

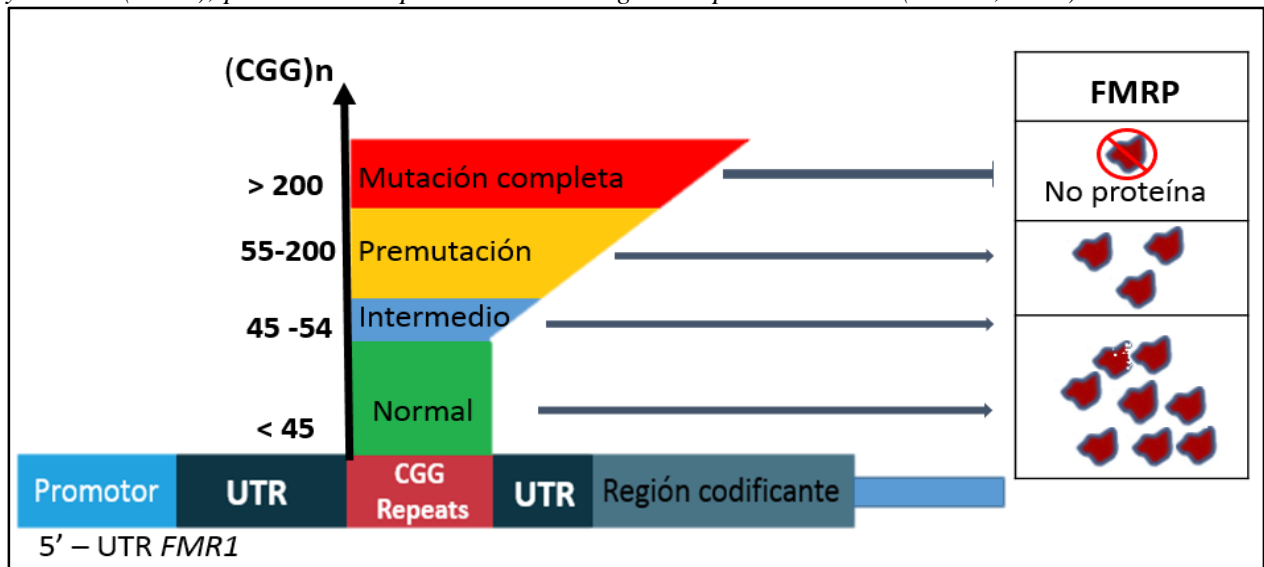
Los productos amplificados por PCR fueron separados por medio de electroforesis capilar en un secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems), para visualizar los perfiles electroforéticos se utilizó el software GenMapper v2.3®.

También los productos de PCR fueron separados en geles de Agarosa LE SeaKem® (Lonza) al 2%. La separación de los fragmentos requirió de 10 µL del producto amplificado mezclado con 3,0 µL de Bromuro de etidio.

Tipificación alélica

La tipificación alélica define a los alelos basados en cuatro categorías según su tamaño: mutación completa, premutación, intermedio y normal (ACMG, 2008) [21], [22], [32]. (Figura 1) Este procedimiento se llevó a cabo encontrando el número de repeticiones trinucleotídicas CGG de cada muestra analizada, a partir del tamaño del pico en pares de bases (pb) obtenido en la electroforesis capilar.

Figura 1. Diagrama del gen *FMR1* mostrando la ubicación de la región rica en repeticiones CGG de la secuencia 5'UTR. Clasificación de los tipos de alelos según el número de repeticiones CGG (CGG) n que presenta la región. Alelo Mutación completa (rojo), Premutación (amarillo), Intermedio o zona gris (azul) y Normal (verde); producción de proteína FMRP según el tipo de mutación (ACMG, 2008).



Para determinar el número de repeticiones se deben conocer los factores de corrección de tamaño (C_0) y movilidad (m_0) que dependen del instrumento, así como del tipo de polímero y de las condiciones del ensayo utilizadas, y pueden variar ligeramente de un laboratorio a otro [33]. Para determinar estos factores se utilizó el tamaño en pares de bases de los alelos del control positivo C+ CALI, previamente verificados por secuenciación, el tamaño de los alelos de esta muestra control fueron de 30 y 80 repeticiones CGG.

Para convertir el tamaño del pico en la longitud de repeticiones CGG se utilizó la siguiente ecuación donde el tamaño del pico en pares de bases, corresponde al producto dado en la muestra de cada paciente (Ecuación 1).

Ecuación 1. Calculo del número de repeticiones CGG en cada alelo analizado. Esta ecuación tiene en cuenta las condiciones de movilidad (mo) y corrección de tamaño (Co) propias de cada laboratorio (Grosso,2014).

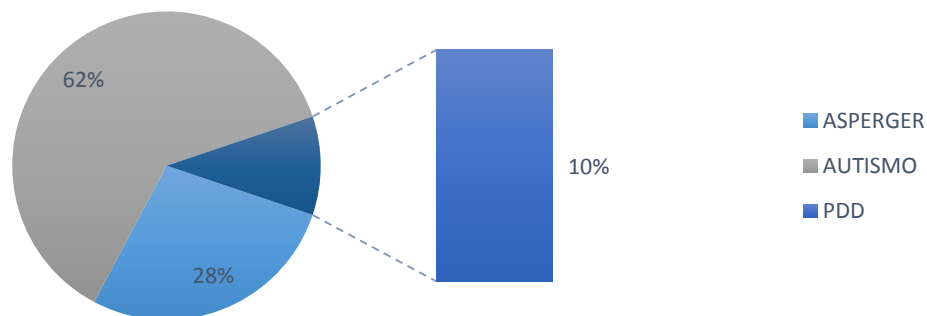
$$tamaño\ del\ alelo = \frac{Tamaño\ del\ pico\ (pb) - CO}{mo}$$

3. RESULTADOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS

Las muestras corresponden a 25 individuos del sexo masculino y 4 del sexo femenino diagnosticados con autismo (según los criterios del DSM IV) en edades entre los 5 a los 18 años. (Figura 2).

Figura 2. Porcentaje de representación de los diagnósticos en las muestras recolectadas, según los criterios para autismo del DSM-IV (c). Autismo (Gris), Asperger (Celeste), Desorden del desarrollo no especificado (PDD) (Azul oscuro).



3.2 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN *FMRI*

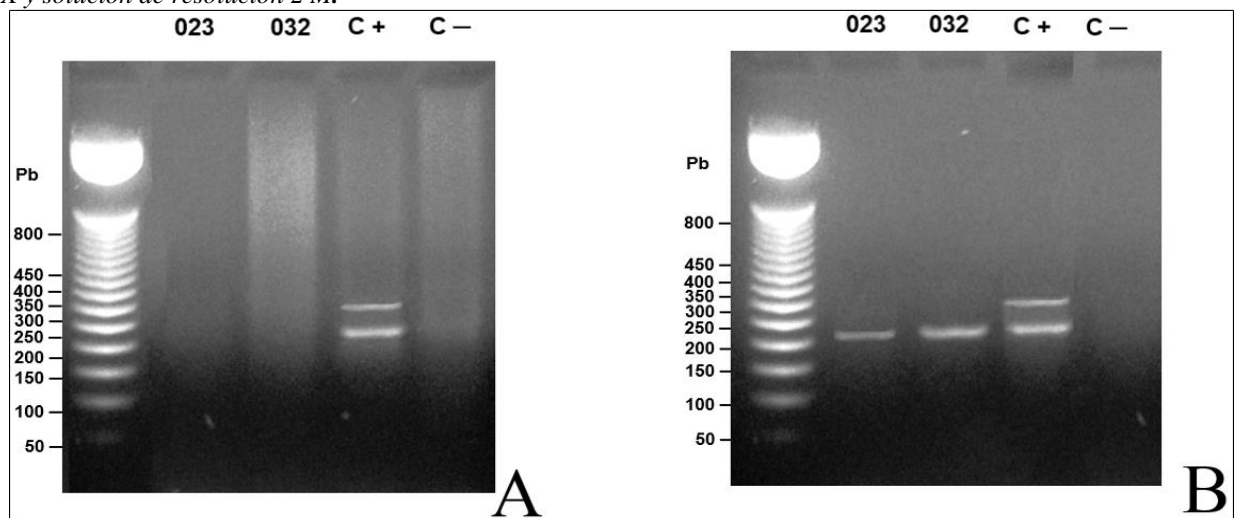
En el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad Industrial de Santander, se realizó la estandarización para la amplificación de la región 5'UTR que contiene las repeticiones trinucleotídicas CGG que dan lugar a las mutaciones en el gen *FMRI*; para esto se tuvo en cuenta los métodos propuesto por Wilson et al. (2008) y O'Connell et al. (2002).

Luego de analizar 29 muestras de ADN de pacientes con diagnóstico previo de autismo, las condiciones de PCR se determinaron de la siguiente manera para 22 μ L de volumen final por individuo: 50 ng/ μ L de ADN, 1X de buffer de reacción, 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de Cebadores y 2 U de mezcla enzimática G-C rich, 1M Solución de resolución G-C rich. Todas las reacciones de amplificación se desarrollaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied

Biosystems®, USA) siguiendo los siguientes parámetros: Un ciclo inicial 98.5 °C por 5 s; seguido por 14 ciclos de 5 s a 98.5 °C; 4 min a 56 °C y 6 min a 69 °C; continuando con, 15 ciclos de 5 s a 98.5 °C; 4 min a 56 °C (aumentando 0.1 °C en cada ciclo) y 6 min a 69 °C y una extensión final a 69 °C por 7 min.

Cabe resaltar ciertas modificaciones que fueron hechas al protocolo de amplificación, las cuales son: el aumento a 2 M de la concentración de la solución de resolución RICH G-C, la realización de una premezcla de los cebadores, el aumento a 1.5 X en la concentración del buffer de reacción, el incremento en el número de ciclos de termociclado y una adición de 3 minutos a 95 °C en la fase inicial de la denaturación. Estos cambios solo fueron empleados para la amplificación de 2 de las 29 muestras analizadas, las muestras SXF 023 y SXF 032 (Figura 3).

Figura 3. Comparación de los productos amplificados obtenidos para las muestras SXF 023 y SXF 032. **A:** Concentración de buffer de reacción 1 X y solución de resolución 1,5 M. **B:** Concentración de Buffer de reacción 1,5 X y solución de resolución 2 M.



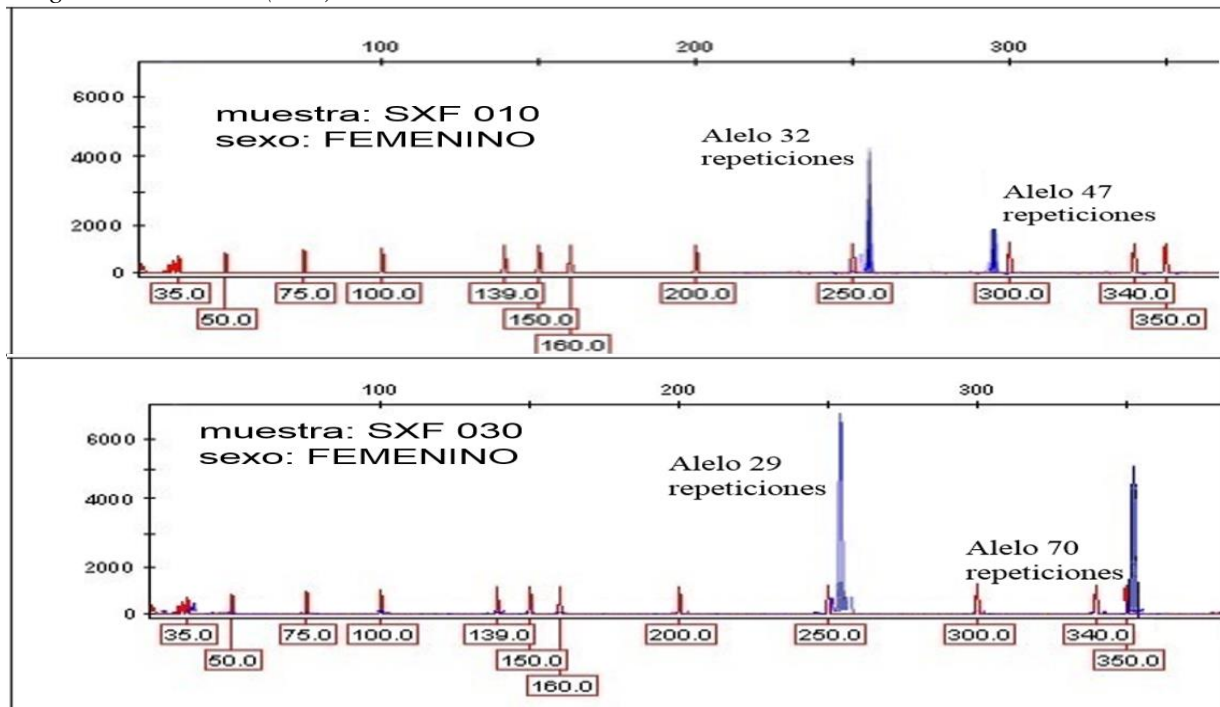
3.3 IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La separación de los productos de PCR obtenidos se realizó por electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®, USA). La separación de los fragmentos requirió de 1 µL del producto amplificado mezclado con 12 µL de Formamida y 0.4 µL de control interno ROX 500™(P/N 401734, Applied biosystems), este marcador interno contiene 16 fragmentos que van de 35 a 500 pb produciendo un solo pico por fragmento. Finalmente, se empleó

un capilar GeneScan™ (P/N.402839, 50mmÀ30cm, ABI) y un sistema de polímero POP-4™ (P/N.402838, ABI) (Figura 4).

La electroforesis capilar se realizó siguiendo las recomendaciones dadas por O'Connell et al. (2002). Las muestras fueron inyectadas electroquinéticamente 5 seg a 15 kV, durante 45 min.

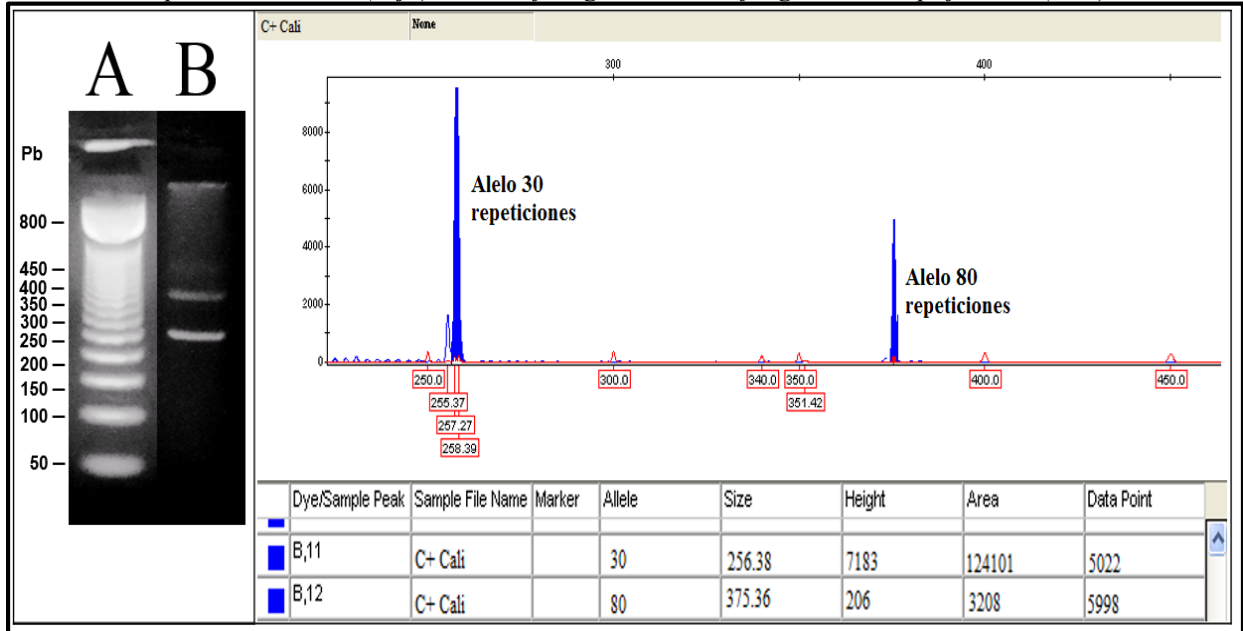
Figura 4. Resultados de la amplificación e identificación de fragmentos muestras SXF 010 y SXF 030. Asignación alélica (CGG)n: 32/47 y (CGG)n: 29/70 respectivamente. Marcador interno ROX 500 (rojo), Fragmento de interés (azul).



Dado que los productos de PCR esperados para la región 5'UTR del gen *FMRI* se encuentran en el rango comprendido entre 240 y 600 pb estos se compararon con un marcador interno ROX 500™ (Thermo Scientific®) y un ADN control positivo (C + CALI) para su correcta identificación. El control positivo (C + CALI) corresponde a una mujer heterocigota con un alelo normal (30 repeticiones CGG) y un segundo alelo premutado (80 repeticiones CGG), este control fue suministrado por el profesor Wilmar Saldarriaga del Grupo de Investigación MACOS de la Universidad del Valle (Figura 5). El control negativo conto con las mismas condiciones de PCR, sin embargo a este no se le agrego ADN.

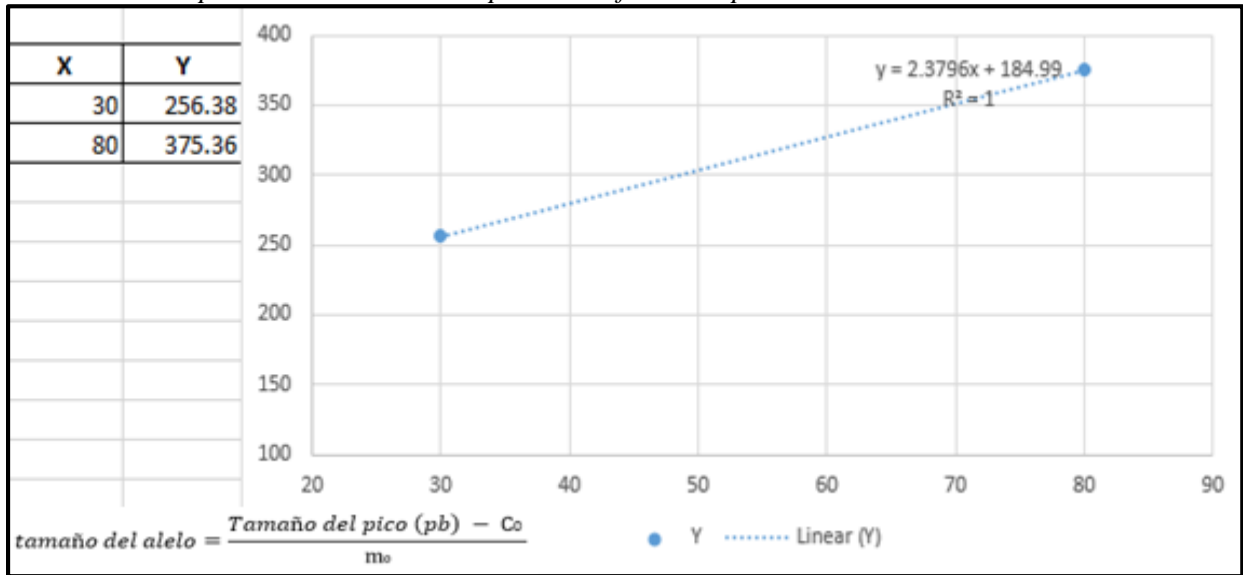
La visualización del tamaño de los picos resultantes en la electroforesis capilar se realizó utilizando el software GeneMapper v3.2 (Applied Biosystems®).

Figura 5. Control positivo (C+ CALI). IZQUIERDA: electroforesis en gel de agarosa 2%. (A) marcador de peso molecular; (B) bandas de los fragmentos amplificados. DERECHA: electroforesis capilar. Marcador de peso ROX500™ (rojo); Electroferograma de los fragmentos amplificados (azul).



Para obtener los factores de corrección y movilidad necesarios para la tipificación alélica, se consignaron los resultados de la electroforesis capilar para el control positivo C+ CALI en una base de datos de Excel con el fin de realizar el cálculo de regresión utilizando este software. Los datos del eje **X** corresponden al número de repeticiones CGG establecido por previa secuenciación de cada uno de estos alelos, y los datos del eje **Y** corresponden al tamaño en pares de bases para cada alelo, como se muestra en la Figura 6. La intersección del acoplamiento lineal corresponde al factor de corrección (C_0), y la pendiente, al factor de movilidad (m_0).

Figura 6. Estimación de los factores de corrección para el cálculo del número de repeticiones CGG basado en el tamaño en pares de bases obtenido por electroforesis capilar.



Así el factor de movilidad m_0 de 2.379 y el factor de corrección C_0 184.99, se utilizaron en el análisis del número de repeticiones CGG para la ecuación antes descrita, estos factores son específicos para los materiales y equipos utilizados en este estudio.

De las 29 muestras analizadas se obtuvieron picos electroforéticos con tamaños entre los 220 pb y 380 pb. Aplicando la ecuación antes mencionada se logró estimar alelos de tamaño comprendido entre las 19 repeticiones $(CGG)_{19}$ y las 80 repeticiones $(CGG)_{80}$ (Tabla 3)

Como alternativa de visualización se adoptó como sistema de separación de los productos de PCR el uso de geles de Agarosa LE SeaKem® (Lonza) al 2%. Las condiciones de corrida que permitieron una separación adecuada de los productos de PCR de los fragmentos considerados fueron: corrida a 70V por 1 hora, en una cámara electroforesis horizontal Sub-Cell GT Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc. ®).

Tabla 3. Resultados obtenidos mediante electroforesis capilar.

SEXO	MX	ALELO 1 (pb)	(CGG)n alelo 1	ALELO 2 (pb)	(CGG)n alelo 2	Mutación
M	SXF 001	258.12	31			NORMAL
F	SXF 002	256.21	30	269.65	35	NORMAL
M	SXF003	254.93	29			NORMAL
M	SXF004	257.11	30			NORMAL
M	SXF005	257.26	30			NORMAL
M	SXF006	257.23	30			NORMAL
M	SXF007	254.76	29			NORMAL
F	SXF008	250.62	28	253.11	29	NORMAL
M	SXF009	258.05	31			NORMAL
F	SXF 010	259.96	32	297.21	47	INTERMEDIO
M	SXF 015	232.96	20			NORMAL
M	SXF 016	255.3	30			NORMAL
M	SXF 017	257.54	30			NORMAL
M	SXF 018	255.49	30			NORMAL
M	SXF 019	257.17	30			NORMAL
M	SXF 020	255.01	29			NORMAL
M	SXF 021	255.37	30			NORMAL
M	SXF 022	261.59	32			NORMAL
M	SXF 023	250.59	27			NORMAL
M	SXF024	255.21	30			NORMAL
M	SXF025	257.28	30			NORMAL
M	SXF 026	256.93	30			NORMAL
M	SXF 027	229.73	19			NORMAL
M	SXF 028	256.8	30			NORMAL
M	SXF 029	253.01	29			NORMAL
F	SXF 030	255.19	29	352.63	70	PREMUTADO
M	SXF 032	267.3	35			NORMAL
M	SXF 031	262.53	33			NORMAL
M	SXF 034	271.08	36			NORMAL
F	C+ CALI	256.38	30	375.36	80	PREMUTADO

M: HOMBRE F: MUJER
pb: Valor en pares de bases.
(CGG)n: Número de repeticiones trinucleotídicas cgg calculadas.

3.4 TIPIFICACIÓN ALÉLICA

Cada una de las 29 muestras amplificadas se comparó contra el marcador interno ROX 500™ y contra el control positivo (C+ CALI), obteniendo 27 muestras (93.1%) con alelos de menos de 44 repeticiones trinucleotídicas CGG, lo que se considera un genotipo sin mutación o normal. (Tabla 3 y 4).

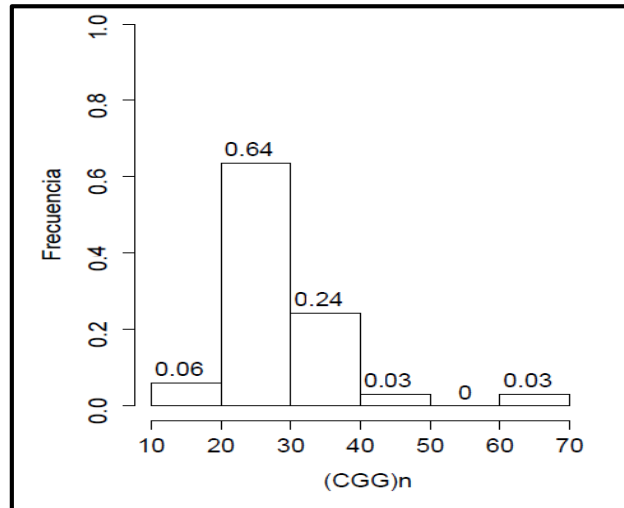
Tabla 4. Genotipos encontrados en las muestras de pacientes analizados.

<i>Genotipo</i>	<i># de pacientes</i>	<i>%</i>
<i>Mutación completa</i>	0	0
<i>Premutación</i>	1	3.4
<i>Intermedio</i>	1	3.4
<i>Normal</i>	27	93.1
<i>TOTAL</i>	29	100

Se obtuvo 2 muestras (6.9%) con alelos expandidos de más de 45 repeticiones CGG. La muestra SXF 010 corresponde a una mujer heterocigota de un alelo 1 normal (32 repeticiones CGG) y un alelo 2 intermedio (47 repeticiones CGG). A su vez, la muestra SXF 030 corresponde a una mujer heterocigota con el alelo 1 normal (29 repeticiones CGG) y un alelo 2 premutado (70 repeticiones CGG). (Tabla 3 y 4) (Figura 4).

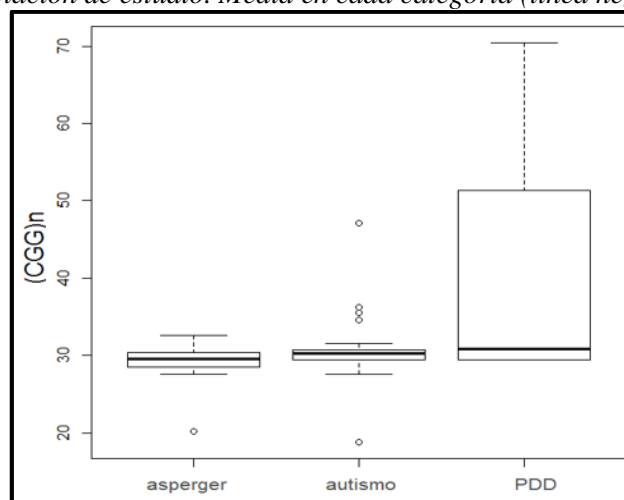
Con respecto a los alelos identificados, se logró tipificar con éxito el total de 33 alelos. Pudimos observar que el 88% de los alelos se distribuyen en el rango de las 20 a las 40 repeticiones (CGG)₂₀₋₄₀ (Figura 7), siendo el alelo de 19 repeticiones y el de 70 repeticiones, el más corto y el más largo respectivamente. Con respecto al alelo más frecuente fue el alelo de 30 repeticiones (CGG)₃₀ (39.9%), seguido del alelo de 29 (CGG)₂₉ (18.1%).

Figura 7. Frecuencia y distribución de los alelos analizados según el número de repeticiones CGG calculadas.



Con el fin de identificar asociación entre el número de repeticiones CGG y la categoría dentro del diagnóstico autismo (asperger, autismo clásico, desorden no especificado del desarrollo-PDD) en los pacientes muestreados, se llevó a cabo una comparación usando la prueba de Kruskal-Wallis, para datos no paramétricos, dando como resultado la no asociación de estas variables y la atribución de las pequeñas diferencias entre categorías al error aleatorio en el muestreo (Chi-cuadrado = 1,0322; $df = 2$; p-valor = 0,5968) (Aguayo Canela, M. 2012) (Figura 8)

Figura 8. Comparación de medias para cada categoría dentro del diagnóstico de autismo, según el DSM-IV, encontrados en la población de estudio. Media en cada categoría (línea negra oscura)



4. DISCUSIÓN

La característica más importante de la región 5'UTR del gen *FMR1* es la presencia de un alto contenido de citosinas y guaninas en su secuencia, lo que dificulta la amplificación generando fallos en la polimerasa y la inestabilidad de la secuencia. Si bien Wilson et al., (2008) y O'Connell et al., (2002) utilizan el aumento de MgCl₂ para mejorar su amplificación, la cantidad de ADN necesaria para obtener producto amplificado es alta (300 ng/μl) en estos protocolos. Con el desarrollo del presente estudio se encontró que al aumentar las concentraciones finales del Buffer de reacción (1,5 X) y de solución de resolución (2 M) es posible obtener producto amplificado para muestras con poco o escaso ADN (50 ng/μl). Esto se debe a que los reactivos antes mencionados contienen coadyuvantes como el dimetil sulfoxido (DSMO) y el MgCl₂, los cuales debilitan los enlaces C-G, favoreciendo la estabilidad las hebras, evitando la formación de estructuras secundarias y disminuyendo la temperatura necesaria para lograr una adecuada denaturación y separación de las hebras [34]. De igual forma, promueven la actividad de la polimerasa en la fase de elongación. [35], [36].

Durante la estandarización de los ciclos de termociclado se mantuvieron las condiciones reportadas por Wilson et al., (2008). Sin embargo, de las modificaciones más relevantes realizadas al protocolo, se evidencia que al aumentar el tiempo inicial de desnaturalización (3 min a 95° C), se promueve la correcta separación de las hebras en mayor cantidad del templete inicial, importante para muestras con poca concentración de ADN (Figura 3). De igual manera, al tener gran cantidad de ciclos (29 – 40 ciclos) se permite la correcta amplificación no solo de fragmentos cortos, sino también, de fragmentos largos con mayor número de repeticiones CGG, sobre todo en muestras de mujeres con premutación o mutación completa, donde se presentan dos alelos uno mucho más largo que el otro.

Filipovic-sadic (2010) en su estudio sobre un mejor método rutinario de identificación de alelos expandidos en el SXF, expone las ventajas de la electroforesis capilar frente a otros métodos de separación especialmente en muestras con un número de repeticiones CGG en el límite de la expansión (ej. 45 o 55 repeticiones CGG). En el presente estudio la electroforesis capilar fue la

más informativa en comparación a los geles de agarosa 2%, ya que ofreció una resolución de una sola repetición, lo que es crucial en la cuantificación de las repeticiones especialmente cuando se requiere un diagnóstico [36] (Figura 4).

Una de las desventajas que presenta la electroforesis capilar es la limitante en el número de repeticiones capaz de detectar. Con esta pasantía se logró optimizar el sistema para la determinación precisa de repeticiones CGG entre las 19 y 70 repeticiones (CGG)₁₉₋₇₀, alelos premutados con hasta 114 repeticiones, pueden ser detectados con precisión, sin embargo, aún no se ha realizado la validación del sistema con alelos más largos o alelos mutación completa.

Con respecto a la tipificación alélica, las ecuaciones utilizadas tanto por Wilson et al. (2008) como por O'Connell et al. (2002), varían sustancialmente frente a la ecuación empleada en este estudio. Si bien teóricamente las repeticiones CGG tienen un peso molecular cada una de 3 pb, se logró observar que las ecuaciones donde se asume en su totalidad este parámetro no dieron para nuestros datos los valores esperados, esto puede deberse a parámetros propios de la corrida electroforética no tenidos en cuenta con la ecuación propuesta por el autor. Grosso et al., (2014) argumenta que variaciones ajenas a la muestra como lo son la movilidad del fragmento al momento de la separación en la matriz del capilar, pueden alterar ligeramente el tamaño del pico resultante, además que estas variaciones son propias del instrumento utilizado y puede variar de un laboratorio a otro. De esta manera se logró probar que calculando los factores de corrección (Co) y movilidad (mo), el peso molecular por repetición CGG varía en la corrida electroforética y el parámetro a utilizar no es exactamente 3 pb (Figura 6; Ecuación 1).

Teniendo en cuenta la prevalencia del SXF en población con autismo (2 de cada 100)[3], en este estudio no se encontraron alelos con mutación completa (CGG)_{>200}, lo que puede estar relacionado a una falta de muestreo. A pesar de esto, estudios similares en población con autismo demuestran un exceso de alelos intermedios (CGG)₄₅₋₅₅ en pacientes con diagnóstico clínico de problemas cognitivos y/o conductuales [37].

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se encontraron en dos pacientes mujeres, alelos con expansión en el número de repeticiones (SXF 030 y SXF 010), lo que puede sugiere dos cosas relevantes i) la exitosa amplificación de muestras donde se esperan longitudes de

fragmentos variables, como es el caso de mujeres heterocigotas con expansión de repeticiones; ii) la correcta amplificación, visualización y separación de alelos con expansión de repeticiones en el rango de premutación de 55 a 200 (CGG)₅₅₋₂₀₀ , así como aquellos alelos en el rango crítico de zona gris o intermedio (CGG)₄₅₋₅₄.

Finalmente, la distribución de alelos en la población de estudio mostró que el alelo más común fue el alelo de 30 repeticiones, lo cual coincide, con lo reportado por Peprah (2012) para países de Latinoamérica como Chile y Brasil con poblaciones de ascendencia europea.

5. CONCLUSIONES

La implementación de herramientas moleculares para el diagnóstico del X frágil arrojó la presencia de alelos expandidos en población con autismo en la ciudad de Bucaramanga, lo que impulsa la exploración de la relación entre el Síndrome del X frágil y el autismo en esta ciudad.

La electroforesis capilar es un método eficaz para la cuantificación de las repeticiones CGG presentes en la región 5'UTR del gen *FMRI*, permitiendo la correcta tipificación alélica y el establecimiento de posibles mutaciones.

La optimización realizada en este protocolo para la cuantificación de las repeticiones CGG permite la tipificación precisa de alelos, teniendo en cuenta los factores de corrección (Co) y (mo) propios para las condiciones de cada laboratorio.

Las condiciones de PCR utilizadas en este estudio permiten amplificar muestras con tamaños variables en la región 5'UTR del gen *FMRI*, como es el caso de mujeres heterocigotas.

En cuanto a los aspectos metodológicos, para la amplificación por PCR de la región 5'UTR del gen *FMRI* es necesario utilizar coadyuvantes que intervengan en la estabilización de las hebras y promuevan la actividad de la polimerasa.

6. RECOMENDACIONES

Entre las dificultades para involucrar en investigación a individuos dentro espectro autista, está la imposibilidad de un asentimiento propio, además de dificultad en el manejo e intervención al paciente, lo que en muchos casos impide la obtención de un tamaño de muestra adecuado. Por lo cual, se hace necesario sensibilizar e incentivar tanto a padres de familia de niños con estos trastornos, como a instituciones educativas especiales, las ventajas de participar estudios de investigación que fomentan la implementación de herramientas útiles para el diagnóstico de enfermedades de alta prevalencia como el autismo o el Síndrome de X frágil.[38].

Una de las claras desventajas que existe en la actualidad es la falta de material de referencia para alelos premutados y mutación completa. Se recomienda utilizar varios controles positivos con el fin de cubrir los rangos más amplios de mutación, desde las 200 repeticiones CGG en adelante.

Pese a que O'Connell et al (2002) y Wilson et al (2008) reportan las mismas condiciones de PCR en términos de tiempos de ciclado, concentración de reactivos, entre otros aspectos técnicos y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente pasantía, se recomienda utilizar pruebas confirmatorias adicionales (ej. la técnica de Southern blot), para muestras sin resultados concluyentes, con la intención de descartar posibles falsos negativos en el diagnóstico del Síndrome del X frágil.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] J. Hunter, O. Rivero-Arias, A. Angelov, E. Kim, I. Fotheringham, and J. Leal, "Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis.," *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 164A, no. 7, pp. 1648–58, Jul. 2014.
- [2] J. Moss and P. Howlin, "Autism spectrum disorders in genetic syndromes: implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population.," *J. Intellect. Disabil. Res.*, vol. 53, no. 10, pp. 852–73, Oct. 2009.
- [3] V. B. Kelly and a Salt, "Question 2. Should fragile X be tested for in boys with a diagnosis of autistic spectrum disorder?," *Arch. Dis. Child.*, vol. 94, no. 4, pp. 323–4, Apr. 2009.
- [4] W. T. Brown *et al.*, "Autism is associated with the Fragile-X Syndrome," *Autism Dev. Disord.*, vol. 12, pp. 303–308, 1982.
- [5] J. M. Butler, E. Buel, F. Crivellente, and B. R. McCord, "Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis.," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 10–11, pp. 1397–412, Jun. 2004.
- [6] H. Bruining, M. J. C. Eijkemans, M. J. H. Kas, S. R. Curran, J. A. S. Vorstman, and P. F. Bolton, "Behavioral signatures related to genetic disorders in autism," pp. 1–12, 2014.
- [7] O. M. de la S. OMS, "Autism spectrum disorders," 2016.
- [8] A. C. Wheeler *et al.*, "DSM-5 changes and the prevalence of parent-reported autism spectrum symptoms in Fragile X syndrome.," *J. Autism Dev. Disord.*, vol. 45, no. 3, pp. 816–29, Mar. 2015.
- [9] A. T. McCray, P. Trevvett, and H. R. Frost, "Modeling the autism spectrum disorder phenotype.," *Neuroinformatics*, vol. 12, no. 2, pp. 291–305, Apr. 2014.
- [10] M. D. and definition of childhood autism. Rutter, "Diagnosis and definition of childhood autism," *J. Autism Child. Schizophr.*, vol. 8, no. 2, pp. 139–161, 1978.
- [11] A. P. A. APA, "Diagnostic and statistical manual of mental disorders," 4th ed, vol. DSM-IV-TR, 2000.
- [12] E. Çöp, P. Yurtbaşı, Ö. Öner, and K. M. Münir, "Genetic testing in children with autism spectrum disorders.," *Anadolu Psikiyat. Derg.*, vol. 16, no. 6, pp. 426–432, 2015.

- [13] K. S. Reddy, "Cytogenetic abnormalities and fragile-x syndrome in Autism Spectrum Disorder," *BMC Med. Genet.*, vol. 16, pp. 1–17, 2005.
- [14] R. Muhle, S. V Trentacoste, and I. Rapin, "The Genetics of Autism," *Pediatrics*, vol. 113, no. 5, 2004.
- [15] L. Cabarcas, E. Espinosa, and H. Velasco, "Etiología del retardo mental en la infancia : experiencia en dos centros de tercer nivel," 2013.
- [16] DANE, "Censo general 2005. Discapacidad. Personas con limitaciones permanentes.," 2005.
- [17] D. B. Bailey, M. Raspa, M. Olmsted, and D. B. Holiday, "Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: findings from a national parent survey.," *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 146A, no. 16, pp. 2060–9, Aug. 2008.
- [18] S. De Rubeis and C. Bagni, "Regulation of molecular pathways in the Fragile X Syndrome: insights into Autism Spectrum Disorders.," *J. Neurodev. Disord.*, vol. 3, no. 3, pp. 257–69, Sep. 2011.
- [19] P. Jin and S. T. Warren, "Understanding the molecular basis of fragile X syndrome," vol. 9, no. 6, 2000.
- [20] Y. Fu *et al.*, "Variation of the CGG Repeat at the Fragile X Site Results in Genetic Instability : Resolution of the Sherman Paradox," vol. 67, pp. 1047–1056, 1991.
- [21] W. Saldarriaga, F. Tassone, L. Y. González-Teshima, J. V. Forero-Forero, S. Ayala-Zapata, and R. Hagerman, "Fragile X Syndrome," *Colomb. Med.*, vol. 45, no. 4, pp. 190–198, 2014.
- [22] A. Maddalena, "Clinical significance of tri-nucleotide repeats in Fragile X testing: A clarification of American College of Medical Genetics guidelines," pp. 2006–2008, 2008.
- [23] P. Jin, R. S. Alisch, and S. T. Warren, "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation," vol. 6, no. 11, pp. 1048–1053, 2004.
- [24] S. Chen, E., & Joseph, "Fragile X mental retardation protein: a paradigm for translational control by RNA-binding proteins," *Biochimie*, vol. 114, pp. 147–154, 2015.
- [25] S. Jacquemont *et al.*, "Epigenetic modification of the FMR1 gene in fragile X syndrome is associated with differential response to the mGluR5 antagonist AFQ056.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 64, p. 64ra1, Jan. 2011.
- [26] A. Payan, C., Saldarriaga, W., Isaza, C., & Alzate, "Estudio de foco endémico de retardo mental en Ricaurte, Valle.," *Acta Biológica Colomb.*, vol. 6, no. 2, p. 88, 2011.

- [27] N. M. Devitt, L. Gallagher, and R. B. Reilly, “Autism Spectrum Disorder (ASD) and Fragile X Syndrome (FXS): Two Overlapping Disorders Reviewed through Electroencephalography-What Can be Interpreted from the Available Information?,” *Brain Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 92–117, Mar. 2015.
- [28] D. C. P. Crawford, J. M. M. Acuña, and S. L. P. Sherman, “FMR1 and the Fragile X Syndrome: Human Genome Epidemiology Review,” *Genet Med.*, vol. 3, no. 5, pp. 359–371, 2001.
- [29] E. Peprah, “Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations.,” *Ann. Hum. Genet.*, vol. 76, no. 2, pp. 178–91, Mar. 2012.
- [30] C. O Connell, D. Atha, J. Jakupciak, J. Amos, and K. Richie, “Standardization of PCR amplification for fragile X trinucleotide repeat measurements *,” *Clin. Genet.*, no. 10, pp. 13–20, 2002.
- [31] J. A. Wilson *et al.*, “Consensus Characterization of 16 FMR1 Reference Materials: A Consortium Study,” *J. Mol. Diagnostics*, vol. 10, no. 1, pp. 2–12, 2008.
- [32] C. De Geyter *et al.*, “Similar prevalence of expanded CGG repeat lengths in the fragile X mental retardation I gene among infertile women and among women with proven fertility: a prospective study.,” *Genet. Med.*, vol. 16, no. 5, pp. 374–8, May 2014.
- [33] D. C. G. Grosso, “Relación entre la expresión citogenética del sitio FRAXA (Xq 27.3) con la expresión clínica, y el número de repeticiones CGG del gen FMR1 por dos técnicas moleculares, en familias colombianas con miembros afectados con el Síndrome del X Frágil,” UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, 2014.
- [34] B. P. Brylawski, P. D. Chastain, S. M. Cohen, M. Cordeiro-Stone, and D. G. Kaufman, “Mapping of an origin of DNA replication in the promoter of fragile X gene FMR1.,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 82, no. 2, pp. 190–6, Apr. 2007.
- [35] S. Kang, K. Ohshima, M. Shimizu, S. Amirhaeri, and R. D. Wells, “Pausing of DNA Synthesis in Vitro at Specific Loci in CTG and CGG Triplet Repeats from Human Hereditary Disease Genes *,” vol. 270, no. 45, pp. 27014–27021, 1995.
- [36] S. Filipovic-sadic *et al.*, “A Novel FMR1 PCR Method for the Routine Detection of Low Abundance Expanded Alleles and Full Mutations in Fragile X Syndrome METHODS :,” vol. 408, pp. 399–408, 2010.
- [37] M. I. Alvarez-Mora *et al.*, “Comprehensive Molecular Testing in Patients With High Functioning Autism Spectrum Disorder,” *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 784–785, pp. 46–52, Jan. 2016.
- [38] K. Hens, H. Peeters, and K. Dierickx, “The Ethics of Complexity . Genetics and Autism , a Literature Review,” 2016.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ-MORA, Maria Isabel et al. "Comprehensive Molecular Testing in Patients With High Functioning Autism Spectrum Disorder." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 784-785 (2016): 46–52.

APA, American Psychiatric Association. "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders." *4th ed DSM-IV-TR* (2000).

BAILEY, Donald B et al. "Co-Occurring Conditions Associated with FMR1 Gene Variations: Findings from a National Parent Survey." *American journal of medical genetics. Part A* 146A.16 (2008): 2060–9.

BROWN, W.T. et al. "Autism Is Associated with the Fragile-X Syndrome." *Autism Develop Disorders* 12 (1982): 303–308.

BRUINING, Hilgo et al. "Behavioral Signatures Related to Genetic Disorders in Autism." (2014): 1–12.

BRYLAWSKI, Bruna P et al. "Mapping of an Origin of DNA Replication in the Promoter of Fragile X Gene FMR1." *Experimental and molecular pathology* 82.2 (2007): 190–6.

CABARCAS, Lisete, Eugenia Espinosa, and Harvy Velasco. "Etiología Del Retardo Mental En La Infancia : Experiencia En Dos Centros de Tercer Nivel." (2013): n. pag.

CHEN, E., & Joseph, S. "Fragile X Mental Retardation Protein: A Paradigm for Translational Control by RNA-Binding Proteins." *biochimie* 114 (2015): 147–154.

ÇÖP, Esra et al. "Genetic Testing in Children with Autism Spectrum Disorders." *Anadolu psikiyatri dergisi* 16.6 (2015): 426–432.

CRAWFORD, Dana C PhD, Juan M MD Acuña, and Stephanie L PhD Sherman. "FMR1 and the Fragile X Syndrome: Human Genome Epidemiology Review." *Genet Med.* 3.5 (2001): 359–371.

DE GEYTER, Christian et al. "Similar Prevalence of Expanded CGG Repeat Lengths in the Fragile X Mental Retardation I Gene among Infertile Women and among Women with Proven Fertility: A Prospective Study." *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 16.5 (2014): 374–8.

DE RUBEIS, Silvia, and Claudia Bagni. "Regulation of Molecular Pathways in the Fragile X Syndrome: Insights into Autism Spectrum Disorders." *Journal of neurodevelopmental disorders* 3.3 (2011): 257–69.

DEVITT, Niamh Mc, Louise Gallagher, and Richard B Reilly. “Autism Spectrum Disorder (ASD) and Fragile X Syndrome (FXS): Two Overlapping Disorders Reviewed through Electroencephalography-What Can Be Interpreted from the Available Information?” *Brain sciences* 5.2 (2015): 92–117.

FILIPOVIC-SADIC, Stela et al. “A Novel FMR1 PCR Method for the Routine Detection of Low Abundance Expanded Alleles and Full Mutations in Fragile X Syndrome METHODS :” 408 (2010): 399–408.

FU, Ying-hui et al. “Variation of the CGG Repeat at the Fragile X Site Results in Genetic Instability : Resolution of the Sherman Paradox.” 67 (1991): 1047–1056.

GROSSO, Diana Carolina Gutierrez. “Relación Entre La Expresión Citogenética Del Sitio FRAXA (Xq 27.3) Con La Expresión Clínica, Y El Número de Repeticiones CGG Del Gen FMR1 Por Dos Técnicas Moleculares, En Familias Colombianas Con Miembros Afectados Con El Síndrome Del X Frágil.” UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, 2014.

HENS, Kristien, Hilde Peeters, and Kris Dierickx. “The Ethics of Complexity . Genetics and Autism , a Literature Review.” (2016): n. pag. Web.

HUNTER, Jessica et al. “Epidemiology of Fragile X Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *American journal of medical genetics. Part A* 164A.7 (2014): 1648–58..

JACQUEMONT, Sébastien et al. “Epigenetic Modification of the FMR1 Gene in Fragile X Syndrome Is Associated with Differential Response to the mGluR5 Antagonist AFQ056.” *Science translational medicine* 3.64 (2011): 64ra1.

JIN, Peng, Reid S Alisch, and Stephen T Warren. “RNA and microRNAs in Fragile X Mental Retardation.” 6.11 (2004): 1048–1053.

JIN, Peng, and Stephen T Warren. “Understanding the Molecular Basis of Fragile X Syndrome.” 9.6 (2000).

KANG, Seongman et al. “Pausing of DNA Synthesis in Vitro at Specific Loci in CTG and CGG Triplet Repeats from Human Hereditary Disease Genes *.” 270.45 (1995): 27014–27021.

KELLY, Veronica B, and a Salt. “Question 2. Should Fragile X Be Tested for in Boys with a Diagnosis of Autistic Spectrum Disorder?” *Archives of disease in childhood* 94.4 (2009): 323–4.

MADDALENA, Anne. “Clinical Significance of Tri-Nucleotide Repeats in Fragile X Testing : A Clarification of American College of Medical Genetics Guidelines.” (2008): 2006–2008.

MCCRAY, Alexa T, Philip Trevvett, and H Robert Frost. “Modeling the Autism Spectrum Disorder Phenotype.” *Neuroinformatics* 12.2 (2014): 291–305.

MOSS, J, and P Howlin. "Autism Spectrum Disorders in Genetic Syndromes: Implications for Diagnosis, Intervention and Understanding the Wider Autism Spectrum Disorder Population." *Journal of intellectual disability research : JIDR* 53.10 (2009): 852–73.

MUHLE, Rebecca, Stephanie V Trentacoste, and Isabelle Rapin. "The Genetics of Autism." *Pediatrics* 113.5 (2004).

O CONNELL, CD et al. "Standardization of PCR Amplification for Fragile X Trinucleotide Repeat Measurements *." *Clinical genetics* 10 (2002): 13–20.

OMS, Organizacion Mundial de la Salud. "Autism Spectrum Disorders." 2016. Web.
Payan, C., Saldarriaga, W., Isaza, C., & Alzate, A. "Estudio de Foco Endémico de Retardo Mental En Ricaurte, Valle." *Acta Biológica Colombiana* 6.2 (2011): 88.

PEPRAH, Emmanuel. "Fragile X Syndrome: The FMR1 CGG Repeat Distribution among World Populations." *Annals of human genetics* 76.2 (2012): 178–91.

REDDY, Kavita S. "Cytogenetic Abnormalities and Fragile-X Syndrome in Autism Spectrum Disorder." *BMC medical genetics* 16 (2005): 1–17.

RUTTER, M. Diagnosis and definition of childhood autism. "Diagnosis and Definition of Childhood Autism." *Journal of autism and childhood schizophrenia* 8.2 (1978): 139–161.

SALDARRIAGA, Wilmar et al. "Fragile X Syndrome." *Colombia Médica* 45.4 (2014): 190–198.

WHEELER, Anne C et al. "DSM-5 Changes and the Prevalence of Parent-Reported Autism Spectrum Symptoms in Fragile X Syndrome." *Journal of autism and developmental disorders* 45.3 (2015): 816–29.

WILSON, Jean Amos et al. "Consensus Characterization of 16 FMR1 Reference Materials : A Consortium Study." *The Journal of Molecular Diagnostics* 10.1 (2008): 2–12.

YRIGOLLEN, Carolyn M et al. "Transmission of an FMR1 Premutation Allele in a Large Family Identified through Newborn Screening: The Role of AGG Interruptions." *Journal of human genetics* 58.8 (2013)553–9.

ANEXOS

Anexo A. Permiso otorgado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander para el desarrollo de la presente investigación.

4110 *PH-*

Bucaramanga,

04 DIC 2015

Profesora
CLARA INÉS VARGAS CASTELLANOS
Investigadora principal
Directora Laboratorio Genética Humana
Facultad de Salud
Universidad Industrial de Santander
Presente

DIS-16642

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto, "Determinación del síndrome de x frágil en pacientes con autismo de la ciudad de Bucaramanga".

Cordial Saludo. El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión realizada el 27 de noviembre de 2015, según consta en el acta No. 28, evaluó los ajustes realizados al proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos del CEINCI-UIS, el Comité acuerda por consenso **AVALAR** el documento en última versión digital y **APROBAR** el consentimiento y asentimiento informado última versión.

Se recomienda aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.html>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

De igual manera emplear las estrategias que considere necesarias para verificar que el consentimiento y asentimiento informado ha sido comprendido por los participantes. De otra parte, adoptar los mecanismos necesarios para garantizar la confidencialidad de la información recabada. Todo ello amparado en lo reglamentado en la Ley Estatutaria 1581 de 2012 del Congreso de la República de Colombia, por la cual se dictan disposiciones para la protección de datos personales y en la Resolución de Rectoría 1227 del 22 de agosto de 2013, sobre el tratamiento de datos personales.

De otra parte, socializar los resultados generados en este proyecto en la unidad académica e instituciones participantes.

Se solicita que se remita al correo del Comité, información de las siguientes circunstancias, cuando lleguen a ocurrir:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo.

Elaboró Omaira M – reviso Dora I Parra- aprobó Francisco Espinel.

*NOARY
2015/11*

4110

- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.
- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido.
- El informe debe ser enviado al correo: ceinci.seguimientos@uis.edu.co.

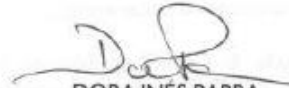
En el momento del seguimiento se verificará el cumplimiento de las consideraciones éticas.

En nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente,



FRANCISCO ESPINEL CORREAL
Presidente (e)
CEINCI- UIS



DORA INÉS PARRA
Secretaría Técnico Científica
CEINCI- UIS

Copia: Doctora Lina María Vera Cala, directora de Investigación y Extensión de la Facultad de Salud.
Archivo Comité de Ética – CEINCI-UIS