

ESTUDI D'UNA MALALTIA GENÈTICA

LA SÍNDROME X FRÀGIL

AUTORA: MARTA MONTES LUNA

TUTORA: ELENA PALMERO BLASCO

IES RAMON BARBAT MIRACLE

CURS 2005-2006

ÍNDEX

1- JUSTIFICACIÓ.....	p.02
2- INTRODUCCIÓ I CONEIXEMENTS PREVIS	
2.1. BASE GENÈTICA.....	p.03
2.2. BASE MUTACIONAL.....	p.08
2.3. LA SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÀGIL.....	p.12
3- OBJECTIUS.....	p.21
4- DISSENY DE L’EXPERIÈNCIA (TÈCNiques DE DETECCIÓ DE LA SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÀGIL).....	p.21
5- DESENVOLUPAMENT DE L’EXPERIÈNCIA.....	p.27
5.1. HISTÒRIA CLÍNICA DEL PACIENT ESTUDIAT.....	p.30
5.2. REALITZACIÓ D’UNA PCR.....	p.30
6- RESULTATS.....	p.39
7- CONCLUSIONS.....	p.45
8- AGRAÏMENTS.....	p.50
9- ANNEXOS.....	p.51
9.1. ANNEX 1: GLOSSARI.....	p.51
9.2. ANNEX 2: BIBLIOGRAFIA.....	p.55
9.3. ANNEX 3: <i>DIAGNÒSTIC REALITZAT A UN HOSPITAL DE TARRAGONA AL PACIENT ESTUDIAT AMB 3 ANYS I MIG D’EDAT</i>	p.57
9.4. ANNEX 4: <i>DIAGNÒSTIC REALITZAT A L’HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA AL PACIENT AMB 6 ANYS I MIG D’EDAT</i>	p.65
9.5. ANNEX 5: <i>RECULL DE LES NOTÍCIES MÉS IMPORTANTS DE GENÈTICA DELS s.XIX i XX. CLASSIFICADES PER ORDRE CRONOLÒGIC</i>	p.69

1. JUSTIFICACIÓ

Sembla mentida que ja estigui acabat el treball, si sembla que va fer ben poc que ens van fer escollir el tema a tractar. Vaig decidir que volia estudiar la malaltia que patia una família de la qual tenia coneixença: La Síndrome del cromosoma X Fràgil. Al principi, volia fer moltes coses i aspirar a algunes metes que eren pràcticament impossibles. Però, poc a poc, em vaig anar centrant i seleccionant les coses que estaven al meu abast i les que sense experiència com a professional o estudiant de biologia podria realitzar.

La finalitat d’aquest treball ha estat investigar una malaltia genètica que segueix unes pautes diferents a les altres malformacions genètiques que ocorren als cromosomes humans. També, fomentar l’interès per moltes malalties com aquesta que no són molt conegudes. L’anàlisi d’una família determinada afectada per la síndrome, a més de servir-me per a introduir-me en coneixements de genètica; m’ha permès endinsar-me també al de la biotecnologia. Cosa que, m’ha dut a plantejar-me el meu futur universitari.

Quant a dificultats, acotar del tema amb límits clars va ser el més difícil per a mi, ja que vaig haver de seleccionar el material que utilitzaria al treball, doncs havia trobat molta informació que fins després d’uns dies d’ordenació i classificació, no vaig saber suprimir-la.

Una altra de les dificultats amb les que em vaig trobar, va ser el anar a visitar a la Dra. Montserrat Milà al Hospital Clínic de Barcelona, degut a la llunyania i al temps que això comportava, entre d’altres, la pèrdua d’hores lectives. I un cop al laboratori de l’Hospital Clínic, em va costar molt habituar-me al llenguatge i totes les tècniques que utilitzaven les persones que treballaven allà. Per això, ara puc dir, que he hagut d’aprendre moltíssim per a realitzar aquest treball i, que ara estic orgullosa dels resultats.

La recerca d’informació no em va suposar gens costosa ja que, vaig decidir fer-la durant l’estiu i així després només hauria d’ordenar-m’ho i redactar-ho tot. Això no significa que ho fes tot a l’estiu, sinó que poc a poc hi vaig anar afegint petites coses, fins a trobar-me amb el que ara és el meu treball de recerca.

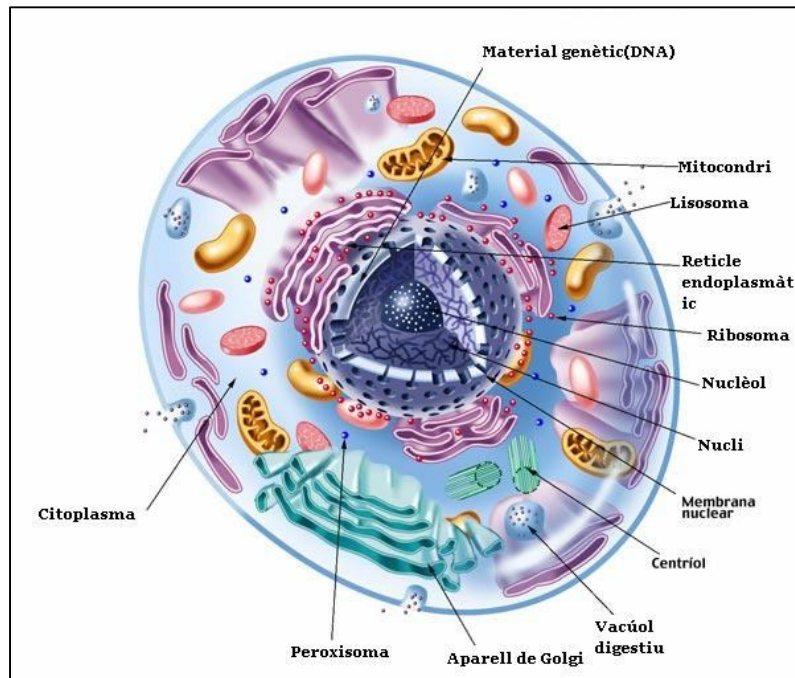
2. INTRODUCCIÓ I CONEIXEMENTS PREVIS

2.2. BASE GENÈTICA

La Síndrome X Fràgil és una malaltia genètica que es pot transmetre per persones de qualsevol sexe que no tinguin signes d’aquesta síndrome. Per entendre com succeeix, primer s’han de tenir uns coneixements bàsics sobre gens, cromosomes, etc. En general, sobre l’herència.

LA CÈL·LULA

El cos de cada persona està fet de milers de petites estructures anomenades cèl·lules. Hi ha molts tipus de cèl·lules, però en totes es poden distingir tres parts: membrana o coberta externa, citoplasma o contingut intern i nucli.



Parts d'una cèl·lula animal.

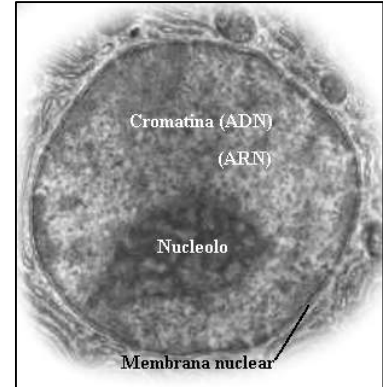
Com a resultat de la fusió d'un òvul i d'un espermatozoide, es va originar una cèl·lula ou o zigot precursora de totes les cèl·lules del cos. Evidentment, aquesta cèl·lula ha sofert un procés de divisió cel·lular, que ha comportat una sèrie de transformacions. Una de les més importants és la que sofreix el nucli, que conté la informació que serà transmesa a les cèl·lules filles per a poder viure. Per tant, aquestes cèl·lules filles hereten la informació genètica de la cèl·lula mare.

L'ADN

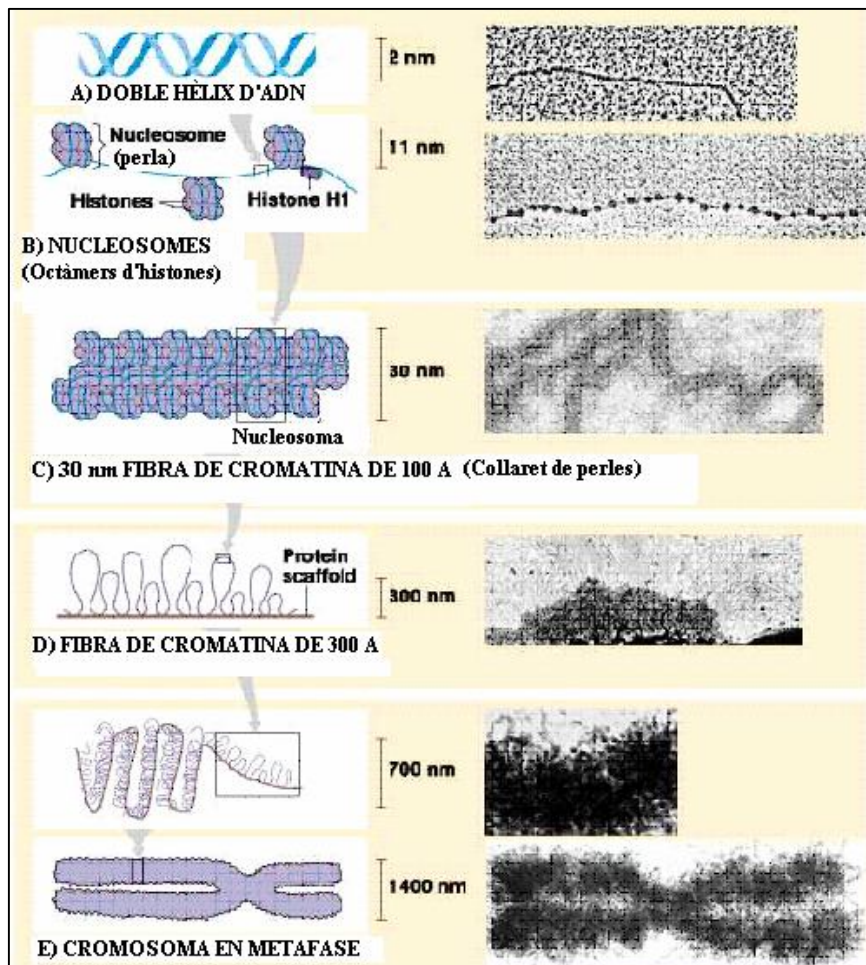
Dins del nucli de les cèl·lules del nostre organisme hi ha la nostra informació genètica en forma de gens, en una molècula anomenada ADN. L'ADN (àcid desoxiribonucleic) és un àcid

nucleic, al igual que l’ARN. És un polímer de quatre nucleòtids, cadascun dels quals està format per un sucre (desoxirribosa-fosfat) i una base nitrogenada (adenosina “A”, timina “T”, citosina “C” o guanina “G”). Les bases nitrogenades es llegeixen de tres en tres, de forma que el triplet o codó és la unitat del codi genètic. Alguns codons tenen el mateix significat, per això es diu que el codi és redundat, però, també és universal i vàlid per a tots els organismes.

Així doncs, l’ADN emmagatzema tota la informació genètica de cada individu, i és l’encarregat de l’herència, l’encarregat de transmetre aquesta informació de generació en generació. La molècula d’ADN està formada per dues llargues cadenes de polinucleòtids enrotllades amb bases nitrogenades complementàries. A les cèl·lules eucariotes l’ADN es troba en forma de cromosomes.



De la doble hèlix a la formació de fibres de cromatina i posteriorment, als cromosomes, se succeeixen una sèrie d'empaquetaments fins a obtenir una forma de bastonets anomenats cromàtides, que normalment van de dos en dos i estan unides per un punt anomenat centròmer. Això li dóna al cromosoma l'aspecte “x” amb el que acostumem a identificar-lo.

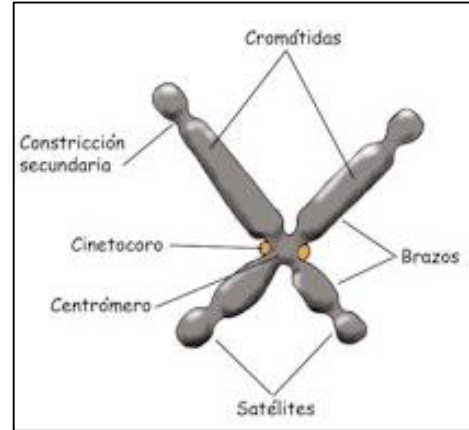


A la pàg. anterior: Dibuix amb la seva fotografia microscòpica corresponent dels cinc nivells d’empaquetament de cromatina.

ELS CROMOSOMES

El material genètic es troba en forma de cabdell. I només durant el procés de divisió cel·lular apareixen els cromosomes, que són estructures en forma de bastonet. Això és així perquè la funció dels cromosomes es facilitar la repartició de la informació genètica un cop finalitzada la divisió cel·lular. Hi ha dos fenòmens de divisió cel·lular: la mitosi i la meiosi. La diferència entre les dues es que en les cèl·lules filles aconseguides per la primera hi ha el mateix nombre de cromosomes que en la cèl·lula materna, i a la segona no.

Parts d’un cromosoma metafàsic.



En la reproducció sexual hi ha una unió entre gàmetes dels dos sexes. Aquestes cèl·lules reproductores, tenen la meitat de cromosomes; així, quan s’uneixen donen lloc a una cèl·lula amb igual nombre de cromosomes que la resta.

Un fenomen molt important per a l’evolució de les espècies és la recombinació que té lloc durant la meiosi. Aquest fenomen consisteix en la fragmentació dels cromosomes paternals i després, la formació d’un de nou barrejant-los. Així, s’aconsegueix un cromosoma nou constituït per una barreja d’un cromosoma patern i un de matern, i així quan neixen nous individus, aquests no són còpies exactes dels progenitors, sinó que tenen variacions, que junt amb les mutacions provoquen l’evolució de les espècies.

En totes les cèl·lules de l’espècie humana hi ha un total de 46 cromosomes, 44 autosomes i 2 cromosomes sexuals; al conjunt de l’anomena Genoma Humà. Com som una espècie diploide, el nostre genoma està format en realitat per dos jocs de 23 cromosomes homòlegs, un que ve de la nostra mare a través de l’òvul, i altre que ve del nostre pare a través de l’espermatozoide. Els cromosomes estan enumerats des de l’1 fins el 22. I el 23 és el parell de cromosomes sexuals (determinen el sexe de les persones). Les dones tenen dos cromosomes iguals X. I els homes, un X i un Y. Cada espècie té un nombre de cromosomes característic. Per ex: la mosca en té 12, la granota, 26; el gos i, els galls i les gallines, 78; etc.

L’ORÍGEN DE LA GENÈTICA

La genètica és la branca de la ciència que estudia els elements que regeixen el desenvolupament i el funcionament dels éssers vius, i els mecanismes de transmissió a la descendència. En medicina, l’aplicació dels coneixements genètics també es molt diversa. En

primer lloc, s'han identificat nombroses malalties que es basen en un defecte cromosòmic o una alteració genètica. Pel que fa a les alteracions cromosòmiques i genètiques causants de malalties, malauradament encara no hi ha procediments per a resoldre-les, ja que no es possible de modificar selectivament els cromosomes de l'organisme. Tanmateix, el fet d'identificar-les permet l'adopció de mesures terapèutiques per a guarir els trastorns orgànics que provoquen. I això és encara més transcendental quan permet de predir si un infant pot heretar un defecte d'aquest tipus, ja que aleshores es possible d'identificar immediatament l'alteració i actuar-hi.

Els estudis en aquest camp, començaren a mitjans del s.XIX amb les investigacions de Gregor Mendel (1822-1884). Els seus estudis es van centrar a investigar com es transmetien els caràcters biològics de la planta del pèsol. La intenció de Mendel era demostrar en el terreny experimental quin era l'origen de les espècies. En un dels seus experiment, Mendel va encreuar a progenitors que venien de races pures per a dues manifestacions del mateix caràcter. Una raça pura de pell llisa i una altra de pell rugosa. Tots els descendents que va obtenir de l'encreuament (F_1 o generació filial primera) tenien la pell llisa, per tant, era una generació uniforme. Al encreuar-los entre ells, obtenia una segona generació (F_2) amb la proporció de $\frac{3}{4}$ amb la pell llisa (75% llisos i 25% rugosos). A partir dels resultats dels seus experiments va enunciar diverses lleis, entre les quals destaquen les següents:

- 1ª LLEI : LLEI DE LA UNIFORMITAT DELS HÍBRIDS DE LA F_1 :

Quan s'encreuen dues races pures s'obté una generació homogènia.

- 2ª LLEI: LLEI DE LA SEGREGACIÓ:

Cada progenitor subministra una de les dues informacions del caràcter. Aquestes no es barregen i es transmeten independentment quan les cèl·lules germinals es formen. La meitat d'aquestes cèl·lules reben una informació i, l'altra meitat, l'altra informació.

- 3ª LLEI: LLEI DE LA INDEPENDÈNCIA:

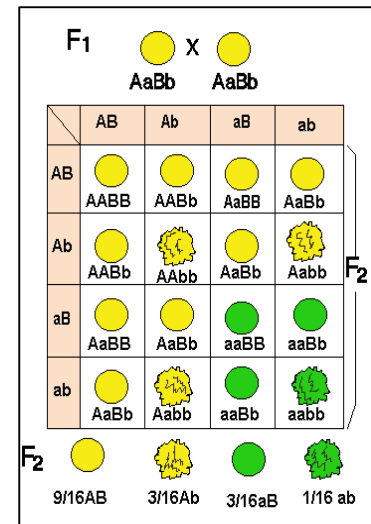
Els gens per a diferents caràcters s'hereten de forma independent: mantenen la independència a través de les generacions, ja que s'agrupen a l'atzar en els descendents.

El mateix Mendel va anomenar dominant al caràcter que preval a l'híbrid, y recessiu al que no es manifesta en ell. Cada factor hereditari o gen es pot simbolitzar amb una lletra, majúscula si és dominant i minúscula si és recessiu. Això sempre i quan estiguem parlant d'herència autosòmica, és a dir, la que afecta els gens localitzats als 22 parells de cromosomes homòlegs en tots els individus d'ambdós sexes. Segons el grau d'expressivitat d'un gen determinat podem dir que no sempre apareix la dominància. Sinó que molts cops hi ha una herència intermèdia. Com en el cas dels pètals de moltes flors, que presenten tres

manifestacions possibles: vermell, rosa, blanc. En altres casos, la situació és de codominància, en la que els dos caràcters es manifesten igual, com si tots dos fossin dominants alhora. És el cas, per exemple, dels grups sanguinis del sistema AB0.

A les dues primeres lleis, parla sobre l’herència d’un sol caràcter. Però, a la 3^a llei, parla sobre l’herència de dos caràcters. De l’encreuament dels progenitors, la F₁ manifesta el caràcter dominant i és homogènia. Però a la F₂, a l’autofecundació o encreuament consanguini sempre surten les proporcions següents (9:3:3:1).

Proporcions que surten a la F₂ de l’encreuament consanguini.

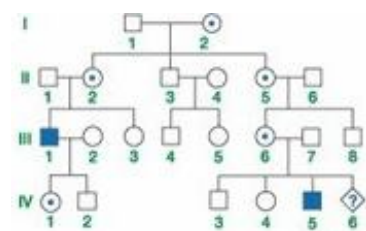


HERÈNCIA LLIGADA AL SEXE

És l’herència relacionada amb els gens corresponents als cromosomes sexuals. L’herència lligada al cromosoma Y (herència holàndrica, perquè no es transmet a les filles) es limita pràcticament a la determinació del sexe i la masculinitat. Però en aquest treball només s’estudiarà l’herència del cromosoma X. En aquesta, l’home s’anomena hemizigot, ja que només té un cromosoma X. En canvi, la dona pot ser homozigot o heterozigot. En l’herència lligada al sexe es fa una diferenciació entre herència dominant o recessiva lligada al sexe. En el cas de l’home, si un gen del seu cromosoma X és defectuós, sempre provocarà una malaltia, independentment que sigui dominant o recessiva. Veurem, que una de les característiques que fa diferent al Síndrome X Fràgil, és que apareixen homes transmissors o portadors no afectats per la malaltia. En el cas de la dona, un dels cromosomes X es manté inactiu, de manera que hi ha una 50% de probabilitat de transmetre el cromosoma amb el gen anormal. Hem de tenir en compte que sempre que vulguem parlar de percentatges d’un arbre genealògic, haurem de fer per separat els dels homes i els de les dones.

1. L’HERÈNCIA RECESSIVA LLIGADA AL CROMOSOMA X:

En aquest cas, les malalties solen afectar exclusivament als homes, mentre que són transmeses per dones portadores del gen defectuós, però que no pateixen cap alteració. Per a que una dona sigui afectada, ha de ser homozigot. Ha d’haver heretat el gen defectuós tant en el cromosoma X maternal com en el cromosoma X paternal, cas poc habitual. El resultat de la unió d’un home afectat i una dona sana, donarà filles portadores, mentre que tots els fills seran sans. Per una altra

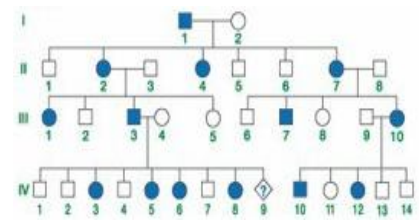


banda, al resultat de la unió entre una dona portadora i un home sa, hi haurà les mateixes possibilitats de tenir un fill sa, un fill afectat, una filla sana o una filla portadora. Alguns exemples de malalties són l’hemofília i el daltonisme.

2. L’HERÈNCIA DOMINANT LLIGADA AL CROMOSOMA X:

Mecanisme pel qual es produeix un nombre molt reduït de malalties, ja que tant els homes com les dones patiran la malaltia si reben un gen dominant dels seus progenitors. Les malalties que segueixen aquest patró hereditari són el doble de freqüents en les dones. No existeixen els portadors. Una altra diferència que presenta la Síndrome X Fràgil.

Un home afectat transmetrà el gen defectuós a totes les filles, que la patiran i la podran transmetre a fills mascles, els quals, i també llurs descendents, no la patiran. Una dona heterozigot té un 50% de probabilitats de transmetre el gen defectuós al seus descendents. Una dona homozigot transmetrà el gen defectuós a tots els descendents (afectats). Les malalties dominants lligades al cromosoma X solen ser molt més greus que les recessives i de vegades moltes d’elles letals per als embrions masculins.



2.2. BASE MUTACIONAL

1. APAREIX EL CONCEPTE DE MUTACIÓ

El 1901, Hugo de Vries, mentre que estava treballant en l'espècie vegetal “*Oenothera Lamarkiana*”, va trobar inesperadament entre la descendència d'aquesta, una forma gegant que va anomenar “Forma mutant”; creant el concepte de mutació. Definit com els canvis inesperats en la informació biològica.

2. QUÈ SÓN LES MUTACIONS I QUINA IMPORTÀNCIA TENEN ?

Les mutacions són alteracions a l'atzar (events accidentals) del material hereditari. Malgrat que, normalment són negatives per a l'individu, comporten un aspecte positiu per a l'espècie: constitueixen la base de la diversificació del material genètic que ha permès la evolució per selecció natural.

3. LLOC ON ES DONEN LES MUTACIONS

Les mutacions es poden donar en cèl·lules somàtiques (no sexuals), tret que les converteixin en cèl·lules cancerígenes, no tenen cap transcendència evolutiva. Mentre que, si

es donen en cèl·lules germinals, òvuls i espermatozoides, són molt importants perquè totes les cèl·lules, que després de la fecundació resulten de la divisió de l’ou o zigot; són portadores d’aquestes mutacions.

4. DE QUINA MANERA APAREIXEN ?

Les mutacions poden aparèixer espontàniament i llavors, s’anomenen mutacions naturals, o bé, poden ser provocades artificialment per radiacions o determinades substàncies químiques, i s’anomenen mutacions induïdes. Totes en conjunt s’anomenen agents mutàgens.

5. ELS AGENTS MUTÀGENS

Els agents mutàgens són els factors que augmenten l’aparició de mutacions. Poden ser agents físics, com les radiacions (Rajos X, UV, β ...), o bé; químics, com algunes substàncies químiques (el gas mostassa, el peròxid d’hidrogen, l’àcid nítrós...).

També hi ha uns altres agents mutàgens que són els genètics. Durant els primers temps de la Genètica (1900 a 1930) els investigadors van tractar de produir artificialment mutacions sense aconseguir-lo, fins que Muller al 1927 i Stadler al 1928 van demostrar els efectes mutagènics dels RAJOS X en *Drosophila*, blat de moro i ordi. H. J. Muller va rebre el Premi Nobel en 1946 pel seu descobriment de la inducció de mutacions mitjançant radiació amb RAJOS X.

Més tard, es va veure que altres formes de radiació, així com les temperatures elevades i diversos compostos químics, podien induir mutacions amb freqüència. El resultat de la mutació sol ser l’esterilitat o la manca de desenvolupament normal d’un organisme. Si les mutacions ocorren en els gàmetes sexuals, poden causar defectes de naixença. Si ocorren en les cèl·lules somàtiques, poden desencadenar un càncer. La taxa de mutació també s’incrementa per la presència d’al·lels específics de certs gens, coneguts com gens mutadors, alguns dels quals sembla ser que produeixen defectes en els mecanismes responsables de la fidelitat de la replicació de ADN.

6. INCIDÈNCIA

En els humans, la freqüència o taxa de mutació espontània calculada és 1:100.000 gens mutats per generació. I d’ordre 1:10.000.000 per generació, respecte al parell de bases de l’ADN. En canvi, les mutacions letals contingudes en un cromosoma sencer poden afectar a 1:100 gàmetes. Al llarg de la seva vida, un home adult acumula entre 10 i 100 mutacions de parells de bases en les seves cèl·lules somàtiques. S’ha de tenir en compte que conforme passen les generacions augmenta la seva incidència.

7. TIPUS DE MUTACIONS

N’hi ha de tres tipus diferents que es distingeixen segons l’extensió del material genètic afectat: Cromosòmiques, genòmiques i gèniques o puntuals.

- 7.1. MUTACIONS CROMOSÒMIQUES:

Són alteracions de la seqüència de gens d’un cromosoma. Aquestes, es poden observar al microscopi. Afecten a fragments de cromosoma, cromosomes sencers o a tot el seu conjunt. En general, les anomalies cromosòmiques són resultat d’un error produït durant el desenvolupament d’un òvul o cèl·lula espermàtica. Es desconeixen les causes d’aquests errors. No obstant això, fins a on se sap, tot el que faci o deixi de fer qualsevol dels pares abans de l'embaràs o durant el seu desenvolupament pot causar una anomalia cromosòmica en el seu fill. Les cèl·lules espermàtiques i els òvuls són diferents de les altres cèl·lules de l'organisme. Aquestes cèl·lules reproductores només tenen 23 cromosomes individuals. Quan un òvul s'uneix amb un espermatozou— i comença l'embaràs—formen un òvul fertilitzat amb 46 cromosomes. Algunes vegades, durant el procés de divisió cel·lular (concretament a la meiosi), es produeix un error que fa que un òvul o espermatozou quedi amb una quantitat de cromosomes anormal. Quan aquesta cèl·lula s'uneix amb un òvul o espermatozou normals, l'embrió té una anomalia cromosòmica. Les mutacions poden produir-se per:

- 7.1.1. PÈRDUA O ADDICIÓ DE FRAGMENTS:

- 7.1.1.1 DELECCIÓ: Pèrdua d’un fragment de cromosoma. Serà letal si el fragment conté una gran quantitat de gens o si afecta als dos cromosomes homòlegs.
- 7.1.1.2. DUPLICACIÓ: Presència repetida d’un fragment de la dotació cromosòmica, sobre el cromosoma original o sobre un altre.

- 7.1.2. CANVI EN LA LOCALITZACIÓ DE FRAGMENTS:

- 7.1.2.1 INVERSIÓ: És el canvi de sentit d’un fragment de cromosoma. No solen comportar perjudicis a l’individu, però si ho poden fer als seus descendents.
- 7.1.2.2 TRANSLOCACIÓ: Canvi de lloc o posició d’un fragment a un altre cromosoma. Tampoc solen afectar als individus, però si poden als seus descendents. Amb freqüència poden ser recíproques, que és quan es produeix per intercanvi de segments entre dos cromosomes no homòlegs.
- 7.1.2.3 TRANSPOSICIÓ: Quan tan sols hi ha translocació d’un segment a un altre lloc del mateix cromosoma o d’altres, però sense reciprocitat.

- 7.2. MUTACIONS GENÒMIQUES:

Són alteracions del nombre de cromosomes propi d’una espècie.

- 7.2.1. ANEUPLOÏDIA: És la falta o l’excés d’un dels cromosomes. Causada per una segregació anormal en la meiosi. És l’alteració en el nombre normal de cromosomes (dos). Quan en lloc de dos cromosomes de cada parell, no n’hi ha cap, es diu nul·lisomia; o n’hi ha un només (monosomia); tres (trisomia), etc. Generalment, la aneuploïdia és letal però, en els casos en els que no es produeix inviabilitat dels fetus, origina grans anomalies o síndromes. En els següents esquemes, tenim les aneuploïdies més freqüents tant en els autosomes, com en els cromosomes sexuals; en l’espècie humana i els seus efectes.

a) ALTERACIONS EN ELS AUTOSOMES:

Síndrome	Mutació	Característiques fenotípiques
<u>Síndrome de Down</u>	Trisomia del parell 21	Retard mental, cap ample y cara arrodonida
<u>Síndrome de Edwards</u>	Trisomia del parell 18	Boca y nas petits, deficiència mental, lesions cardíques, membrana interdigital. Poca viabilitat.
<u>Síndrome de Patau</u>	Trisomia del parell 13	Llavi leporí, paladar esquerdat, deficiències cerebrals y cardiovasculars. Poca viabilitat.

b) ALTERACIONS EN ELS HETEROCROMOSOMES:

Síndrome	Mutació	Característiques fenotípiques
<u>Síndrome de Klinefelter</u>	Un o més cromos. X en excés	Sexe masculí. Esterilitat, deficiències mentals y alguns caràcters sexuals secundaris femenins.
Síndrome de Turner	Monosomia del cromosoma X.	Sexe femení amb un sol cromosoma X, esterilitat, baixa estatura, tòrax ample.
Síndrome de doble Y	Dos cromosomes Y (XYY)	Varons d’estatura elevada, es relaciona amb una major agressivitat, baix coeficient mental.
Síndrome de triple X	Tres cromosomes X	Sexe femení amb òrgans genitals atrofiats, fertilitat limitada. Baix coeficient mental.

- 7.2.2. EUPLOÏDIA: És l’alteració en el nombre normal de dotacions haploides (jocs de cromosomes) d’un individu. La monoploïdia o haploïdia és l’existència d’un sol exemplar de cada tipus de cromosomes. La poliploïdia és la de més de dos exemplars de cada tipus (triploïdia, tetraploïdia, etc.). És freqüent en plantes i rara en animals. S’origina per meiosi anormals que formen gàmetes no reduïts o bé, per duplicació espontània dels cromosomes en les cèl·lules somàtiques.

• 7.3. MUTACIONS GÈNIQUES O PUNTUALS

Una mutació gènica o puntual es produeix quan una seqüència de nucleòtids d’un gen és

alterada. Per tant, es modifica l’estructura de l’ADN. Una substitució pot passar desapercebuda, però també poden donar-se alteracions importants en la funció biològica de la proteïna. Es classifiquen en els grups següents segons el tipus d’alteració per:

- SUBSTITUCIÓ DE BASES: Canvi d’una base per una altra a l’ADN. Es distingeixen dos tipus segons el tipus de bases (pirimidíniques “T i C” o púriques “A i G”):
 - TRANSICIONS: Canvi d’una purina per una altra, o bé, canvi d’una pirimidina per una altra.
 - TRANSVERSIONS: Canvi d’una purina per una pirimidina, o a l’inrevés. Provoquen l’alteració d’un únic triplet (ex. CCG).
- PÈRDUA (DELECCIÓ) O INSERCIÓ (ADDICCIÓ) DE NUCLEÒTIDS: Es tracta del guany o pèrdua d’un o més nucleòtids. Al llegir-se el material genètic de tres en tres (triplets), es produeix un corriment en l’ordre de lectura alterant tots els triplets següents, a no ser que el nombre de nucleòtids guanyats o perduts, siguin múltiples de tres.

Quan un gen muta s’anomena mutant i aquest es transmet a la generació següent. El gen parental és el silvestre. Hi ha tres tipus de mutacions: Regressives, que produeixen un efecte negatiu o fins i tot la mort; progressives, que produeixen un efecte positiu; i silencioses, que produeixen alteracions a la seqüència de nucleòtids de l’ADN, però no al fenotip estudiat.

- SISTEMES DE REPARACIÓ DE LES MUTACIONS GÈNIQUES O PUNTUALS:

L’ADN-polimerasa és un enzim que té una activitat exonucleasa anomenada correcció de proves. Consisteix en el fet que l’ADN-polimerasa, abans d’afegir un nou nucleòtid, comprova si l’anterior és correcte., substituint-lo pel correcte, si és incorrecte. Per evitar les equivocacions de l’ADN-polimerasa, hi ha un sistema d’enzims, anomenat sistema de reparació, que constantment revisa l’ADN acabat de sintetitzar i repara les lesions possibles.

2.3. LA SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÀGIL

2.3.1 - DESCRIPCIÓ BREU DE LA SÍNDROME -

Una síndrome és simplement una agrupació que pot estar formada per trets físics, de comportament i intel·lectuals que es donen en una mateixa persona. La Síndrome X Fràgil (FRAXA) és la segona causa més important de retard mental; després la síndrome de Down o Trisomia 21 que és la més prevalent. La principal diferència entre les dues síndromes és que la Síndrome de Down no s’hereta, és a dir, no es transmet de generació en generació. Encara

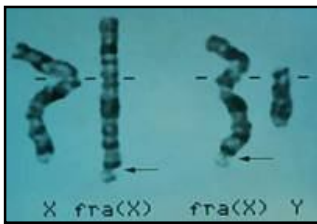
que, pot haver-hi uns casos que sí. I en canvi, la Síndrome X Fràgil és un retard mental que s’anirà heretant a la família.

2.3.2 - ORÍGEN DE LA MALALTIA -

- 1943 : MARTIN I BELL

Es descriu la clínica de la malaltia. Hi havia uns nens amb uns trets clínics característics (trets dismòrfics) i que la malaltia era familiar. És a dir, apareixia en un o més mascles d’una mateixa família. Es va anomenar la Síndrome de Martin-Bell.

- 1969: LUBS – Estudi citogenètic



Es va correlacionar aquests nois malalts amb un marcador cromosòmic i es van fer els cariotips. En ells es va observar visualment que de vegades, apareixia el cromosoma X trencat. Per això se li va dir la Síndrome del cromosoma X Fràgil i es va associar a aquests mascles malalts.

Fotografia feta amb un microscopi electrònic del cromosoma X fràgil.

- 1977: SHUTHERLAND

Es confirma el marcador i es publica que la manifestació del lloc fràgil o la fragilitat depèn del medi de cultiu, és a dir, que només apareixia quan les cèl·lules es cultivaven en un medi pobre en àcid fòlic.

- 1991: OBERLÉ, VERKEREK i YU

Descripció del defecte a nivell molecular mitjançant estudis de bandatge més resolutius.

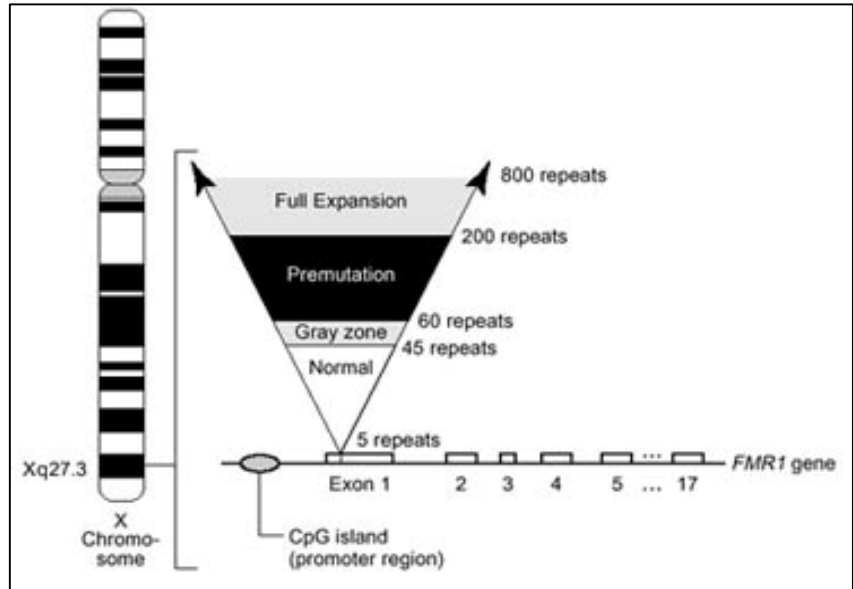
El defecte molecular és una mutació dinàmica en el gen FMR1 (de l'anglès Familiar Mental Retardation gene 1) i, consisteix en una quantitat augmentada de repeticions del triplet CGG en una regió no codificant d’aquest gen, que està situat en la porció terminal del braç llarg del cromosoma X. Aquesta síndrome es segrega com dominant lligat al X amb penetrància reduïda o incompleta, ja que ambdós sexes, quan impliquen la mutació X fràgil, poden presentar deficiència mental. Al 1994 i, a partir d’aquí, es van començar a fer diferents estudis constantment en models animals, com per exemple, un ratolí nul.

2.3.3 - CAUSES –

La síndrome del cromosoma X Fràgil segueix una pauta de mutació dinàmica. En molts tipus d’aquestes mutacions, s’ha donat que totes tenen unes característiques en comú, com l’expansió d’un triplet, que són malalties neurològiques, s’utilitza la tècnica de imprinting per a detectar-les i, que segueixen l’herència mendeliana, però presenten el fenomen de

l’anticipació i, tampoc no es pot distingir entre portador i afectat genèticament (homogeneïtat genètica).

La principal causa la síndrome del cromosoma X Fràgil és la falta d’una proteïna anomenada FMRP. L’ARNm corresponent al gen FMR-1 s’expressa en diversos teixits i òrgans adults: el cervell, pulmó, placenta, ronyó, teixit connectiu i testicles. La FMRP està absent en teixits derivats de pacients X fràgil amb al·lels amb mutació completa. No obstant això, la majoria dels símptomes clínics estan restringits al cervell. Aquesta proteïna resulta vital per al funcionament dels ribosomes.



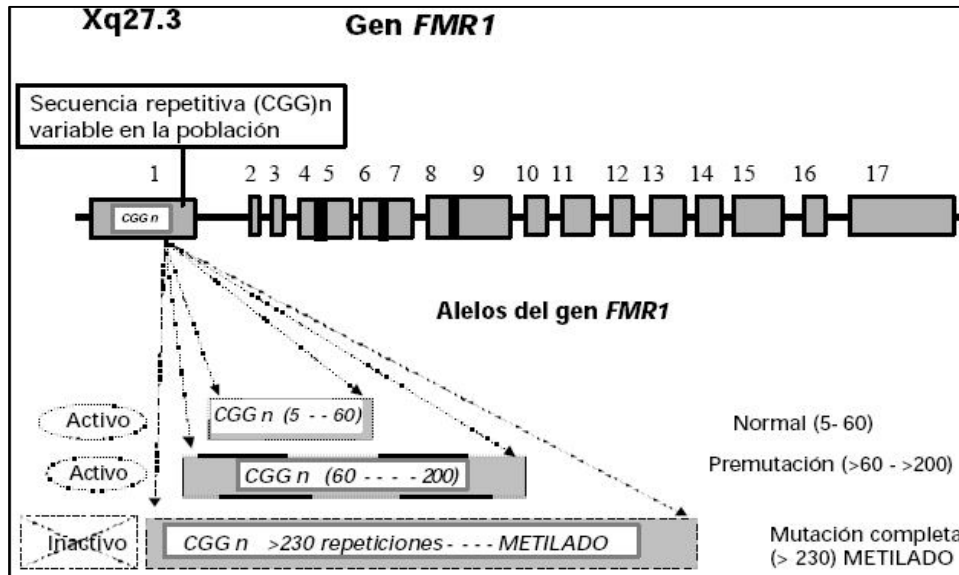
Imatge 2

Se sap en l'actualitat que aquesta mutació està produïda inicialment per l'excés de repetició d'un triplet de les bases nitrogenades CGG. Això fa que es produeixi una hipermetilació en la "illa CpG"², adjacent a aquesta repetició, a 250 parells de bases de distància; impeding la transcripció i traducció del gen FMR-1. Aquest gen es veu anul·lat i no pot exercir la seva funció, fabricar la proteïna FMRP identificada en diferents teixits. El nombre de repeticions CGG és polimòrfic en totes les poblacions humanes. Els més freqüents tenen 29 repeticions i, els diferents al·lels es classifiquen en quatre categories:

- Individus normals: aprox. 5-52 repeticions CGG.
- Amb premutació: aprox. 50-200 repeticions CGG. (s'inestabiliza l'ADN, tendència del segment de ADN expandit a canviar el nombre de repeticions amb la transmissió hereditària una vegada més)
- Pacients amb FRAXA: aprox. > 200 repeticions , que implica la mutació del gen FMR-1 . (Es metila el promotor i s'inactiva la transcripció).

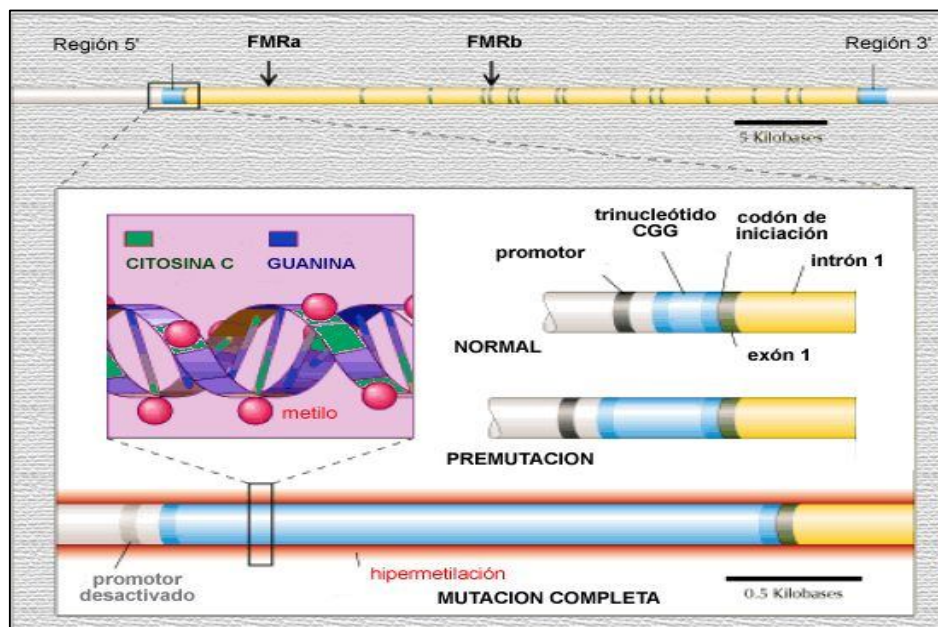
ESQUEMA:

(CGG) _n	ISLA CpG	FMRP	ESTATUS	FENOTIPO
6 - 52	NO METILADA	+	N	N
50 - 200	NO METILADA	+	P	N
> 200	HIPERMETILADA	-	M	♂ A ♀ N/A



El gen FMR1 se situa en el cromosoma X, específicament en Xq27.3 i codifica una proteïna anomenada FMRP. Abasta 38 kb i consta de 17 exons. L'exó 1 és molt ric en citosina i guanina; en la regió 5' no traduïda (UTR) del mateix es troba un tros que es repeteix el trinucleòtid CGG (citosina-guanina-guanina) en tàndem.

Hi ha una zona no molt bé establerta que es denomina "zona grisa" i varia d'uns individus a uns altres, però que pot estar compresa entre 37 i 54 repeticions de CGG, en el qual el pas de normal a premutat se solapa i és difícil de definir.



Estructura i localització del gen FMR-1 i diferents expansions CGG en el gen FMR-1.

També hi ha mosaics de metilació, on els pacients que presenten la mutació completa, tenen diferents línies cel·lulars. S'ha proposat que la metilació variable en el locus FRAXA és responsable de la diversitat fenotípica de la síndrome, ja que comporta un grau diferent d'expressió de la proteïna FMRP.

En l'àmbit molecular, la majoria dels individus amb aquesta síndrome presenten dos tipus d'alteracions associades amb el locus FMR-1, la primera, la metilació anormal d'una regió en Xq27.3 rica en CpG; i la segona, l'amplificació del triplet CGG en la regió 5' no traduïda (UTR) del locus FMR-1.

Encara que la SXF està causat en la seva major part per expansions- metilacions, hi ha un 2% aproximadament de mutacions en el gen FMR-1 que poden donar lloc a aquesta síndrome. Aquí estan incloses les deleccions i les mutacions puntuals.

2.3.4 - HERÈNCIA (Com es transmet un X fràgil?) -

S'hereta com un trastorn mendelià de tipus dominant lligat al cromosoma X, amb penetrància incompleta diferent segons el sexe (80% dels mascles presenten Retard Mental i només el 30% de les dones) i expressivitat variable (diferent expressió clínica). També, amb anticipació. És una tipus d' herència lligada al sexe, inusual i única.

És molt particular perquè poden haver-hi:

- Homes i dones: Normals
- Homes i dones: Portadors/es
- Homes i dones: Afectats/des



A partir de 1991, la troballa de la mutació i la inestabilitat del triplet CGG, va permetre explicar la paradoxa de Sherman. Una mare portadora posseeix dos cromosomes X, té un 50% de probabilitat de transmetre la mutació als seus fills/es en cada embaràs. Si un dels cromosomes X té la mutació, sempre tenen l'altre cromosoma X que pot suplir i tancar l'anomalia del seu parell. La Síndrome X Fràgil està lligat a un desordre del cromosoma X. Un home portador de la premutació la transmetrà a totes les seves filles i no als seus fills, ja que a ells els hi passarà el seu cromosoma Y.

Les filles d'aquests mascles portadors i mares normals, no estan afectades. Ara bé, les filles de mares portadores i pares normals, tenen un risc d'un 30% de patir la síndrome.

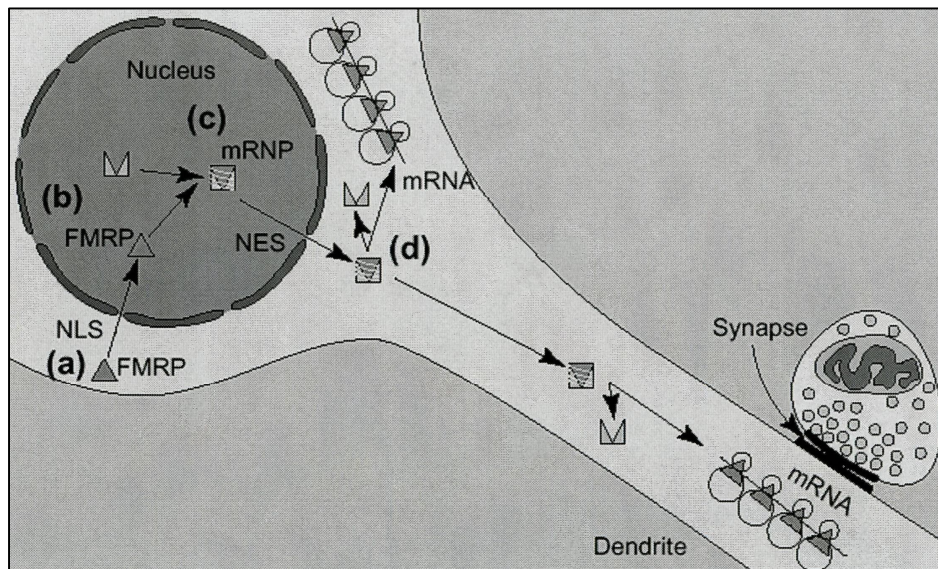
2.3.5 - FENOTIP (CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques) -

Anomenem fenotip al conjunt de manifestacions externes: signes i símptomes. Les manifestacions externes poden ser d'índole molt variada, així com trets físics que es veuen a simple vista, malformacions internes, perfil cognitiu o de conducta característic, etc.

A la Síndrome del cromosoma X Fràgil, les manifestacions clíniques més severes són les derivades de l'afectació neurològica. Un criteri important respecte al fenotip és el de la

evolutivitat: Els signes i símptomes són variables al llarg del temps. És a dir, en diferents etapes evolutives, una síndrome pot presentar fenotips diferents i, contradictoris.

En els estudis de laboratori efectuats amb ratolins nuls per al gen, s'ha apreciat un defecte en les espines dendrítiques, pel que es postula que la falta de FRMP tindria un efecte negatiu sobre la correcta sinapsis¹ i que aquesta seria la causa última dels trastorns cognitius i de conducta de la síndrome.



El fenotip de la síndrome X Fràgil en dones és més subtil que en mascles. El 85% de les dones heterozigotes semblen normals fenotípicament, però presenten problemes d'aprenentatge i de relació social. El fenotip més freqüent es caracteritza pel retard mental i algunes característiques físiques i facials.

1. CARACTERÍSTIQUES FÍSIQUES:

- Facials:
 - Cara allargada asimètrica.
 - Llavis fins.
 - Mandíbula prominent.
 - Facies acromegaloides en adults.
 - Front ampli.
 - Orelles grans i prominents.
 - Estrabisme.
- Cerebrals:
 - Disminució del vermis cerebelar posterior.
 - Augment de grandària del quart ventricle.

- Augment de grandària del nucli caudat.
- Atròfia frontal i parietal mitjana.
- Disminució del volum del girus temporal superior amb l'edat.
- Augment de volum en el hipocamp.
- Genitals:
 - Macroorquidisme postpuberal en varons. (tenen els testicles molt grans)
 - Disfunció ovàrica en dones.
 - Menopausa prematura en dones portadores.
- Cap:
 - Macrocefalia.
 - Dolicocefalia.
- Boca:
 - Dentició irregular.
 - Fissura del paladar.
- Pell:
 - Hiperpigmentación periorbital i escrotal.
 - Excessivament suau i llisa en les mans.
- Esquelètiques:
 - Escoliosis.
 - Peus poden ser plans i zambes.
- Oïda:
 - Otitis mitjanes recurrents en la primera infància (hipersecreció).
 - Problemes auditius derivats de la otitis mitja.
- Articulars
 - Inestabilitat articular.
 - Hiperlaxitud articular en les mans.
- Musculars:
 - Hipotonía en la infància.
- Cardíacs:
 - Prolapse de la vàlvula mitral (50%)
 - Dilatació de l'aorta ascendent.
 - Buf cardíac.

2. CARACTERÍSTIQUES PSICOLÒGIQUES:

- Neurologies:
 - Retard mental (lleuger-mig)

- Comportament hiperactiu en la infància.
- Falta de concentració.
- Curts períodes d’atenció
- Problemes d’aprenentatge.
- Alteracions del llenguatge. Llenguatge pobre.
- Parla reiterativa característica, amb veu brega.
- Trets autistes amb falta de relació social (mutisme).
- Convulsions i epilepsia.
- Agressivitat.
- Contacte ocular escàs (Eviten la mirada)
- Esteriotípies manuals:
 - Onicofagia primerenca (menjar-se les ungles).
 - Colpejar amb les mans
 - *Flapping* (agitar les mans)
 - Es mosseguen les mans
- Impulsivitat
- Timidesa i ansietat social
- Retenció de memòria
- Dificultat d’adaptació als canvis (preferència per les rutines)
- Imitació o mimetisme

2.3.6 - INCIDÈNCIA O EPIDEMIOLOGIA-

La incidència d’afectats, a la nostra població, es va definir fent un screening en 5000 recent nascuts (Rife *et al.*, 2000). El resultat obtingut va ser 1 de cada 2500 mascles i 1 de cada 8000 dones. El perquè a l’existència de més mascles afectats que dones afectades es deu a que hi ha una penetrància reduïda. És a dir, les dones no sempre manifesten la clínica. Ja que dels seus dos cromosomes X, en poden activar (passar a la descendència) un o l’altre. De manera que només es manifesta la malaltia si s’activa el cromosoma X afectat. L’home afectat, com la seva dotació cromosòmica XY sempre porta un “X”. Sempre estarà afectat. En el cas dels portadors s’estima 1 cada 260 dones i 1 per 800 homes.

2.3.7 - TRACTAMENT / SEGUIMENT MÈDIC -

A l’actualitat no existeix cap cura de la síndrome, però si que es fan alguns tractaments. Quan ja ha nascut el malalt, és possible tractar els problemes associats, com la

hiperactivitat i el dèficit d’atenció, els problemes del llenguatge, alteracions del comportament o les complicacions mèdiques més freqüents.

El tractament passa per la teràpia gènica, bé introduint la proteïna deficitària, bé invertint l'estat de hipermetilació causant de la inactivació del gen. Aquest és el futur i en aquesta via es troben els diferents equips d'investigació. En un principi, aquesta seria una cura radical de la malaltia.

Avui dia si que es fa el tractament simptomàtic amb la utilització de fàrmacs, com els psicotrops o els anticonvulsionants, encara que en molts casos és ineficaç. Alguns d’ells són el metilfenhidat, la melatonina, l'àcid fòlic, etc.

Hem de tenir en compte que a més d'una escolarització adequada a les seves capacitats, aquests nens precisen suport logopèdic per als trastorns de llenguatge; suport psicològic per a les dificultats de conducta i de relació; psicomotricitat en molts casos. La pedagogia d'aquests pacients s’ha d'adequar a la seva capacitat intel·lectual i a les peculiaritats conductuals del nen. A més de tenir una previsió de futur enfocant les seves capacitats laborals.

2.3.8 - PRONÒSTIC I MESURES PREVENTIVES-

Com més aviat es diagnostiqui la SFX, el pacient té bones possibilitats d’eleva el seu coeficient mental i la seva capacitat d’expressió, cosa que comportarà una millor relació familiar i social. S’haurà d’estudiar a tots els membres de la família que estiguin amb risc de ser portadors o lleugerament afectats la síndrome X Fràgil. Un cop s’ha detectat un afectat de la SFX podem optar per no tenir aquest fill, per adoptar-ne un, per la donació de gàmetes, en la què als NTM agafen esperma donat per algú sa; o bé, en el cas de les dones premutades o afectades, optar per la donació d’òvuls.

També podem optar per un dels dos tipus de test genètic: El diagnòstic prenatal (analitzar si hi ha mutació fràgil X abans que el nen neixi), és possible en qualsevol persona que demostrï que és portadora de la mutació fràgil X. Inclou l'anàlisi citogenètic i el de l'ADN directe del fetus en fase de desenvolupament. Aquest, es fa a les 10 setmanes mitjançant una CHORIONIC VILLUS SAMPLING (CVS). I l’altre es fa a les 14-16 setmanes mitjançant una Amniocentèsis. Després hi ha un altre que és el diagnòstic preconcepcional, basat en l’estudi genètic de l’òvul abans de la fertilització i posterior FIV amb els òvuls sans; i, el preimplantacional (DGP). Aquest últim és una tècnica diagnòstica basada en la anàlisi genètica d’un embrió obtingut per FIV i la posterior transferència dels embrions genèticament sans i viables.

3. OBJECTIUS

Els objectius d’aquest treball són els següents:

1. Estudiar una malaltia de base genètica, la Síndrome del Cromosoma X Fràgil, en una família determinada de la qual es té coneixença.
2. Aquesta malaltia té un tipus d’herència lligada al sexe, inusual i única. Tot i ser, herència lligada al sexe, no segueix les pautes. En l’herència dominant lligada al sexe, no apareixen homes portadors, ni tampoc dones afectades que aquesta malaltia presenta.
3. S’investigarà sobre el arbre genealògic d’aquesta família en concret i, les proves realitzades als diferents individus de la família fins a l’actualitat. També s’investigarà, sobretot, sobre les principals manifestacions de la malaltia en un individu en concret i la evolució d’aquest.
4. Tractament de les tècniques experimentals de genètica molecular utilitzades actualment per a la detecció d’aquesta malaltia. En concret, la PCR (Polymerase Chain Reaction).
5. Un altre objectiu que es vol assolir en aquest treball és la divulgació d’aquest treball de manera que es pugui fer servir com una petita guia per a aquelles persones relacionades o interessades en la Síndrome del Cromosoma X Fràgil.

4. DISSENY DE L’EXPERIÈNCIA

• TÈCNIQUES DE DETECCIÓ DE LA SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÀGIL

El consell genètic, el diagnòstic prenatal durant la gestació i la possibilitat de diagnòstic preimplantacional són una realitat l’eficàcia de la qual depèn que siguem capaços de detectar com més aviat millor als nens afectats.

4.1.1. UNA MICA D’HISTORIA

Des dels anys 70 fins que és descrit el defecte molecular en 1991, l’únic mitjà diagnòstic consistia a efectuar un cariotip (tècnica citogenètica) amb cultiu pobre en àcid fòlic. El cariotip són tots els cromosomes d’un individu. Aquest examen es fa per a identificar anomalies cromosòmiques. Pot realitzar-se amb una mostra de sang, medul·la òssia, líquid amniòtic o teixit de la placenta. L’X Fràgil no es pot observar en totes les cèl·lules, sinó que només es veu entre un 4 i un 50% de les estudiades en homes (XY). No obstant això, aquest

mètode solament posa de manifest l'afectació en el cas de mutacions completes. Els portadors no són detectats per aquesta tècnica, ni tampoc els mascles transmissors normals (NTM: de l'anglès “normal transmitting male”) i recordem que una premutació en una dona, pot transmetre la mutació completa a la seva descendència. També, el percentatge de fragilitat del cromosoma X és baix. Tampoc serveix per al diagnòstic prenatal. A partir de 1.992, es va començar a utilitzar el mètode directe d'anàlisi d'ADN, que són les tècniques actuals de genètica molecular, determinant el nombre de repeticions del triplet CGG. Mitjançant estudi de l'ADN ofereixen un diagnòstic de gran seguretat. S'utilitzen dues tècniques d'estudi, l'anàlisi Southern blot i l'anàlisi PCR. En 1995 es publicà la tècnica per a determinar l'expressió de la proteïna FMRP a partir d'anàlisi immunohistoquímics en sang. A partir d'aquí, van quedar obertes noves vies de diagnòstic, valorant l'expressió de la FMRP no solament en sang, sinó en altres teixits, ajudant a un millor coneixement de la fisiopatologia de la Síndrome.

A les possibilitats diagnòstiques apuntades fins al moment s'afegeix en l'actualitat la possibilitat d'efectuar el diagnòstic preconcepcional o preimplantacional; la tècnica es basa en l'estudi genètic d'embrions fecundats *in vitro* i l'elecció i transferència a l'úter d'aquells que no estiguin afectats per la mutació ni la premutació. El diagnòstic solament pot oferir-se de manera segura mitjançant tècniques de genètica molecular. En la tasca de diagnosticar a totes les persones afectades per la malaltia amb la finalitat d'efectuar el pertinent consell genètic.

4.1.2 TÈCNiques DE DETECCIÓ D'ANOMALIES GENÈTIQUES

Aquestes tècniques es basen en l'anàlisi de l'ADN. La identificació amb ADN es basa en l'estudi d'una sèrie de fragments d'ADN presents en tots els individus però que posseeixen la característica de ser altament variables o polimòrfics entre els mateixos. L'anàlisi d'un determinat nombre d'aquestes seqüències o fragments d'ADN permet identificar a un individu amb una probabilitat molt propera al 100%. Així, analitzant un determinat nombre de regions polimòrfiques, la probabilitat que dos individus siguin genèticament iguals és pràcticament nul·la (excepte en el cas de bessons univitalins).

1. PCR

Una PCR (Polymerase Chain Reaction o 'Reacció en Cadena de la Polimerasa') és fer un nombre enorme de còpies d'un gen. És a dir, és una veritable fotocopiadora molecular. El resultat de l'anàlisi és un patró genètic compost per dues bandes (o al·lels); cadascuna aportada per un progenitor. Per això és necessari tenir bastant plantilla per a començar a

ordenar. Permet determinar amb precisió el nombre de repeticions de CGG per a al·lels normals, de la zona grisa i els de premutació.

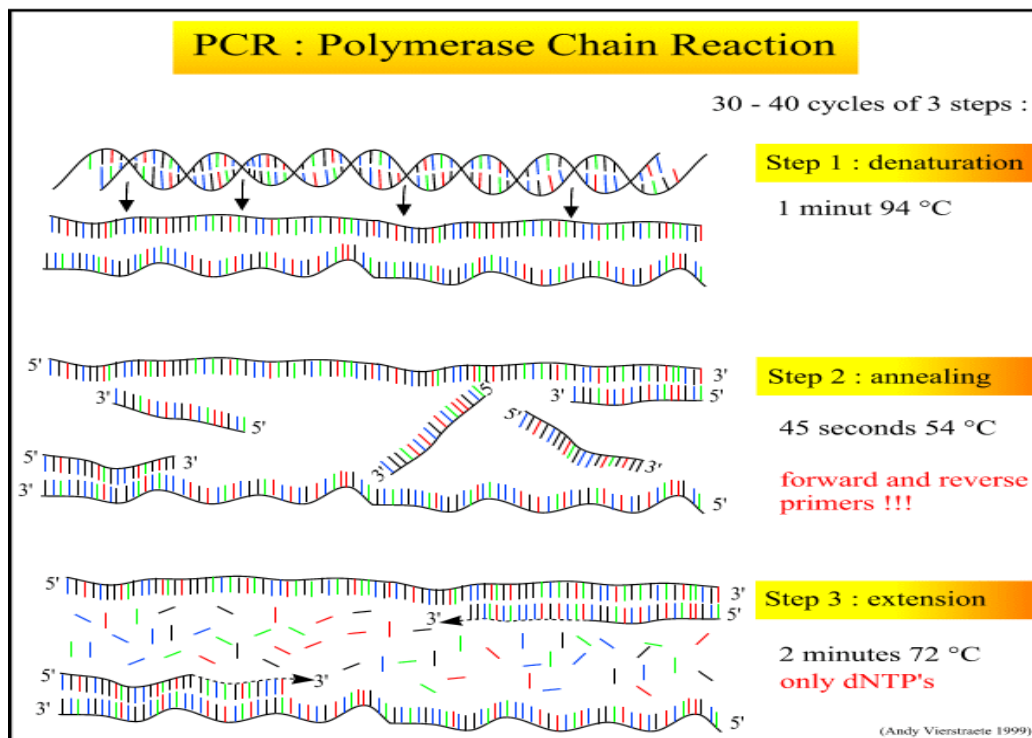
METODOLOGIA:

- Les reaccions que completen un cicle: Hi ha tres passos importants en un PCR, que es repeteixen per a 30 o 40 cicles. Això es fa en un cycler automatitzat, que pot escalfar i refrescar els tubs amb la barreja de reacció en una estona molt curta.

- Desnaturalització a 94°C

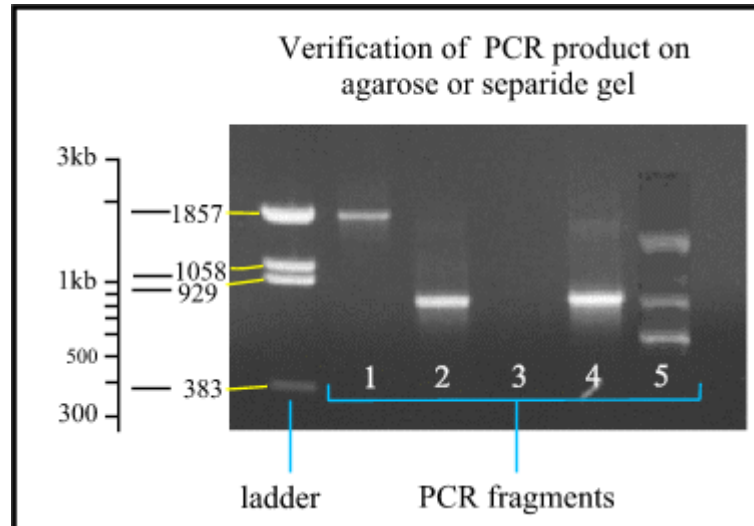
- Annealing a 54°C

- Extensió a 72°C



Després de la seva separació en un gel, tècnica del Southern-blot, poden distingir-se fragments de longitud diferent per una sola repetició de CGG. Aquesta és la raó per la qual l'anàlisi amb PCR permet realitzar una determinació bastant exacta del nombre de repeticions de CGG per a al·lels normals i premutacions. Una forma eficaç de visualitzar els productes PCR del FMR-1 és utilitzar una sonda que s'uneixi a la cadena de repeticions de CGG. L'exposició a la pel·lícula de RAJOS X produeix una o dues bandes o cap. Com norma, l'anàlisi amb PCR no detecta les mutacions completes de manera fiable, així que l'absència d'una banda suggereix una mutació completa en un baró. La presència de la mutació completa ha de confirmar-se amb la tècnica d'absorció per southern-blot. En una dona amb mutació completa, el resultat de la PCR sembla igual (una sola banda) que en una altra amb dues al·lels normals amb el mateix nombre de repeticions de CGG. Quan ambdós filaments es copien

durant la PCR, hi ha un augment exponencial del nombre de les còpies del gen. Si suposem que hi ha solament una còpia del gen desitjat abans que el començament que completa un cicle, després d'un cicle, allí sigui 2 còpies, després de dos cicles, allí sigui 4 còpies, tres cicles



donaran lloc a 8 còpies, etc.

Verificació del producte de PCR en gel d'agarosa: L'escala és una barreja de fragments amb la grandària sabuda a comparar amb els fragments de PCR. Es veu que la distància entre els diversos fragments de l'escala és logarítmica. Carril 1: El fragment de PCR és aproximadament 1850 bases de llarg. Carril 2 i 4: els fragments són aproximadament 800 bases de llarg. Carril 3: no es forma cap producte, així que el PCR va fallar. Carril 5: es formen les bandes múltiples perquè un dels ajustaments de les cartilles en diversos llocs.

2. SOUTHERN-BLOT

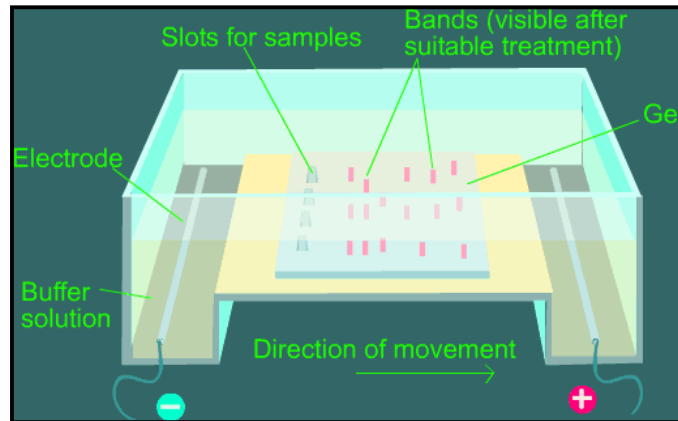
Aquesta tècnica és la més utilitzada per a identificar mutacions completes i grans premutacions i determinar si el gen està metilat. És doncs, una tècnica que permet la identificació de seqüències específiques d'ADN, mitjançant l'ús d'electroforesi en gel i d'hibridació utilitzant sondes específiques. Aquesta tècnica consta bàsicament de les següents etapes:

1. Digestió del ADN amb enzims de restricció després d'aconseguir extreure un ADN d'alta molecularitat.

La mostra es talla en trossos de moltes grandàries, utilitzant certs enzims (tisores biològiques) que reconeixen i tallen determinades seqüències d'ADN. Entre els milions de fragments d'ADN que es produeixen hi ha alguns que contenen la secció del gen FMR-1

amb la repetició de CGG. Quan no hi ha mutació, aquests fragments de FMR-1 són d'una sola grandària coneguda. Si existeix la mutació, els fragments són més llargs. A més, els fragments del gen FMR-1 que estan metilats poden distingir-se per la seva grandària dels quals no estan metilats perquè una dels enzims utilitzats no pot tallar si hi ha metilació.

2. Separació dels fragments obtinguts per mitjà d'una electroforesi en gel d'agarosa.



Dibuix esquemàtic d'una cubeta d'electroforesi.

Tots els fragments d'ADN de la barreja se separen per grandàries utilitzant un corrent elèctric per a fer-los passar a través d'un material gomós porós anomenat gel. Cada mostra d'ADN s'introdueix en un “pocet” en la part superior del gel i baixa per un "carrer" estret del gel. Els fragments curts van més ràpidament i més lluny que els llargs. La llarga extensió de fragments d'ADN resultant pot veure's aplicant-li un colorant de color taronja brillant. En aquest punt, els fragments de FMR-1 són indistingibles dels altres fragments de ADN.

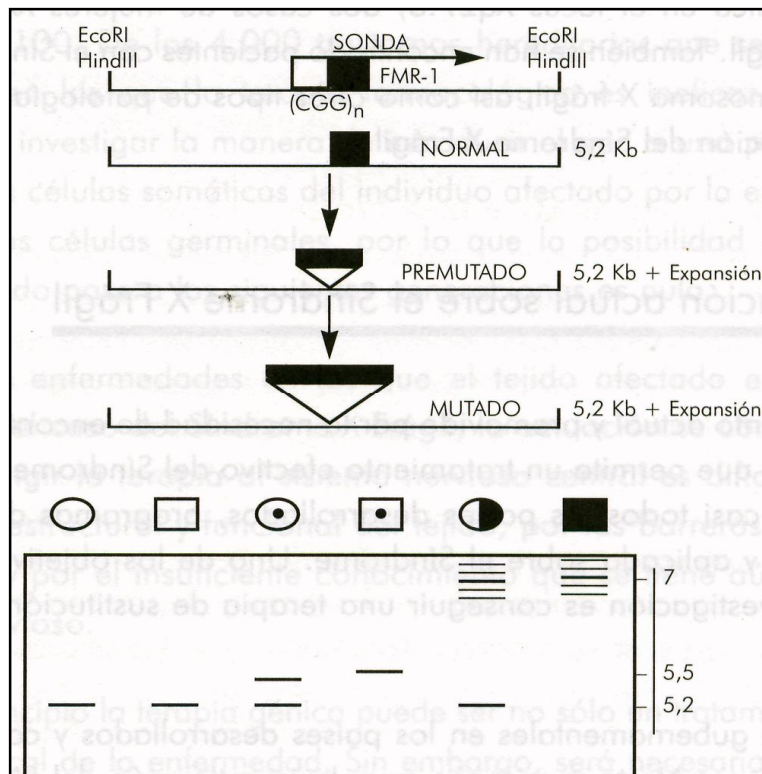
3. Desnaturalització dels fragments separats i tallats.
4. Transferència de les cadenes simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon i fixació de les mateixes per mitjà de calor (80°C).

La tira de fragments d'ADN es traspasa per absorció a una fulla fina de paper de nylon.

5. Prehibridació amb sondes d'ADN inespecífic per a bloquejar els llocs d'unió inespecífics que pogués haver en la membrana.
6. Marcatge de la sonda de la nostra seqüència amb nucleòtids radioactius (^{32}P normalment).

La membrana de nylon es xopa amb una sonda del gen FMR-1 marcada amb una substància radioactiva. La sonda reconeix els fragments coincidents del gen FMR-1, als quals s'uneix estretament, s'hibrida.

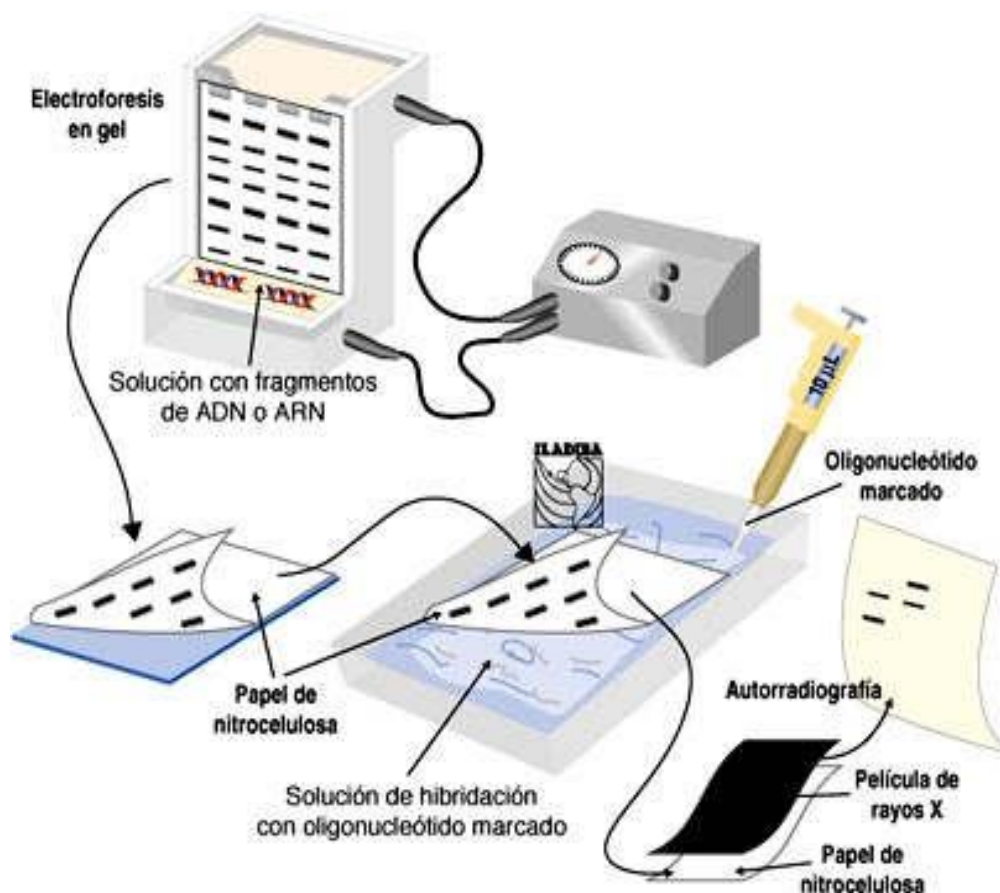
7. Hibridació de la sonda marcada i desnaturalitzada amb els fragments d'ADN fixats a la membrana, i rentat de la membrana per a eliminar l'excés de sonda o aquelles que hagin hibridat malament.
8. Revelat en placa radiogràfica i interpretació dels resultats.



L'esquema de la imatge indica el gen Fmr-1, els llocs de tallament en la zona FRAXA dels enzims de restricció EcoRI i EagI, utilitzats en l'anàlisi per Southern-blot, i els resultats de l'estudi en els diferents tipus de mostres possibles.

L'exposició de la fulla de nylon a la pel·lícula de RAJOS X produeix unes línies (bandes) curtes horitzontals de color negre en la pel·lícula que es corresponen amb les posicions dels fragments del gen FMR-1 del pacient. Aquestes bandes creen un patró vertical que és diferent en funció de la presència o absència d'una mutació, del tipus de mutació, de l'estat de metilació i del sexe del pacient. És necessari tenir precaució al interpretar un patró que suggereixi l'existència d'una petita premutació. Pot veure's una lleugera separació de dues bandes no metilades quan dos al·lels normals o un al·lel normal i altre de "zona grisa" tenen

grandàries bastant diferents. Per a determinar exactament el nombre de repeticions de CGG en al·lels amb premutació o en zona grisa, és necessari l'anàlisi amb PCR.

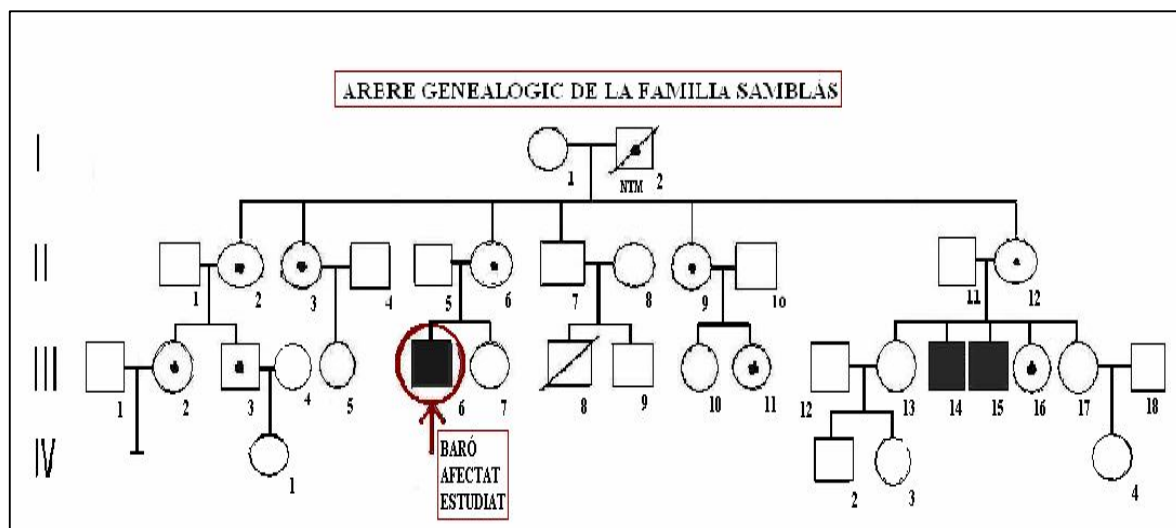


L'esquema mostra els diferents passos que se segueixen en la realització d'un Southern-Blot.

5. DESENVOLUPAMENT DE L'EXPERIÈNCIA

Degut a la coneixença de la família Pinel Samblàs, i sabent que patia una malaltia hereditària, es va decidir estudiar la malaltia existent a la seva família, de la qual eren portadors o afectats molts dels familiars.

Així doncs, el primer que es va fer, vas ser preguntar quina malaltia era i de què es tractava. Els familiar van proporcionar molta informació, entre aquesta, la que els metges els hi havien donat en visites anteriors. A partir d'aquí, es va decidir estudiar principalment a un dels fills (l'individu III-6 que veurem a l'arbre genealògic següent) de la família Pinel Samblàs en concret, que era afectat de la síndrome del cromosoma X Fràgil. Així que, el segon que es va fer, va ser preguntar als diferents membres de la família Samblàs sencera sobre el seu estat d'afectació, portació o no afectació. Gràcies a això es va poder elaborar el següent arbre genealògic de la família:



En genètica, un arbre genealògic o pedigree consisteix en un diagrama on es resumeixen els aspectes més importants, la història, sobre les malalties patides pels membres d’una família. Amb la utilització d’un seguit de símbols que estan normalitzats, situant els símbols de cada generació als diferents nivells i enllaçant-los amb diversos tipus de línies segons el parentiu, s’obté una representació de tota la família, tan ampla com sigui possible.

A la següent taula s’ha fet un recollit dels símbols més utilitzats per a l’elaboració d’aquest arbre genealògic. En alguns casos, s’observen dues representacions diferents, depenent de si ha estat la utilitzada per a realitzar aquest arbre, o els de consell genètic de les conclusions del treball.

LA TAULA IL·LUSTRA ALGUNS DELS SÍMBOLS QUE S’UTILITZEN EN L’ELABORACIÓ D’ARBRES GENEALÒGICS	
SÍMBOL	SIGNIFICAT
 / 	HOME SA
 / 	DONA SANA
  i  	PORTADOR / A O AFECTAT/ ADA (DEPENDRÀ DEL N° CGG I DE LA INACTIVACIÓ DE L’X)
 i  / 	AFECTAT / AFECTADA

 i 	MORT / MORTA
	AVORTAMENT INDUÏT
NTM	HOME TRANSMISOR NORMAL (PORTADOR)

Per a fer una primera valoració de l'individu afectat se sol usar una taula amb les característiques més freqüents a la Síndrome X Fràgil, , puntuant-les amb un valor d'O, 1 o 2 segons es mostra en la taula següent. És necessari puntuar cadascuna de les característiques i sumar el total, pot ser molt útil per a realitzar una aproximació a la síndrome, abans de realitzar el diagnòstic genètic. Per tant, en el següent quadre podem observar les característiques clíniques o símptomes que presenta el noi estudiat actual (18 anys), els que va presentar anteriorment i, els que no presenta. En un estudi amb 107 mascles retardats, fixant-se en les característiques més importants que sol presentar el síndrome, Hagerman, Amiri i Cronister van observar que el 45% dels homes amb puntuacions iguals o superiors a 16 punts, i un 60% d'aquests, amb 19 punts o més en la suma total, patien la SXF.

CARACTERÍSTIQUES VALORABLES

CARACTERÍSTIQUES DEL SÍNDROME X-FRÀGIL	PUNTUACIÓ		
	NO OBSERVABLE A L'ACTUALITAT [0 PUNTS]	APAREIXIA AL PASSAT O LLEUGERAMENT [1 PUNT]	APAREIX A L'ACTUALITAT CLARAMENT [2 PUNTS]
RETARD MENTAL			X (C.I: 65)
HIPERACTIVITAT		X	
PROBLEMES D'ATENCIÓ			X
MOVIMENTS AMB LES MANS			X
MOSSEGAR-SE LES MANS	X		
CONTACTE VISUAL ESCÀS			X
PARLA REITERATIVA			X
ARTICULACIONS HIPEREXTENSIBLES		X	
ORELLES GRANS I PROMINENTS		X	
TESTICLES GRANS			X
DEFENSES TÀCTILS			X
DERMATOGLIFITS SIMPLES O PLEGAMENT PLANTAR		X	
HISTORIA FAMILIAR DE RETARD			X
TOTAL	20 PUNTS		

Diagnòstic realitzat el dia 3/1/06 al pacient afectat estudiat.

• **5.1. HISTÒRIA CLÍNICA DEL PACIENT ESTUDIAT**

La història de la família Samblàs va començar quan els familiars de l’individu III-6 (II-11 i II-12 de l’arbre genealògic de la família), van començar a sospitar sobre la aparició d’una malaltia hereditària a la família. Per això, la mare dels individus III-14 i III-15 va decidir fer-se un anàlisi de sang als 8 mesos d’embaràs del primer fill. Al haver-li diagnosticat al seu fill una malaltia genètica, la mare del nostre pacient estudiat (II-6), va decidir fer-se una amniocentesis. Aquesta, en efecte, va donar resultats que verificaven l’aparició d’una malaltia genètica al seu futur nadó. Aquest, va néixer i, entre els 9 i 12 mesos, es va realitzar els primers anàlisis de sang a la Clínica Monegal de Tarragona. També, li van fer un electroencefalograma i varies radiografies. Però, en aquestes no es va poder determinar la malaltia que patia. Llavors, els pares del individu III-6 van portar al seu fill a l’I.C.A.S.S., on se li van fer proves de psicomotricitat i de logopedia quan tan sols tenia 2 anys. Allà, se li va donar un C.I. de 33. Més tard, quan el nen ja tenia entre 3 i 4 anys, van ser cridats per la Dra. Milà, a la qual se li havia concedit una beca per l’estudi d’aquesta malaltia. Llavors, van anar a l’Hospital Clínic de Barcelona. Allà se li van fer diferents tests de diagnosi, els quals podem observar detallats a l’ANNEXE 1. I també, un anàlisi de sang, pel qual no van haver de omplir cap formulari ni sol·licitud. Els resultats del anàlisi, realitzat per PCR i SOUTHERN-BLOT, van trigar entre 10 i 14 dies en donar els resultats detallats de la situació clínica de l’afectat. Un cop diagnosticada la malaltia, la síndrome del cromosoma X Fràgil, els seus pares van decidir portar al seu fill, quan tenia ja 5 anys, a l’hospital on s’havien fet les proves els seus cosins (III-14 i III-15), a l’Hospital San Juan de Reus. Allà el tracta un metge neuròleg actualment. A partir d’aquí, la resta de la família es va dirigir a l’Hospital Clínic de Barcelona per ser diagnosticats. Els resultats s’observen a l’arbre genealògic. Als 8 anys, l’individu estudiat, tenia un C.I. ja de 55 i, als 13, aquest va augmentar fins al 65. Als 16 anys, se’l va definir com un individu amb un C.I. de 75, i no se li tornarà a fer una valoració fins a l’any 2008. Per una altra banda, la noia III-2 es va realitzar una amniocentesis i posteriorment un avortament a un hospital de València.

• **5.2. REALITZACIÓ D’UNA TÈCNICA MOLECULAR: PCR**

Degut a la coneixença de la família Pinel Samblàs, es va poder contactar amb la Dra. Milà de l’Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. La qual, es va oferir a ajudar en alguns àmbits d’aquest treball. Es van fer quatre reunions amb ella, en les què es van tractar temes diversos: La primera, que va servir com a presentació dels objectius d’aquest treball i

explicació dels trets més característics de la Síndrome X Fràgil, es va gravar amb una camera de vídeo digital per a poder utilitzar les explicacions, posteriorment, al treball. Però, a la segona, un cop al laboratori de genètica de l’Hospital Clínic i, amb l’ajuda d’un membre de l’equip de la Dra. Milà; es va fer una PCR:

- REACTIUS:

- Gel d’agarosa 1-2%(segons el tamany del fragment de PCR) amb Bromur d’Etidi, un agent mutàgen:
- 18 tubs (1 per pacient, excepte un que és H₂O, per veure que no s’ha contaminat la mostra) i a cadascun les següents quantitats:
 - Desoxirribonucleòtids trifosfats (dNTPs): 1.5 µl (microlitres)
 - Tampó comercial (TPO): 3 µl
 - Primers (P: Forward i Reverse): 3 µl
 - Una altra solució Tampó (TPO GC): 3 µl
 - Aigua (H₂O): 0.5 µl
 - Taq ADN-polimerasa (T): 0.18 µl
 - Motllo de DNA de cada pacient: 0.8 µl

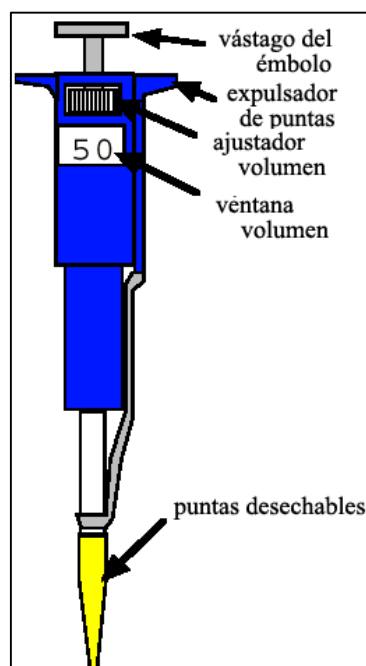


- MATERIAL EMPRAT:

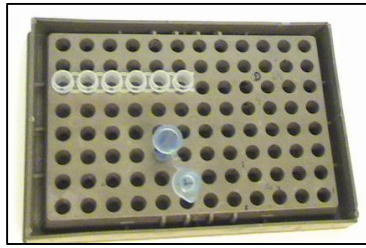
- Tubs eppendorfs de diferents colors per identificar els diferents reactius:
- Diferents micropipetes i puntes amb filtre:
- Cubeta d’electroforesis:



- Font d’electroforesis:



- Placa o cartilla per dipositar els tubs:



- Termociclador:



- Centrifugadora:



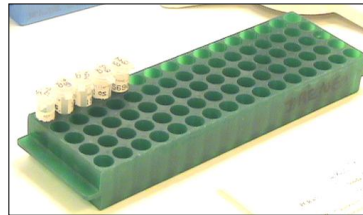
- Tubs per les mostres de sang:



- PROTOCOL:

A la PCR s'amplificarà un fragment de la regió 5' no traduïda (UTR) del gen FMR-1, on es troba el triplet polimòrfic CGG.

1. A partir de les mostres de sang dels pacients fem una extracció d'ADN de cadascuna.



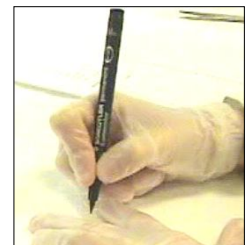
2. Preparem els tubs eppendorfs que farem servir per als diferents reactius.



3. Numerem la tira on ficarem les mostres dels diferents pacients, per identificar-los.

4. Agafem les quantitats necessàries per a cada reactiu:

4.1. Agitem la mostra per a homogeneïtzar correctament les solucions:



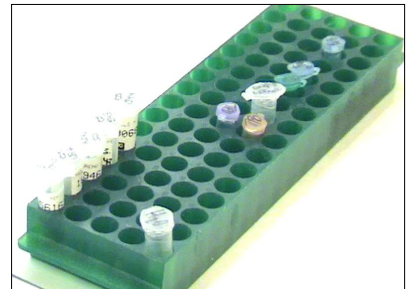
4.2. Agafaem una punta per a la micropipeta:



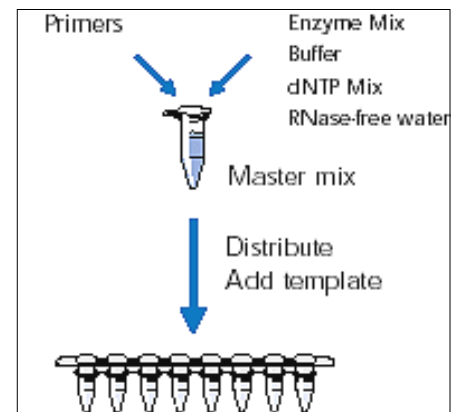
4.3. Pipetejem la quantitat necessària i la fem en un tub eppendorf:



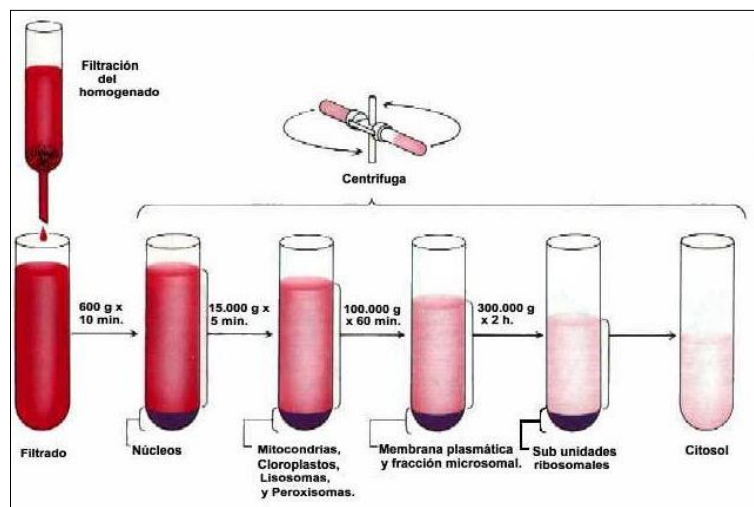
5. Obetnim tots els reactius amb les seves quantitats:



6. Fem una mix dels reactius seguint un ordre en concret d’afegiment, en total seran uns 24.8 μ l per a cada mostra de sang. Afegim aquesta mix a cada tub de mostra d’ADN dels pacients.



7. Fiquem les mostres obtingudes a una centrifugadora, per a que no quedin restes a les parets dels tubs.



8. Fiquem els tubs amb les barreges anteriors a una placa per a termociclador. I agitem:



9. Ara ja tenim totes les mostres preparades per iniciar el procés a un termociclador. La reacció consta de cicles de tres etapes (cada una a diferent temperatura). Quan arribi als 40 cicles aproximadament, haurà amplificat exponencialment el fragment d’ADN que nosaltres volíem:



Abans d’explicar els processos que fa un termociclador, hem de tenir en compte el següent:

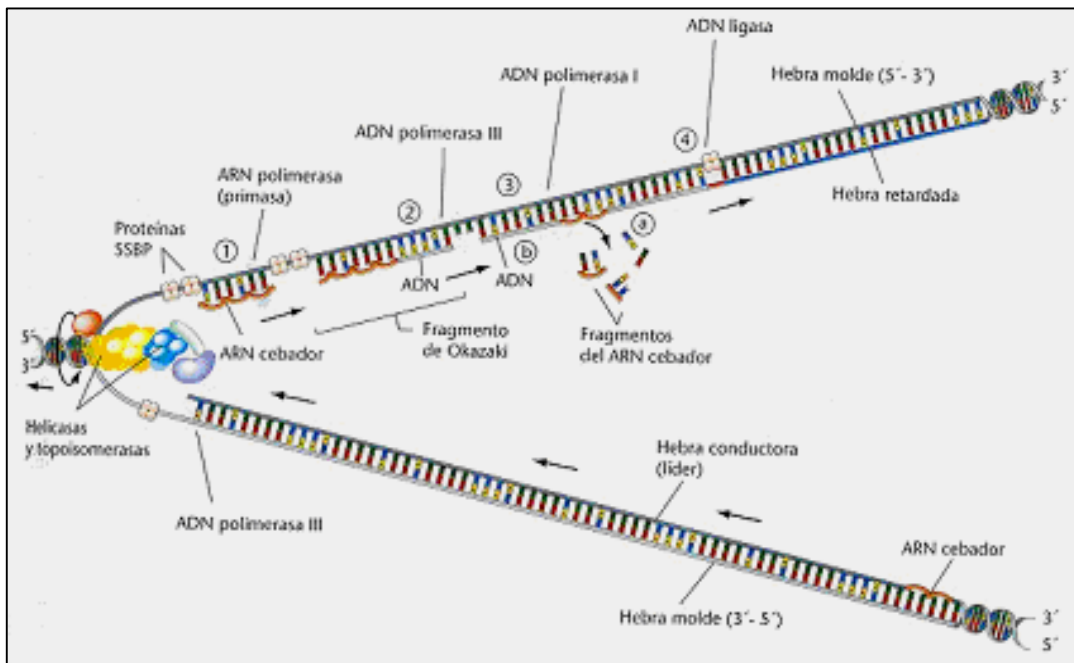
Kornberg va estudiar el mecanisme de com a partir d’un filament s’hi anava sintetitzant a sobre del nou filament complementari i antiparal·lel; l’enzim que regulava aquest procés. A aquest, el va aïllar i el va anomenar l’enzim ADN-polimerasa a partir del bacteri *Escherichia coli*. Afegeix nucleòtids a l’extrem que presenta lliure el carboni 3’ del nucleòtid (ja que, és incapaç d’afegir-los al que presenta el carboni 5’), d’una cadena preexistent anomenada ADN encebador o *primer*. Així doncs, la cadena de l’ADN encebador tan sols pot créixer en el sentit 5’ → 3’.

- Duplicació de l’ADN:

Cal recordar que és circular i ocorre en tres etapes:

A la primer etapa es produeix la desnaturalització i obertura de la doble hèlix. En els punts ori-c o punts d’iniciació, on es creen les bombolles de replicació. Intervenien un grup d’enzims i proteïnes. Primer, intervenen les helicases que faciliten el desenrotllament trencant els ponts d’hidrogen entre els dos filaments complementaris. Segon, actuen les girases i topoisomerases, que eliminen la tensió generada per la torsió en el desenrotllament, tallant i després tornant a empalmar. Tercer, actuen les proteïnes estabilitzadores (SSB) que s’uneixen als brins motlle perquè no torni a enrotllar-se la cadena. A la segona etapa es produeix la síntesi de dues noves cadenes d’ADN. Primer actuen les ADN-polimerases per a sintetitzar les noves cadenes en sentit 5’-3’, ja que la lectura es fa en el sentit 3’-5’. Tot seguit intervenen les ADN-polimerases I i III, que s’encarreguen de la replicació i correcció d’errors. Després, actua

l’ADN-polimerasa II, corregint danys causats per agents físics. La cadena 3’-5’ és llegida per l’ADN-polimerasa III. La cadena 5’-3’ no pot ser llegida directament, això se soluciona llegint petits fragments (fragments d’Okazaki) que creixen en el sentit 5’-3’. A la tercera etapa, com que l’ADN-polimerasa III és incapaç d’iniciar la síntesi per si sola, necessita un encebador o *primer* (ARN) que és sintetitzat per una ARN-polimerasa (Primasa). Aquest encebador és eliminat posteriorment. És la etapa de correcció d’errors. L’enzim principal és l’ADN-polimerasa III, que corregeix tots els errors comesos en la replicació o duplicació. Intervenen altres enzims com les endonucleases que tallen el segment erroni. ADN-polimerasas I que emplenen correctament el buit. Apareix l’ADN- ligasa que uneix els extrems corregits.

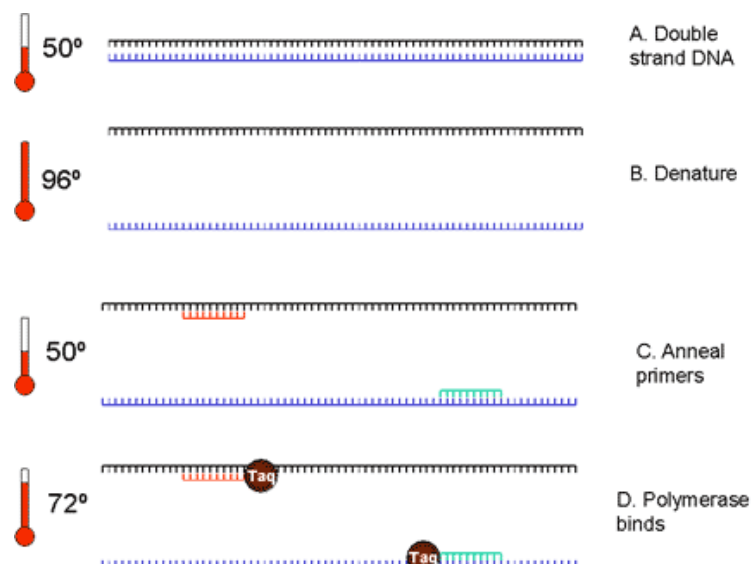


Les tres etapes que fa el termociclador, doncs, són les següents:

- I. Desnaturalització d’ADN: Separació de les dues cadenes de l’ADN.
- II. Annealing: Hibridació dels encebadors o *primers*. Els primers s’uneixen a les dues cadenes corresponents separades en l’etapa anterior. Un dels primers es diu Forward, i l’altre Reverse; i van en sentits oposats.
- III. Síntesis de l’ADN: Etapa catalitzada per l’ADN polimerasa.

- Cicles seguits pel termociclador:

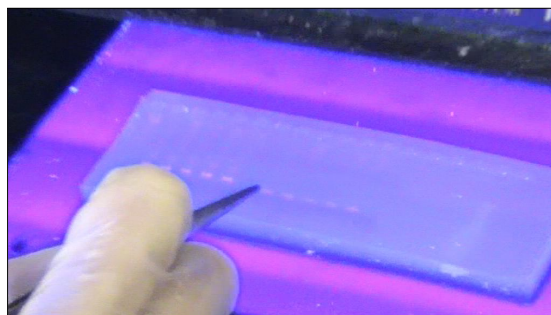




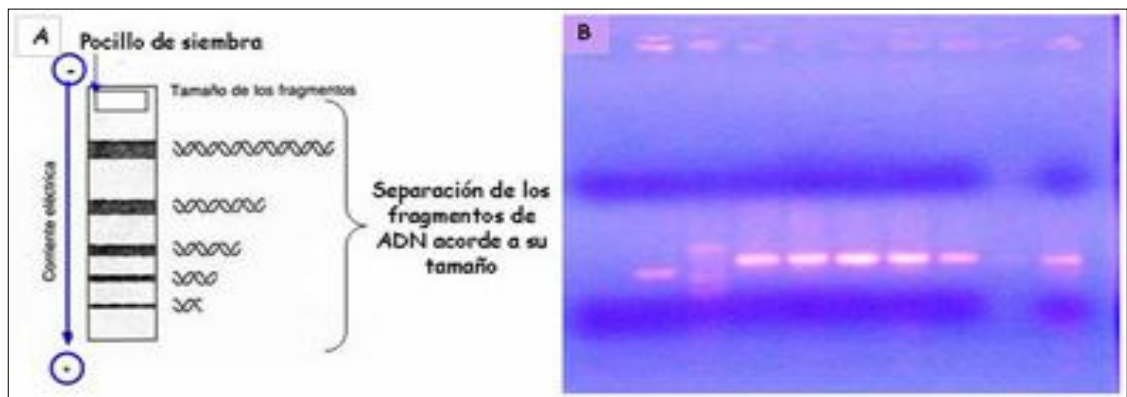
10. Extraiem la placa amb les mostres del termocilador. Aquests es col·loquen en un gel d'agarosa on hi haurà un marcador dels diferents pesos moleculars, i uns colorants. Comencem el procés d'electroforesi que ens permet separar, identificar i purificar segments d'ADN. A aquests gels se'ls hi aplica un camp elèctric, això provoca que les mostres carregades al gel migrin al pol oposat a la càrrega que tenen. Així doncs, l'ADN migra cap al pol positiu del camp elèctric i al tenir la mateixa càrrega total, els patrons de correguda electroforèica difereixen d'acord al tamany dels fragments d'ADN:



11. Es revela la imatge que es visualitza al gel en una placa fotogràfica:



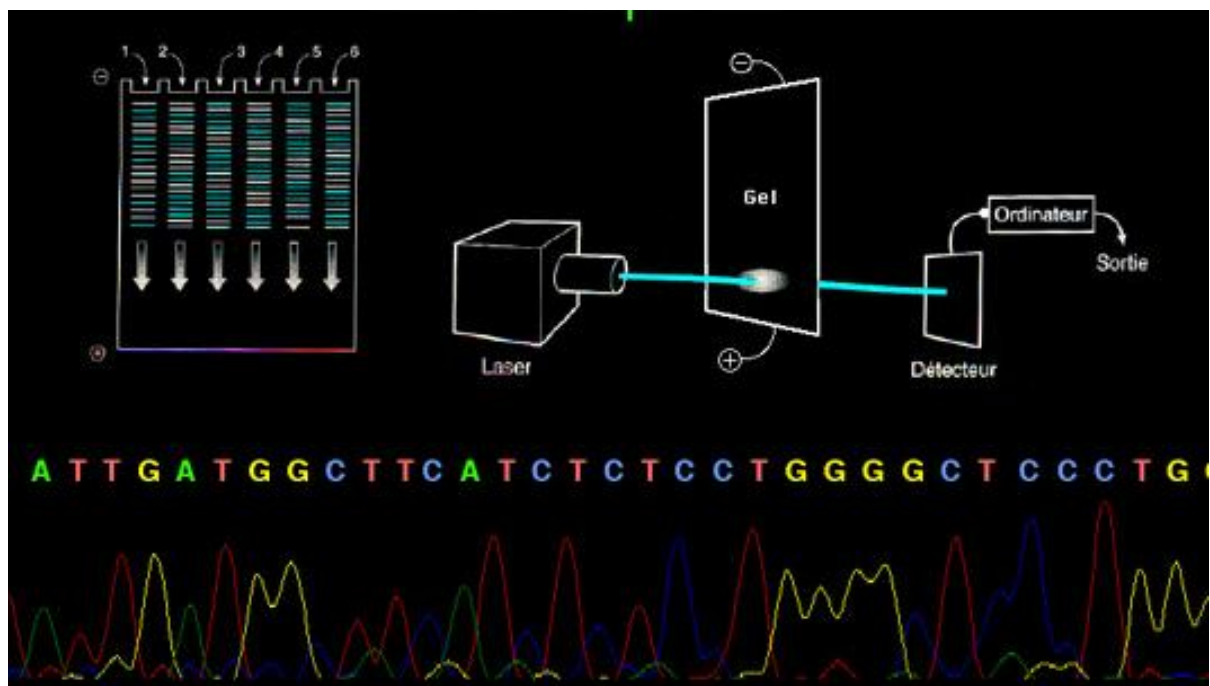
12. A partir del perfil electroforètic, es pot calcular aproximadament el tamany del fragment amplificat digerit o sense digerir, lo qual permet deduir el nombre de repeticions de cada al·lel amplificat.



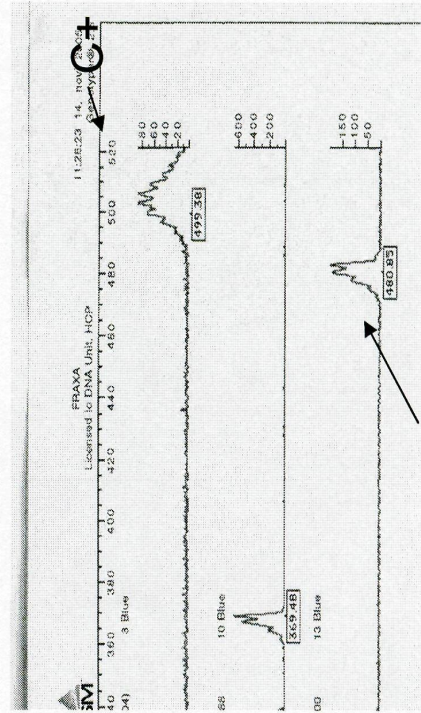
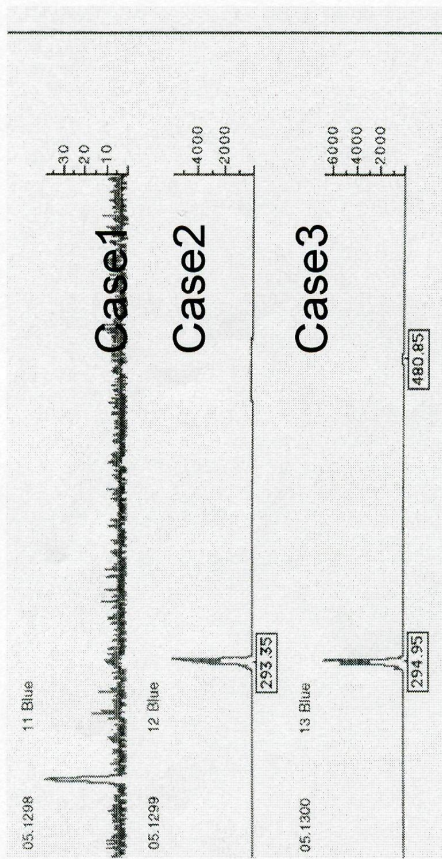
13. La informació obtinguda al gel, la passem en forma de seqüència, per a poder calcular el nombre de repeticions exactes de la següent manera:

$$\text{Nº Rep. CGG} = 480 - 208 = 91$$

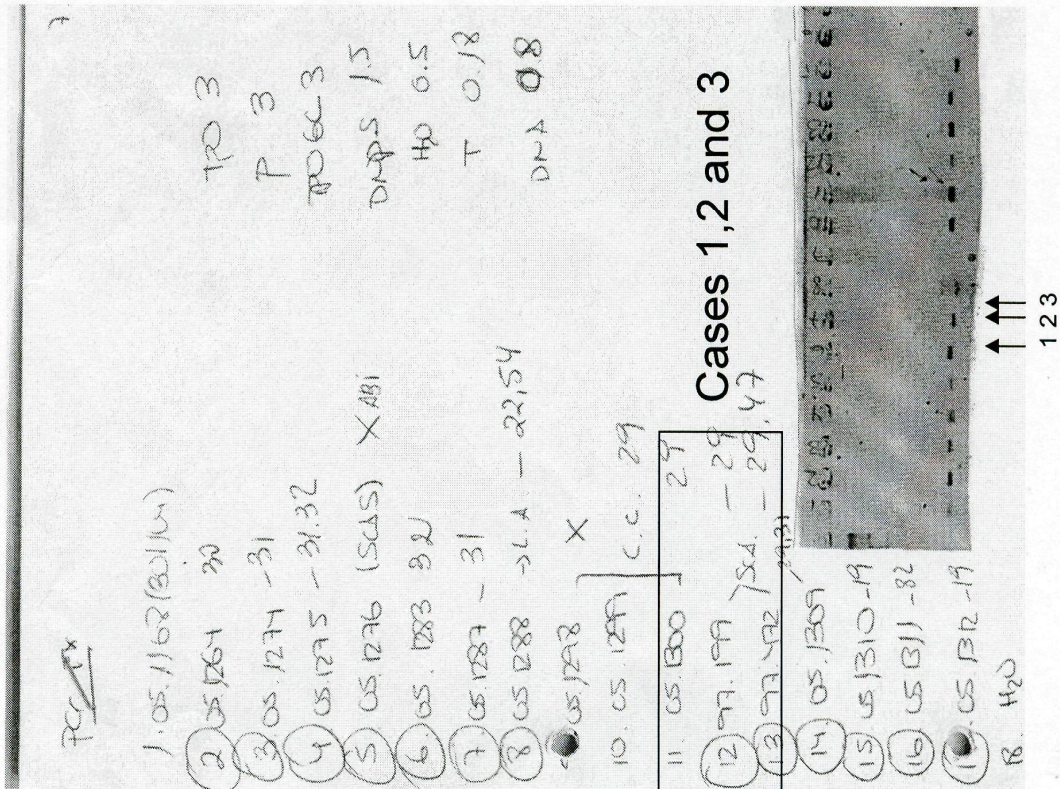
El nombre 208 representa el nombre de repeticions que sempre s'amplifiquen pels dos costats del nostre fragment analitzat. El 91 correspon al nombre de repeticions CGG que té la dona II-6 (arbre genealògic pàg.35), que serà portadora, perquè el nombre de repeticions està entre 50 i 200.



CGG= (bp-208)/3



Case 3
N= 480-208/3=91 CGG



6. RESULTATS

6.1. RESULTATS DE LA DIAGNOSI DEL FENOTIP DEL MASCLE AFECTAT EN LA FAMÍLIA PINEL SAMBLÀS:

En el cas de la Síndrome X fràgil, les característiques comuns associades poden passar força desapercebudes, especialment quan són joves. Com es pot apreciar en les següents fotografies, el pacient estudiat, al igual que altres nens que pateixen aquesta malaltia, no són molt diferents en aparença de la resta de persones.

Així doncs, es donen algunes característiques físiques comunes a homes i dones. En realitat, quan neix un nen sota aquesta condició, ni metges ni pares s’adonen de que alguna cosa és incorrecta. Només ho fan quan el nadó creix i es retarda al parlar o al caminar. Cal tenir en compte que conforme creixen aquests barons afectats, van afegint nous trets clínics al seu fenotip. En el nostre pacient estudiat, podem observar-ne algunes, conforme el noi ha anat evolucionant. Des de que va néixer fins a assolir els 18 anys actuals, podem observar com van apareixent alguns trets clínics:



*Foto 1: Nadó (Recent nascut).
No s’observa cap tret fenotípic.*



*Foto 2: Pacient amb 6/7 mesos d’edat.
No s’observa cap tret fenotípic molt característic, però si que podem veure:*
- *Front ampli*



Foto 3: Pacient amb 1 any d'edat.

Més trets clínics observables:

- Orelles prominents i alades



Foto 4: Pacient amb 1 any i mig d'edat.

Més trets fenotípics observables:

- Comportament hiperactiu

Foto 5: Pacient amb 2 anys d'edat.

Més trets clínics observables:

- Autisme
- Retard general en el creixement (si ho comparem amb la foto 4, podem veure que el pacient en 6 mesos no ha crescut significativament).
- Comença a caminar (molt tard, ja que els nens sans d'aquesta malaltia solen començar entre els 11/13 mesos d'edat).
- C.I.:33 (el mínim que es diagnostica per a aquesta malaltia)

I si ens basem en el diagnòstic realitzat als 3 anys i mig ¹ podem saber també el següent:



- *Dificultats d’adaptació a situacions i persones noves. Pot reaccionar bloquejant-se i, fins i tot, plorant.*
- *Evita la mirada fixa*
- *Trastorns de l’atenció*
- *Insegur i molt variable emocionalment*



Foto 6: Pacient amb 4 anys d’edat.

Ara podem observar a més:

- *Falta de concentració*
- *Llenguatge pobre i repetitiu*
- *Primers trets d’autisme (relació pobre amb els seus companys de la guarderia)*
- *Parla reiterativa*



Foto 7: Pacient amb 5 anys d’edat.

Més trets clínics observables:

- *Aleteig de mans*
- *Pell suau i llisa*
- *Cara allargada*
- *Grans faltes d’atenció*

¹. ANNEX 1: DIAGNÒSTIC REALITZAT A L'HOSPITAL DE TARRAGONA AL PACIENT ESTUDIAT AMB 3 ANYS I MIG D'EDAT.

Foto 8: Pacient amb 6 anys i mig d’edat.



Mirant el diagnòstic ² realitzat als 6 anys i mig d’edat i, les proves M.S.C.A. (Aptitud i pscicomotrocitat) i C.B.C.L (conducta), se n’ha extret el següent:

- Ja establia un mínim contacte ocular
- No mostra timidesa, però tampoc és excessivament extrovertit.
- No té por a estar sense cap familiar al costat seu.
- Bona col·laboració durant les proves.
- Actitud positiva, però amb problemes d’atenció.
- Deficiència mental mitja.
- Problemes de pensament.
- No té definit el seu predomini lateral (No sap si és dretà o esquerrà).

Foto 9: Pacient amb 8 anys i mig d’edat.

Entre els 10 i 11 anys, el pacient va començar l’educació especial.

Foto 10: Pacient amb 13 anys d’edat.



². ANNEX 2: DIAGNÒSTIC REALITZAT A L’HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA AL PACIENT AMB 6 ANYS I MIG D’EDAT.

I als 14 anys, li van diagnosticar hipermetropia i astigmatisme, per lo que li van ficar ulleres uns mesos després.

Foto 11: Pacient amb 15 anys d’edat.



Foto 12: Pacient amb 16 anys i mig d’edat.

Trets fenotípics observables:

- *Hiperlaxitud articular (sobretot mans)*



Foto 13: Pacient amb 18 anys. Foto de l’actualitat.

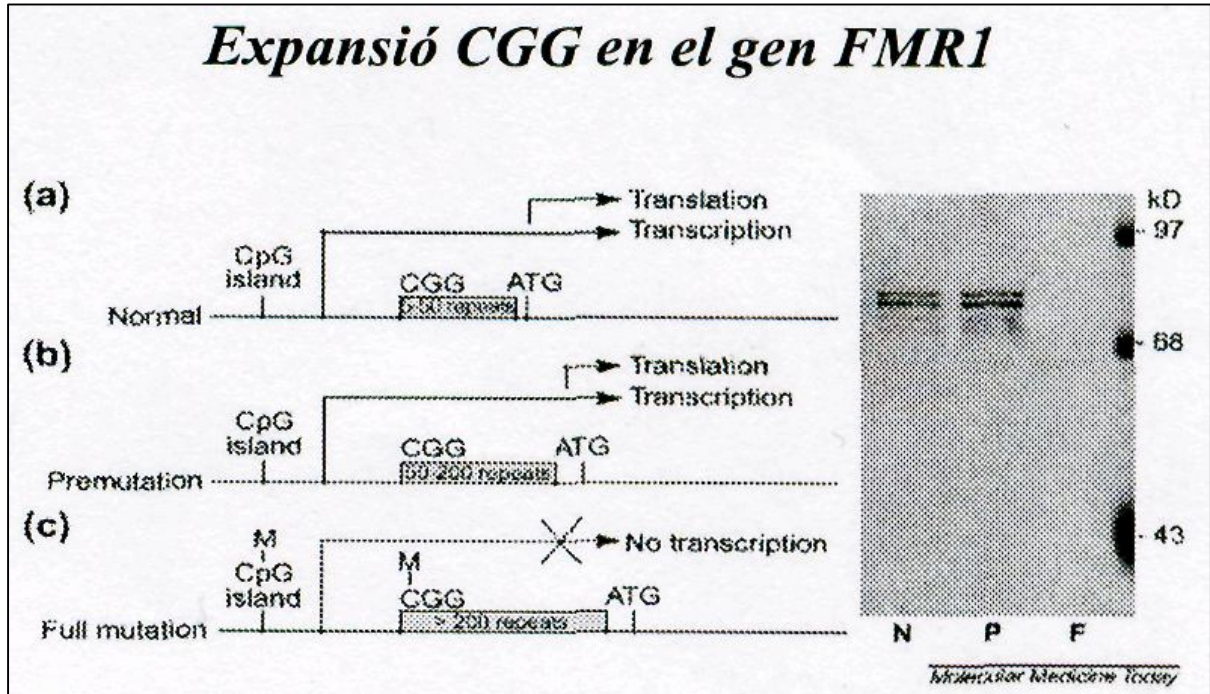
Trets fenotípics observables:

- *Orelles prominents i de tamany mitjà.*
- *Dentició irregular.*
- *Cara bastant allargada.*



6.2. RESULTATS DEL GENOTIP:

Al realitzar una PCR sobre una Síndrome X fràgil de la família Pinel Samblàs de Vila-seca, ens hauria de sortir una que seguís els mateixos patrons que la de la fotografia següent. En la qual: N (normal), P (premutació) i F (mutació completa).



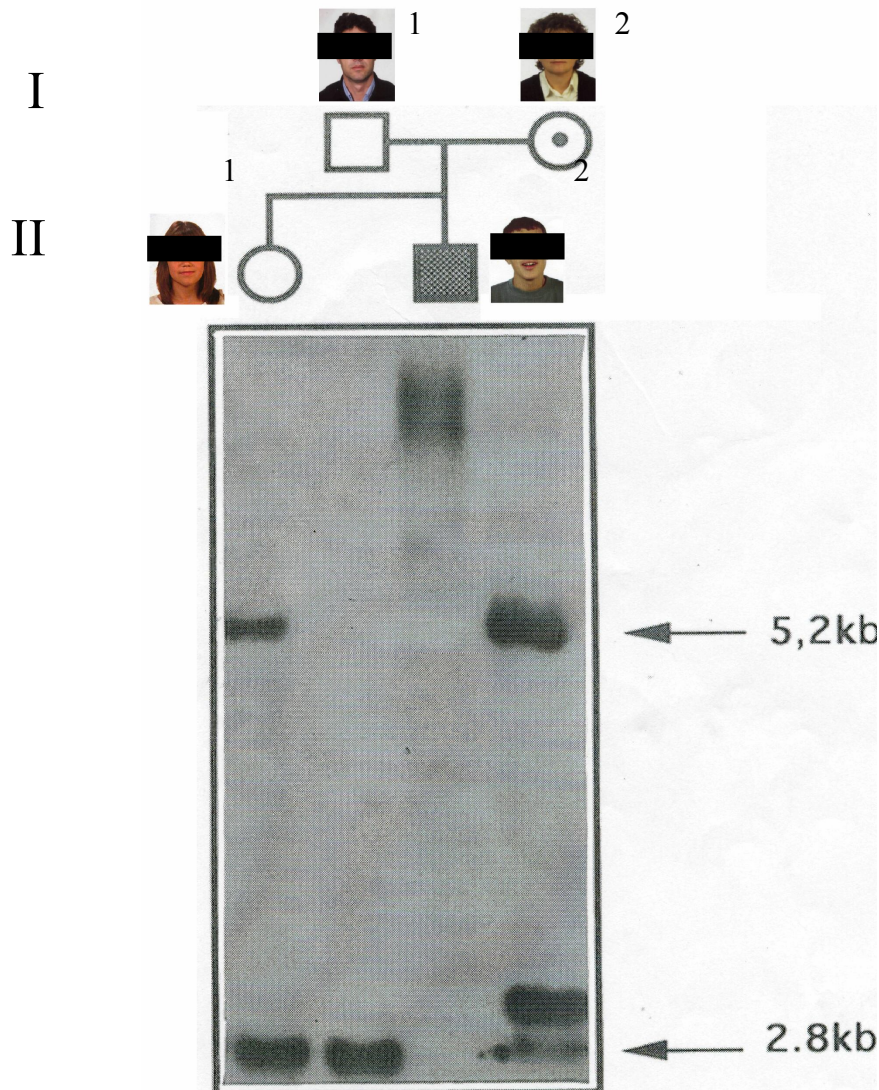
Així que, tal com ho suposàvem, si mirem a la fotografia següent on apareixen els resultats obtinguts en una PCR realitzada a la família Pinel Samblàs per l'equip de la Dra. Milà a l'Hospital Clínic de Barcelona, veiem que els resultats segueixen el típic patró de la malaltia.

L'individu I-1 (el pare) és un mascle normal ja que veiem que el seu cromosoma X, marcat per una banda negra, és de 2.8 kb de grandària. És a dir, el seu nombre de repeticions CGG és menor a 50.

La dona I-2 és la portadora de la Síndrome X fràgil en aquesta família, però no es veu afectada per aquest. Això ho podem veure, ja que les dues bandes que marquen la grandària del triplet CGG al gen FMR-1 dels cromosomes X, apareixen no definidament (difuminades), una de 2.8 kb (d'unes 22 repeticions CGG) i l'altra de 5.2 kb (d'unes 84 repeticions CGG).

A la segona generació, la noia II-1 s'ha diagnosticat com no afectada pel síndrome i les seves dues bandes corresponen, una a unes 30 repeticions CGG i l'altra, a unes 28. Pel contrari, el seu germà, l'individu II-2, és un individu afectat. Podem veure clarament la expansió del seu triplet de més de 5.2 kb (No hi ha una banda normal, més de 200 repeticions

CGG). S’hauria de confirmar per anàlisi de Southern-blot. Aquest últim és el nostre pacient estudiat.



6. CONCLUSIONS DEL TREBALL

La primera conclusió a la que es va arribar és que l’individu estudiat, efectivament, pateix la malaltia. Encara que ja se sapigués amb certesa, el diagnòstic del dia 3/1/06 del pacient estudiat es va veure clarament que seguia les característiques requerides.

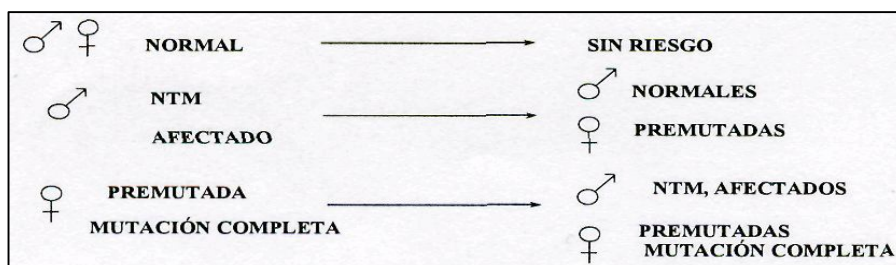
La segona conclusió és que degut a les peculiaritats dels arbres genètics, aquests ens indiquen que l’herència, en aquesta família, s’ajusta als patrons coneguts de la Síndrome X Fràgil. Un 20% dels mascles que transmeten la malaltia, no pateixen retard mental, així doncs, són portadors (NTM). Les filles d’aquests són normals, no presenten alteracions psíquiques ni físiques, però portadores obligades i tenen un 50% de probabilitats de tenir fills afectats. És el

que s’anomena Paradoxa de Sherman. En el nostre cas, el progenitor mascle és NTM i ha tingut sis fills, dels quals cinc són noies (II-2, II-3, II-6, II-9 i II-12) i totes portadores. I un fill ni portador ni afectat (II-7) que tampoc no ha tingut cap descendent ni portador ni afectat per la malaltia (III-8 i III-9). Però, en canvi, les seves germanes, sí que han tingut fills portadors (III-3), filles portadores (III-2, III-11, III-16) i fills afectats (III-6 “el nostre pacient estudiat”, III-14 i III-15). En aquesta família, de moment, no han aparegut noies afectades de la mutació completa, però això no significa que en generacions posteriors sorgeixin. Quant a la penetrància de la Síndrome X Fràgil en aquesta família, podem dir que és de 3: 13 mascles afectats i 0:15 dones afectades. I quant a portadors o premutats es refereix, trobem 2:17 mascles (tenint en compte el NTM) i, 8:19 dones.

També, com podem veure, apareix el fenomen citat abans de l’anticipació amb el què deduïm que és molt probable que a la següent generació (generació IV), augmenti la freqüència d’aparició del retard mental i/o la severitat del fenotip. Ja que, el triplet és molt inestable i tendeix a expandir-se, és a dir a augmentar de grandària d’una generació a la següent; això implica que un estat de premutació (portador) pot tenir descendència amb la mutació completa: malalts de la síndrome X fràgil.

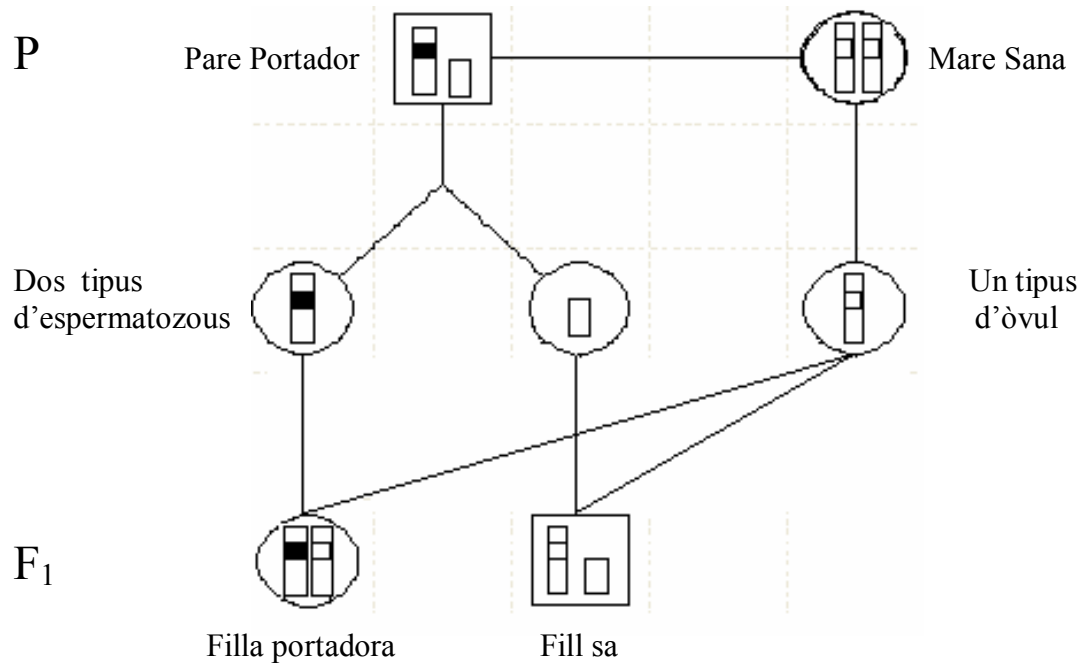
Una altra conclusió a la que s’ha arribat en aquest treball és necessari un tractament integrat per a la integració social i laboral de qualsevol persona que neixi amb aquest tipus de discapacitat, la Síndrome X Fràgil. Ja que, hem pogut observar que gràcies a les ajudes tant logopèdiques, com psicopedagògiques, etc. el noi estudiat ha millorat molt el seu CI (de 35 a 75) i les seves capacitats.

Pel que fa al consell genètic, s’han elaborat una sèrie de arbres genealògics amb el fi de poder diagnosticar els fills de diferents progenitors que tinguin relació amb la Síndrome X Fràgil. Per tant, podem concloure els següents descendents i els seus riscos d’afectació:



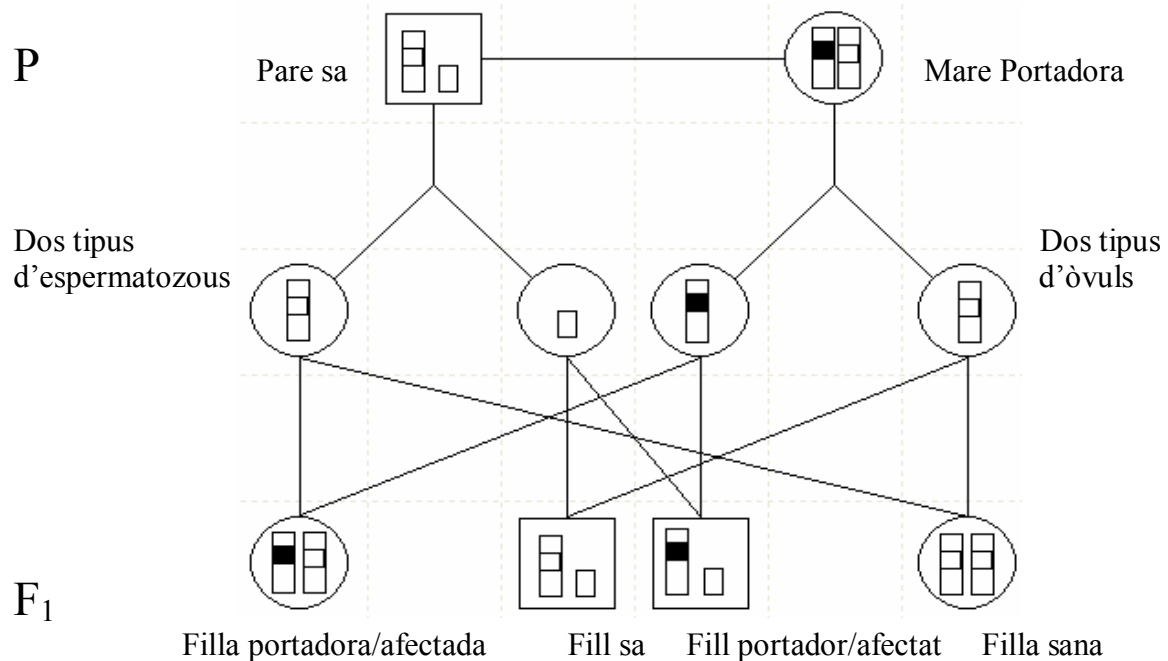
S’ha optat per no elaborar cap arbre genealògic de l’encreuament entre un home i una dona normals, ja que, òbviament, la seva descendència serà totalment sana, perquè cap dels dos té relació amb el gen defectuós portador d’aquesta malaltia.

ENCREUAMENT 1: PARE PORTADOR I MARE SANA



A l'encreuament 1, veiem com els NTMs transmeten a totes les seves filles el gen mutat, per tant totes les filles d'un mascle portador són portadores (100% dones portadores). Sempre en estat de premutació, pel que mai manifesten la malaltia, ja que parlem de la segona generació (F₁), i per tant, el triplet no té una expansió molt propera a les 200 repeticions de CGG. En la següent generació, aquestes dones portadores tindran fills barons afectats. Els fills, però apareixen tots sans, ja que hereten el seu cromosoma Y (100% nois sans).

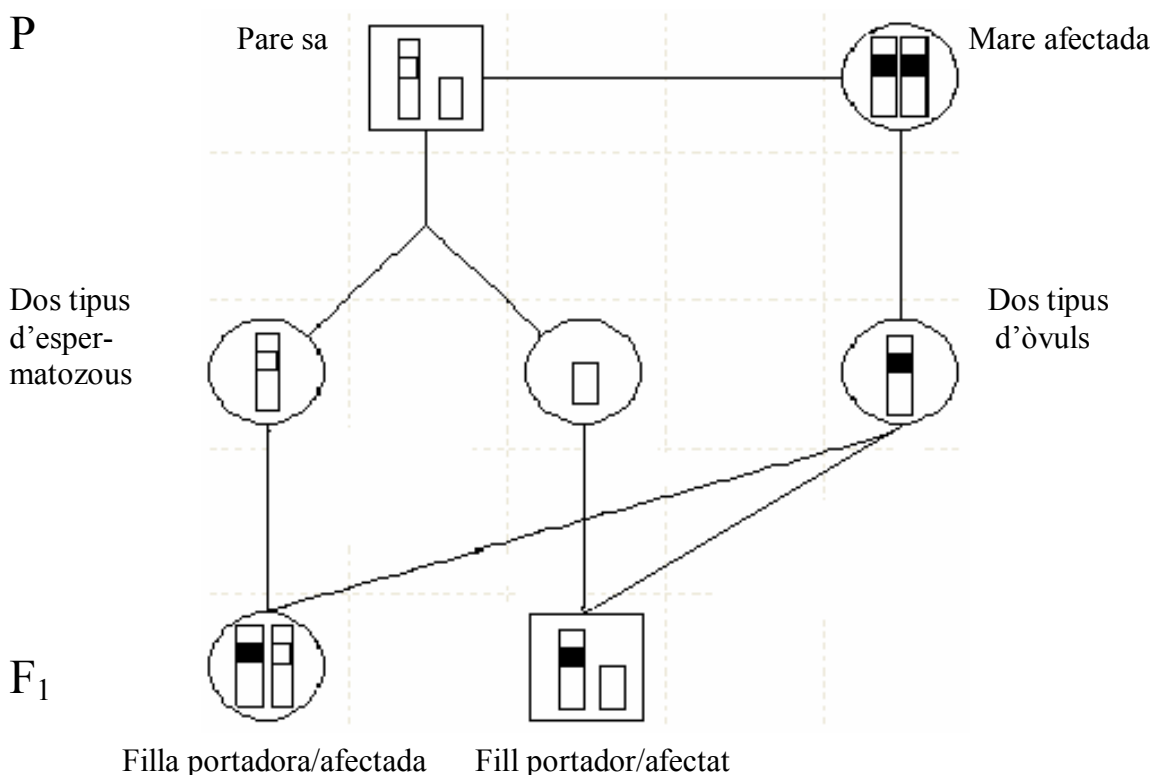
ENCREUAMENT 2: PARE SA I MARE PORTADORA



El cas dels mascles afectats no s’ha representat en esquema, ja que, és igual al de l’encreuament 1. En conclusió, cap membre de la seva descendència manifestarà la síndrome. El risc de retard mental es relaciona amb la posició que ocupa l’individu en l’arbre genealògic, de manera que la mutació va creixent a través de les generacions. La premutació pot mantenir-se durant diverses generacions, o bé passar a mutació completa en una sola generació. El canvi sempre ocorre quan passa a través d’una dona.

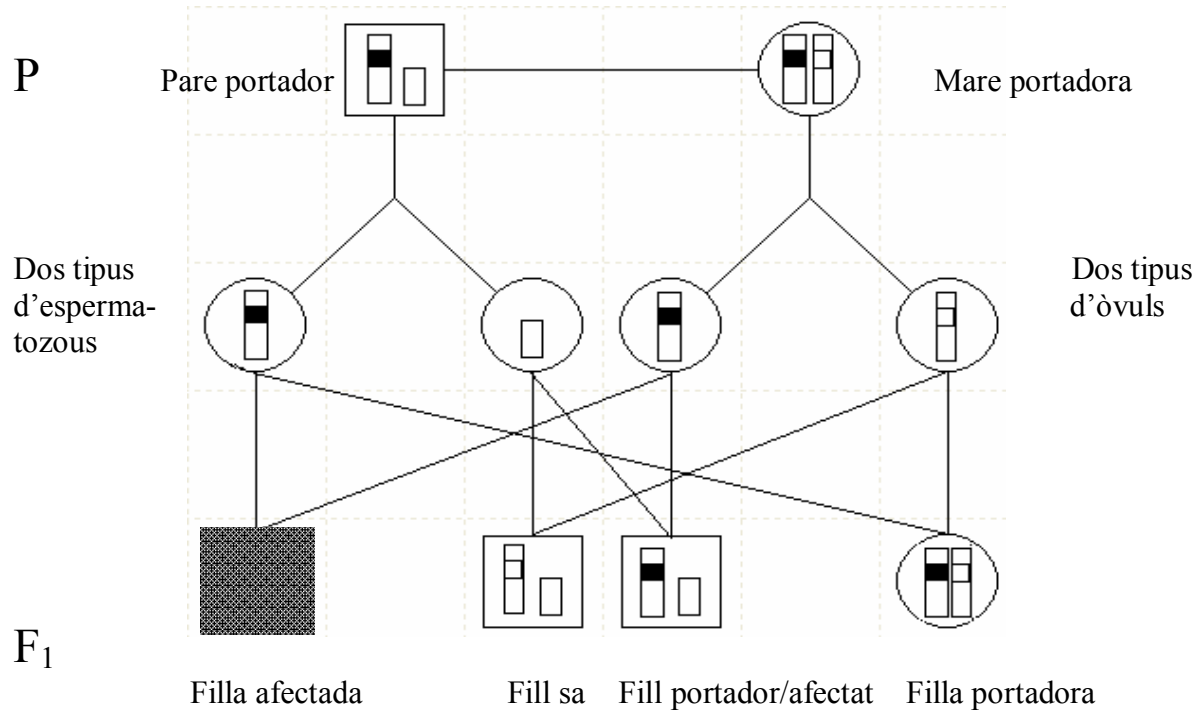
A l’encreuament 2, podem veure que el 50% dels seus fills mascles heretaran el al·lel de risc. Si hereten la mutació completa estaran afectats. Si es manté la premutació seran NTMs. L’altre 50% heretarà el al·lel sa i seran completament sans no portadors. Respecte a les filles, el 50% seran portadores d’una premutació o una mutació completa depenent de la grandària de l’expansió i l’altre 50% sanes no portadores. En aquest cas estaria indicat realitzar un diagnòstic prenatal, ja que, sabem que les mares passen la malaltia als fills en major grau.

ENCREUAMENT 3: PARE SA I MARE AFECTADA



En l’encreuament 3, la penetrància del gen és del 100% tan per nois com per noies nascudes, pel que és pràcticament impossible l’aparició de fills mascles NTM i de filles premutades. Tot individu que hereti l’al·lel de risc heretarà la mutació completa i per tant, si és mascle serà afectat o portador, depenent del nombre de repeticions de CGGs i, si és dona dependrà de la inactivació del cromosoma X.

ENCREUAMENT 4: PARE PORTADOR I MARE PORTADORA



Així com en tots els encreuaments s’ha relacionat a un individu sa amb un altre de diferents característiques, en l’encreuament 4, s’ha unit a dos pares portadors. Percentatges penetrància del gen: 75% en les dones i, en els homes és del 50%. Aquest 75% en les dones és degut a la suma del 50% de possibilitats que les filles surtin homozigots (afectades), i de la meitat de possibilitats que les filles surtin portadores o bé afectades, ja que són heterozigots i dependrà de la expansió del triplet CGG. Les filles homozigots tindran a un cromosoma X la premutació, i a l’altre, la mutació completa del gen FMR-1.

SEXE	GENOTIP	CARACTERÍSTIQUES	FENOTIP
	X Y	X: $0 < x < 50$ CGG	Normal
	X* Y	X: $50 < x < 200$ CGG	Premutat
	X* Y	X: $x > 200$ CGG	Afectat
	X X	X ₁ i X ₂ : $0 < x < 50$ CGG	Normal
	X* X	X ₁ : $50 < x < 200$ CGG i X ₂ : $0 < x < 50$ CGG	Premutada
	X* X	X ₁ : $x > 200$ CGG	Afectada
	X* X*	X ₁ : $x < 200$ CGG i X ₂ : $x > 200$ CGG	Afectada

8. AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull donar les gràcies a totes aquelles persones que m’han donat suport i han confiat en mi per a fer aquest treball; als meus pares i, als meus amics i amigues, d’entre ells, companys de classe.

En segon lloc, vull agrair-li a la meva tutora l’ajuda prestada, així com les correccions del que jo anava efectuant, com al recolzament donat.

Per una altra banda, sobretot vull agrair l’ajuda i els serveis que m’ha proporcionat la Dra. Montserrat Milà Recasens i els seus companys del Laboratori de Genètica i Bioquímica de l’Hospital Clínic de Barcelona. Pel que fa a la rebuda d’informació ja que, si no hagués estat molt difícil d’obtenir-la. I també, pel que fa al temps que m’han prestat fent les pràctiques realitzades al laboratori i, també ajudant-me a comprendre moltes coses que no estan al nivell de 2n de Batxillerat.

Per últim, vull agrair de tot cor a la família Pinel Samblàs l’ajuda i tota la informació que m’han proporcionat. També, dir que tot el treball realitzat, no hagués sigut possible sense la seva col·laboració.

M’agradaria poder aconseguir que aquest treball no només quedés com un treball de recerca elaborat al segon curs de Batxillerat. Sinó, que fos un impuls per a donar a conèixer aquesta malaltia i poder servir de guia per aquells que estiguin interessats en ella; amb el fi d’ajudar a aquestes persones que pateixen o estan relacionades amb la Síndrome del Cromosoma X Fràgil.

Gràcies de nou a tothom, perquè a tots vosaltres us he d’agrair el haver-me iniciat en aquest món meravellós de la Genètica Mèdica.

A totes aquestes famílies X fràgils queda dedicat aquest treball.

9. ANNEXOS

9.1. ANNEX 1: GLOSSARI

A: Abreviatura d’Adenina.

Adenina: Base nitrogenada que forma part de l’ADN i de l’ARN.

ADN: Àcid desoxirribonucleic; es troba principalment formant part dels cromosomes. És la molècula en la que està codificada la informació genètica.

ADN Desnaturalitzat: Molècula d’ADN de doble hèlix que s’ha separat en dues hèlix simples.

ADN genòmic: ADN que forma part dels cromosomes.

ADN Polimerasa: Enzim que catalitza la síntesi d’ADN.

ADN repetitiu: Seqüència de longitud variable que es repeteix un nombre de vegades alt en el genoma.

Al·lel: Nom que se li dona a dues formes distintes d’un mateix gen en els cromosomes homòlegs. Els diferents al·lells també s’anomenen factors antagònics.

Al·lells múltiples: Quan apareixen més de dues formes d’un gen concret en la població.

Aminoàcid: Molècula que posseeix un grup carboxil i un amino, forma part de totes les proteïnes.

Amniocentèsis: Procediment usat en el diagnòstic prenatal per a obtenir amniòcits.

Amniòcits: Cèl·lules d’origen fetal que es troben en el líquid amniòtic.

Anticipació: Tendència observable, en alguns tipus de malalties, en les quals els símptomes apareixen més greus i precoços en generacions successives.

Autosomes: Cromosomes que apareixen en les cèl·lules de l’organisme i són diferents als sexuals;

en els humans apareixen 22 parells en cada cèl·lula somàtica.

Base nitrogenada: Component dels àcids nucleics, en els quals apareixen cinc tipus diferents de bases: Adenina, Citosina, Guanina, Timina i Uracil.

Biòpsia de vellositats canòniques (CVS): Procediment utilitzat en el diagnòstic prenatal per a obtenir una mostra de teixit fetal.

C: Abreviatura de Citosina.

Canvi tautomèric: Les dues formes tautomèriques estan en equilibri, i espontàniament es passa d’una a l’altra. Si succeeix durant la replicació de l’ADN, implica mutacions, ja que canvia la base complementària en el nou filament d’ADN.

Canvi de fase: Lliscaments del filament que es forma sobre el filament motlle, quedant-hi bucles al aparellar-se de nou. Originen mutacions.

Caràcter: Característica o tret que s’observa en un individu i forma part del seu fenotip. Els diferents tipus que hi ha dins d’un caràcter s’anomenen manifestacions.

Cèl·lula: Unitats bàsiques de les quals es componen els organismes pluricèl·lulars.

Cèl·lula germinal: Aquelles cèl·lules de l’organisme que transmeten la informació genètica a la següent generació d’individus.

Cèl·lula somàtica: Totes les cèl·lules del cos excepte les sexuals.

Cigot o ou: Òvul que ha estat fecundat per un espermatozoide.

Citogenètica: Rama de la genètica que s’ocupa de l’estudi dels cromosomes.

Citoplasma: Part de la cèl·lula limitada per la membrana externa i la nuclear.

Congènita: Anomalia present quan es neix.

Cromosomes: Estructures filiformes que s'observen en els nuclis de les cèl·lules en el moment de la divisió cel·lular, estan formats per ADN i proteïnes, i en ells està codificada la informació genètica que serveix per a determinar totes les funcions i formes de les cèl·lules d'un organisme viu.

Cromosomes homòlegs: Cromosomes que tenen el mateix locus. Ex.: en un ésser diploide hi ha una parella de cromosomes homòlegs.

Cromosomes sexuals o heterocromosomes:

Parell de cromosomes distint als parells autosòmics, que estan implicats, entre altres funcions, en la determinació del sexe de l'organisme, en la dona són dos cromosomes X, i en el baró un X i un Y.

CpG: Regió o illa d'ADN rica en citosinas i guaninas, regula la transcripció dels gens eucariotes, entre ells el gen Fmr-1.

Deleció: Pèrdua d'un fragment cromosòmic.

Diagnòstic preimplantacional: Detecció d'un trastorn hereditari abans de la implantació, realitzada en un embrió després d'una FIV.

Diagnòstic prenatal: Proves emprades per a determinar si el fetus presenta alguna alteració que li provoqui alguna malaltia.

Diploide: Ésser que posseeix dos gens o informacions per a cada caràcter. Aquests poden ser iguals o diferents. Pot succeir que es manifestin ambdós gens o que un impedeixi l'expressió de l'altre.

Dominant: Caràcter que es manifesta sempre en els individus encara que els dos al·lels del gen o gens que ho determinen siguin diferents (heterocigots).

Dosis gènica: Quantitat total de gens d'un individu.

Exó: Zona d'un gen que es tradueix en proteïna.

Fenotip: Característiques físiques, bioquímiques i fisiològiques d'un individu, que resulten de la interacció entre genotip i l'entorn o factors ambientals.

"FIV": Fertilització *in vitro*. Extracció d'un òvul de la dona i posar-lo en contacte amb espermatozoides, i provocar, així, la fecundació fora de l'aparell genital femení. Quan l'ou ha dut a terme les seves primeres divisions cel·lulars, s'implanta a l'úter matern, provocant el naixement d'un bebè proveta.

FMR-1: Gen del retard mental lligat al lloc fràgil 1, situat en el locus FRAXA.

G: Abreviatura de Guanina, base nitrogenada component del ADN.

Gàmeta: Cèl·lula germinal de l'organisme, pot ser òvul o espermatozoide i conté una sola còpia de cada cromosoma (dotació genètica haploide).

Gen: Part de la seqüència del ADN que codifica per a una seqüència d'aminoàcids en la proteïna.

Genealogia: Diagrama que mostra les relacions ancestrals entre individus d'una família durant dues o més generacions.

Generació Filial : Generació d'individus productes d'encreuaments entre dos progenitors. La primera generació es denomina F1, la segona generació F2 i així successivament. Són relatius a la generació parental.

Gens homòlegs: Gens que ocupen el mateix locus en diferents cromosomes homòlegs.

Genètica: És la ciència que estudia l'herència biològica, és a dir, la transmissió dels caràcters morfològics i fisiològics que passen d'un ésser viu als seus descendents.

Genètica mendeliana: És l'estudi de l'herència biològica mitjançant experiments de reproducció. Intenta esbrinar quin és la informació biològica

dels individus a partir de les proporcions matemàtiques que s'hereta cada caràcter.

Genètica molecular: Estudi de les molècules que contenen la informació biològica i dels processos bioquímics de la seva transmissió i manifestació. El sentit del seu estudi és, doncs, invers al de la genètica mendeliana. A partir de la informació (àcids nucleics) es dedueix com seran els caràcters.

Genoma: Conjunt de tots els gens d'una cèl·lula.

Genotip: Constitució genètica d'un individu.

Haploide: Ser que per a cada caràcter només posseeix un gen o informació.

Herència codominant: Herència en la qual els dos al·lells són equipotents i, per tant, no hi ha dominància. I els híbrids presenten les característiques de les dues races pures alhora.

Herència dominant: Herència en la qual hi ha un al·lel dominant que no deixa que es manifesti l'altre al·lel (recessiu).

Herència intermèdia: Herència en la qual un dels al·lells mostra una dominància incompleta sobre l'altre. Així doncs, els híbrids tenen un fenotip intermedi entre els dues races pures.

Heterocigot o híbrid: Individu que mostra dos al·lells diferents en un gen concret en el parell de cromosomes homòlegs.

Homocigot o raça pura: Individu que mostra dos al·lells idèntics en un gen concret en el parell de cromosomes homòlegs.

“Imprinting” : Descriu el canvi que té lloc a un al·lel d'origen matern o patern (Ex. metilació), durant etapes molt properes al desenvolupament embrionari.

Inactivació del cromosoma X: Procés que ocorre en les cèl·lules femenines degut al fet que duen dos cromosomes X, per a compensar la dosi gènica respecte a les cèl·lules masculines que

només duen un cromosoma X.

Incidència: La incidència d'una malaltia es refereix a l'índex de casos nous que apareixen cada any i s'expressa com, per ex.: Nombre de casos per 1.000 recent nascuts.

Inestabilitat cromosòmica: Punt de trencament del cromosoma que s'associa a certes patologies o alteracions en la seqüència de nucleòtids.

Intró: Zona d'un gen que no es tradueix en proteïna.

IQ (=CI): Coeficient d'intel·ligència (valor numèric).

Lligament: Es diu que dos gens estan lligats quan estan tan prop al cromosoma que s'observa que s'hereten junts.

Lligament al cromosoma X: Gens situats en el cromosoma X.

Lligament al sexe: Caràcters que es troben determinats per gens situats en els cromosomes sexuals, X o Y.

Locus (Plural: loci): Lloc en el qual se situa un gen en un cromosoma.

Macroorquidisme: Grandària dels testicles per sobre de la mitjana de la població.

Mosaicisme: Presència de distints caràcters genètics en els teixits de l'organisme.

Mutació: Canvi ocorregut en el material genètic que s'hereta.

Mutacions somàtiques: Canvis genètics que no són heretats.

Nucli: Estructura de les cèl·lules eucariotes on se situen els cromosomes.

Nucleòtid: Unitats bàsiques del ADN, formades per una base nitrogenada, una pentosa i un grup fosfat; serveixen de codis per als caràcters heretables.

PCR: Tècnica de detecció d'anomalies genètiques. Reacció en cadena de la polimerasa;

s'aconsegueix amplificar part de el ADN.

Pedigree: Diagrama que representa la línia d'antecessors. Arbre genealògic, que inclou una compilació curosa dels registres fenotípics d'una família en diverses generacions.

Penetrància: Habilitat d'un gen d'expressar-se.

Portador obligat: Individu que per l'anàlisi de la seva família ha de tenir el caràcter que s'analitza.

Prevalència: Es refereix a la proporció de població afectada en un moment determinat i se expressa com, per ex.: Nombre de casos per 1.000 habitants.

Proteïna: Molècula biològica que està formada per cadenes d'aminoàcids, i que determina una funció cel·lular.

Síndrome: Conjunt de característiques o símptomes que apareixen junts en una patologia o malaltia. Patró d'anomalies múltiples.

Sonda: Molècula utilitzada per a identificar a una altra molècula. Ex.: per identificar un gen s'utilitza com a sonda el mRNA corresponent o el cDNA. En ambdós casos la sonda ha d'estar marcada (ex.: radioisòtop).

"Southern-blot": Mètode utilitzat per a la detecció de malalties cromosòmiques i gèniques en els polimorfismes de restricció de l'ADN, per hibridació amb sonda marcada.

T: Abreviatura de Timina.

Telòmer: Part final d'un cromosoma.

Teràpia gènica: Tractament d'una malaltia introduint el gen alterat en les cèl·lules de l'organisme viu.

Termociclador : Instrument que permet executar de forma automatitzada la tècnica de PCR.

Mitjançant l'aplicació de cicles tèrmics seqüencials ocorre la desnaturalització, hibridació i síntesi de DNA.

Traducció: Procés pel que un ARNm és interpretat com una seqüència d'aminoàcids d'una proteïna.

Transposons: Grup de gens.

Triplet: Seqüència de tres nucleòtids en la molècula de ADN o en el ARNm i que codifica per a un aminoàcid concret en la proteïna.

Xq 27.3-28: Bandes finals del braç llarg del cromosoma X.

9.2. ANNEX 2: BIBLIOGRAFIA

9.2.1. LLIBRES:

- PUYUELO, M.; (2001). *Casos clínicos en logopedia 3*. Barcelona: Masson. ISBN 84-458-1043-X
- DE DIEGO, Y; HMADCHA, A; CARRASCO, M; PINTADO, E. (1999). *Síndrome X Fràgil y discapacidad mental hereditaria*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones.
- LUQUE, J; HERRÁEZ, A.; (2001). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.*; Madrid: Ediciones Harcourt.
- HADORN, E.; WEHNER, R.; (1977). *Zoología General*. Barcelona: Ed. Omega. ISBN 84-282-0284-Z
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.; (1989). *Histología Básica*. 3ª Edición. Barcelona: Ed. Salvat. ISBN 84-345-2726-X.
- CURTIS, H.; (1984). *Biología*. Barcelona: Ed. Omega. ISBN 84-282-0358-X
- FARRERAS, P; ROZMAN, C.; (1995). *Medicina Interna*. 13ª Edición. Mosby-Dogma Libros S.A. ISBN (VOL.1) 84-8174-107-8
- RAMOS, F.J.; (1997). *El Síndrome X Frágil, Material educativo de la fundación nacional del X frágil de Estados Unidos. Colección rehabilitación*. Madrid: Ministerio de trabajo y asuntos sociales. Secretaría general de asuntos sociales. IMSERSO. ISBN: 84-88986-96-3
- JIMENO, A; BALLESTEROS, M; UGEDO, L.; (2003). *Biología 2n Batxillerat*. Barcelona: Grup Promotor Santillana. ISBN: 84-8435-616-7
- DEL HOYO, J; SOLÉ, Mª T.; (1991). *Enciclopèdia de Medicina i Salut. Volumen 7. Malalties infeccioses, Sistema immunitari i Genètica*. Barcelona: Enciclopèdia Catalana S.A. ISBN: 84-7739-160-2
- CUELLO, J.; *Atlas de Biología Fundamental*. Barcelona: Edibook S.A. ISBN: 84-7810-108-X

9.2.2. DIRECCIONS PÀGINES WEB:

- <http://www.bbc.co.uk/spanish/extra0006genomaa.htm>
- <http://www.geocities.com/CollegePark/Campus/7835/hglaes2n.htm>
- <http://www.dnai.org/b/index.html>
- http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/B4_INFORMACION/T411_MUTACIONES/informacion.htm
- <http://www.arrakis.es/~lluengo/mutacion.html>
- <http://www.ctv.es/USERS/jgab/> (Asociación Síndrome X frágil de Madrid)
- <http://www.um.es/molecula/dupli.htm>
- <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c1-1-1-3.html>
- <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/019/intro.htm>
- http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/125/htm/sec_3.htm
- <http://www.ygyh.org/>
- <http://www.dnaftb.org/dnaftb/1/concept/index.html>

9.3. ANNEX 3:

*DIAGNÒSTIC REALITZAT A UN HOSPITAL DE
TARRAGONA AL PACIENT ESTUDIAT AMB 3 ANYS I
MIG D’EDAT*

9.4. ANNEX 4:

*DIAGNÒSTIC REALITZAT A L’HOSPITAL CLÍNIC
DE BARCELONA AL PACIENT AMB 6 ANYS I MIG
D’EDAT*

9.5. ANNEX 5:

*RECULL DE LES NOTÍCIES MÉS IMPORTANTS DE
GENÈTICA DELS s.XIX i XX
EN ORDRE CRONOLÒGIC*