

Tamizaje mediante inmunohistoquímica del síndrome del cromosoma X frágil en una población de niños y adolescentes costarricenses

(Immunohistochemical Screening for Fragile X Syndrome in
a Population of Costa Rican Children and Adolescents)

Rebeca Vindas-Smith, Patricia Cuenca-Berger, Fernando Brenes-Pino, Isabel Castro-Volio

Resumen

Objetivo: El síndrome del cromosoma X frágil es la causa más frecuente de retraso mental hereditario. Al no existir un tratamiento correctivo, el tamizaje en cascada de poblaciones seleccionadas, mediante la detección de la proteína FMRP, es uno de los métodos más eficientes para prevenir la recurrencia de la enfermedad.

Métodos: La población consistió de 118 estudiantes en escuelas de enseñanza especial o de pacientes referidos desde la consulta médica. Se determinó el porcentaje de expresión de FMRP en raíces de cabello y linfocitos de sangre periférica. Aquellos que resultaron positivos por cribado fueron sometidos a los ensayos moleculares confirmatorios.

Conclusión: La técnica inmunohistoquímica para la detección de la FMRP, es un método relativamente sencillo, rápido, fiable y de bajo costo, por lo que es ideal para el cribado de poblaciones.

Descriptores. Costa Rica, inmunohistoquímica, retraso mental, síndrome del cromosoma X frágil.

Abstract

Aim: Fragile X Syndrome (FXS) is the most common form of inherited mental retardation. Since it has no treatment, the screening of selected populations by FMRP detection is one of the most efficient preventive methods of the disorder.

Methods: The population consisted of 118 students attending special schools or referred by medical consultation. The percentage of FMRP expression was determined in hair roots and lymphocytes. All subjects who screen positive or borderline, were submitted to the molecular tests to determine the number of CGG repeats.

Results: We found no carriers of the full mutation by immunohistochemistry or molecular techniques.

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica.

Abreviaturas: CGG, Citosina Guanina Guanina; FMR1, Gen del retraso mental del síndrome del cromosoma X frágil; FMRP, Proteína del retraso mental del síndrome del cromosoma X frágil; PCR, Reacción en cadena de la polimerasa; SXF, síndrome del cromosoma X frágil.

Correspondencia: Isabel Castro Volio. INISA, Ciudad de la Investigación, Código Postal: 2060 San Pedro. San José, Costa Rica.

Correo electrónico: isabel.castro@ucr.ac.cr

Fuentes de apoyo: Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Conclusion: The immunohistochemistry detection of FMRP is a low cost, reliable, fast, and simple technique, ideal for the screening of large populations.

Keywords: Costa Rica, immunohistochemistry, mental retardation, fragile X syndrome.

Recibido: 31 de enero de 2011

Aceptado: 15 de febrero de 2011

El síndrome del cromosoma X frágil (SXF) es la causa de retraso mental hereditario más común, con una prevalencia estimada en 1/4000 varones y 1/6000-8000 mujeres.¹ Entre las personas afectadas, el 80% de los varones y el 35% de las mujeres poseen algún grado de déficit intelectual.¹ El fenotipo de los afectados es heterogéneo; entre los rasgos más característicos están las orejas grandes y prominentes, cara alargada, macroorquidismo, déficit de atención, hiperactividad, conductas autistas, problemas de lenguaje, trastornos del sueño, y epilepsia, entre otros.^{2,3} En edades tempranas el diagnóstico clínico es difícil, ya que el fenotipo se torna más evidente conforme el niño crece, de manera que cuando se solicita el ensayo genético, suele suceder que en la familia ya han nacido varios afectados.³

La mayoría de los casos del SXF son causados por la expansión dinámica de la tripleta CGG (Citosina Guanina Guanina) repetida en tándem, en la región 5' no traducida del gen FMR1 (Gen del retraso mental del síndrome del cromosoma X frágil). El tamaño de la repetición es polimórfico en la población general. En los individuos no afectados varía entre 5 a 54 repeticiones⁴. En las familias donde segrega la enfermedad, se observan dos categorías de alelos. Los individuos con la premutación presentan de 55 a 200 tripletas y los que portan la mutación completa poseen un número mayor, incluso pueden alcanzar más de 1000 repeticiones. También se ha descrito una "zona gris" que incluye alelos intermedios de 41-60 repeticiones, que traslapan con las repeticiones normales y con la premutación en términos de inestabilidad, lo que dificulta el asesoramiento genético.⁴

La mutación completa produce la hipermetilación del promotor de *FMR1* y, por tanto, la ausencia del producto génico o proteína FMRP, (Proteína del retraso mental del síndrome del cromosoma X frágil) responsable del SXF.^{1,4} La premutación está asociada con falla ovárica prematura en un 20% de las mujeres portadoras y con el síndrome de temblor/ ataxia asociado a X frágil en varones adultos principalmente (también en algunas mujeres), con penetrancia creciente conforme avanza la edad.⁵

FMRP es una proteína de unión al ARN que está implicada en el control de la traducción de una gran variedad de ARNs del cerebro. La función biológica de FMRP es de regulador negativo de la síntesis de proteínas estimulada por el receptor metabotrópico de glutamato tipo I (mGluR), por lo que tiene una función esencial en los mecanismos de plasticidad sináptica.⁶

Willemsen *et al*, desarrollaron el protocolo para la detección directa de la proteína FMRP, por medio de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales, que permite la identificación de las posibles personas afectadas. El procedimiento puede ser aplicado para el diagnóstico posnatal, en frotis de sangre y raíces de cabello, y prenatal, en muestras de vellosidades coriónicas.^{7,9}

En el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) se realiza el estudio molecular de la enfermedad para confirmar la presencia de la mutación completa en individuos portadores del marcador citogenético, o referidos por sospecha clínica de padecer SXF y, además, para identificar a individuos portadores de la premutación en las familias de los probandos. El estudio directo de la mutación es indispensable para ofrecer el asesoramiento genético y es el ensayo diagnóstico definitivo. En 1987 se realizó en Costa Rica un tamizaje basado en la expresión citogenética del sitio frágil, en alumnos de la Escuela de Enseñanza Especial Fernando Centeno Güell, y se encontró una prevalencia del 6% en esa población.¹⁰⁻¹²

El tamizaje en cascada es la estrategia más eficiente en enfermedades como SXF, debido a que los beneficios que obtienen los individuos diagnosticados pueden magnificarse al extenderse a los demás miembros de la familia. Los propósitos principales de esta estrategia son: el diagnóstico de individuos afectados en una etapa temprana para que puedan recibir los máximos beneficios de las terapias educativas y de salud, y la identificación de mujeres con un riesgo alto de transmitir la mutación, quienes valiéndose del asesoramiento genético podrían tomar las medidas reproductivas que contribuyan a disminuir la incidencia del síndrome.¹³

El objetivo de este trabajo fue implementar el tamizaje inmunohistoquímico para la detección de FMRP, en raíces de cabello y en linfocitos de sangre periférica, en niños y adolescentes con alguna deficiencia cognitiva o trastornos de conducta.

Materiales y métodos

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica. Se visitaron los centros educativos para solicitar los permisos respectivos y explicar el proyecto a los maestros. Posteriormente, se realizaron

reuniones con los padres de familia o encargados para la obtención del consentimiento informado, donde se les explicó los alcances del estudio. La entrega de resultados se hizo en las escuelas a los padres de familia.

Se estudiaron 118 niños y adolescentes con una o varias de las siguientes características: retraso mental idiopático (41,5%), rasgos autistas (11%), problemas de aprendizaje (22%), historia familiar de retraso mental (15,3%), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (8,5%) y retraso del desarrollo psicomotor (RDPM 1,7%). Además, la muestra poblacional incluyó dos hermanos varones con diagnóstico citogenético y clínico de X frágil, pero sin la confirmación molecular. El 81% de los sujetos provino de centros de educación especial o de aulas integradas del sistema de enseñanza regular. El 19% restante fue referido por médicos neurólogos. La población de estudio comprendió a 71 (60,2%) varones y a 47 (39,8%) mujeres.

Recolección y preparación de la muestra

Se tomaron aproximadamente 5 ml de sangre periférica y de 10 a 20 cabellos de diferentes sitios de la cabeza. No se pudo tomar la muestra de cabellos en uno de los sujetos y no fue posible la flebotomía en 7 niños; en 5 de estos se obtuvo la muestra mediante dígito punción.

Para el ensayo inmunohistoquímico en sangre se hicieron 6 frotis por individuo en portaobjetos limpios y secos, al menos 4 horas después de la toma de la muestra o inmediatamente, cuando se requirió la punción de la yema del dedo. Se procesaron dos frotis por individuo y las láminas restantes se guardaron a -70 °C.

Los cabellos fueron recortados y examinados al estereoscopio para garantizar que tuvieran raíz. Estos permanecieron a temperatura ambiente por una semana, o se almacenaron a -70 °C.

Detección inmunohistoquímica de FMRP

Se emplearon los métodos de detección indirectos de la inmunoperoxidasa, para los linfocitos de sangre periférica, y el de fosfatasa alcalina para las raíces de cabellos, ambos desarrollados por Willensem y cols, del Departamento de Genética Clínica de la Universidad de Erasmus, en Holanda.^{7,8} Los ensayos siempre incluyeron controles positivos y negativos. Los controles positivos provenían de un varón y una mujer con diagnóstico de X frágil realizado en el INISA, mediante hibridación de Southern.

El análisis de las muestras se hizo a doble ciego. Los linfocitos de sangre periférica se observaron en un microscopio OLYMPUS BX60, en el aumento de 100X. Se analizaron 100 linfocitos por individuo. Las raíces de cabellos se examinaron en el estereoscopio.

Se determinó la expresión de la proteína en ambas muestras, en forma de porcentaje de raíces de cabello y linfocitos de sangre periférica con proteína, respecto al total de raíces y linfocitos examinados. Se consideraron tamizaje positivo aquellas personas con un porcentaje de expresión menor al 70% en raíces de cabello, con base en el criterio de Rifé y colaboradores,¹⁴ y en sangre con menos del 70% en el caso de los varones y menos del 80% en mujeres, según el criterio de Willemsen y cols.⁷

Ensayos moleculares

En las personas tamizaje positivas y en los dos hermanos sin confirmación molecular, se verificó el número de repeticiones CGG por PCR, y en los casos en que esta no fue informativa, se realizó la hibridación de Southern.

Extracción de ADN: se tomaron de 5 a 10 ml de sangre en tubos vacutainer estériles con anticoagulante ACD. Se siguió la metodología descrita por Strauss¹⁵ para la obtención de ADN.

Amplificación por PCR y análisis de los productos: los iniciadores utilizados fueron FRAXA-A (5'-GTCAGGCGTTCAGCTCCGTTT-3') y FRAXA-B (5'-CTCCATCTTCTCTCAGCCCTGCT-3'). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl con 100 ng de ADN genómico, 0,4 µM de cada uno de los iniciadores, 200 µM de cada dNTP, DMSO al 15%, 1,5 mM de MgCl₂ y 2 Unidades de Taq ADN polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo con el siguiente perfil: 1 ciclo de 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 59 °C, 1 min a 72 °C y 1 ciclo de extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 8%, teñidos con nitrato de plata.

Hibridación de Southern: se digirió 5 µg de ADN genómico con la enzima Hind III. Para la hibridación con la sonda StB12.3, se siguió el protocolo especificado por Rousseau y cols.¹⁶

Resultados

Se logró obtener la muestra de raíces de cabellos para 117 participantes, 110 de ellos con resultado inmunohistoquímico; en las 7 muestras restantes la cantidad de pelos con raíz fue insuficiente para el análisis. Se obtuvo 116 muestras para la detección de FMRP en linfocitos, con resultado para 115 personas; la muestra que no se pudo analizar tenía un conteo bajo de linfocitos. La eficacia del tamizaje inmunohistoquímico fue del 94% para el ensayo en raíces de cabello y del 99% para el estudio de la proteína FMRP en sangre.

El 100% de los varones tamizados mostraron más del 70% de expresión de la proteína en raíces de cabello, y el 100% de las mujeres expresaron la proteína FMRP por encima del 75%. No se encontraron individuos tamizaje positivo para el SXF mediante la prueba en raíces de cabello.

Para el análisis de expresión de la proteína FMRP en linfocitos, 13/115 sujetos presentaron niveles de FMRP por debajo de los valores normales para varones y mujeres. Se repitió el ensayo para estos participantes y 11 mostraron ser proteína positivos. Los dos restantes expresaron la proteína FMRP en un 68% y 70%, después de repetir el ensayo. Estas dos muestras correspondieron a dos mujeres con retraso mental de causa desconocida, sin resultado inmunohistoquímico en sus raíces de cabello. La PCR realizada a estas dos participantes no fue informativa, al obtenerse una única banda de 30 repeticiones para ambos casos. La hibridación de Southern mostró una banda normal de repeticiones CGG de aproximadamente 5,2 kb, de manera que estos casos resultaron ser falsos positivos. No se encontraron personas con la mutación completa en este tamizaje.

Los dos niños con diagnóstico citogenético y clínico de X frágil, ambos hermanos, con retraso mental severo e historia familiar, obtuvieron un resultado inmunohistoquímico normal, tanto para las raíces de cabello como para los linfocitos. La confirmación molecular por PCR para estos dos individuos, dado su anterior diagnóstico, mostró dos bandas normales de 30 y 29 repeticiones CGG.

Discusión

La mayoría de las personas con discapacidad intelectual carece de un diagnóstico acertado que explique la causa de sus deficiencias cognitivas.²² El SXF representa del 15% al 20% de casos de retraso mental ligado al X.²³ Si se considera la importancia epidemiológica del SXF, es fundamental contar con un protocolo apropiado para el tamizaje de poblaciones que involucre una técnica sencilla, de bajo costo y que logre arrojar un resultado en un tiempo corto. La detección inmunohistoquímica de la proteína FMRP utilizada en el presente estudio, cumple con estas características.^{7,8,24} Además, la eficacia de la técnica, tanto para la muestra de raíces de cabello como para la de sangre, mostró ser bastante alta.

El primer análisis realizado de expresión de la proteína FMRP en linfocitos, detectó 13 casos tamizaje positivos, de los cuales 11 resultaron con porcentajes de FMRP normales. Probablemente esta discordancia se deba a algunos factores que pudieron afectar la interacción del antígeno con el

anticuerpo: a) la calidad del frotis de sangre, ya que por ejemplo, extensiones sanguíneas gruesas pueden originar falsos positivos por un exceso de citoesqueleto, b) el congelamiento de la muestra, c) errores técnicos durante la realización de la inmunohistoquímica, como podría ser durante la fijación, que permite la conservación intacta del antígeno, o la permeabilización, que contribuye a la penetración de los anticuerpos; si alguno de estos dos procedimientos no es adecuado, no se da la inmunodetección.^{17,25}

Las dos niñas tamizaje positivas y en las que la hibridación de Southern descartó la presencia de expansiones CGG en el gen *FMRI*, resultaron ser falsos positivos; sin embargo, esto no invalida la utilidad de la técnica. Los dos casos pueden explicarse porque el punto de corte utilizado como criterio en este estudio (80%), es necesario para tener una sensibilidad del 100%, según lo reportado por la bibliografía.⁷ La elección de un punto de corte tan alto obedece a que las mujeres con la mutación completa y con retraso mental, pueden llegar a alcanzar porcentajes de expresión que traslapan con los obtenidos por mujeres sin la mutación, debido al proceso de inactivación del cromosoma X. De manera que la especificidad en mujeres es del 41 %⁷ y por ende el resultado. No obstante, mantener este punto de corte, aunque se obtengan falsos positivos, es preferible a que se dejen pasar casos de mujeres con la mutación completa, pero que cuentan con niveles normales de FMRP en sangre, sobre todo cuando se incluyen poblaciones con retraso leve o con problemas de aprendizaje.

Tanto el ensayo en raíces de cabello como en linfocitos fueron inequívocos para descartar el síndrome en dos varones con “diagnóstico” citogenético, y que luego fue confirmado mediante la PCR. Sería recomendable realizar ensayos de ADN en todas aquellas personas que tienen “diagnóstico” citogenético del síndrome en el país, porque este ensayo ya no se considera adecuado para el diagnóstico de tal condición, debido a que tanto su especificidad como su sensibilidad son insuficientes.²⁶

Según lo reportado por varios autores,^{8,15,27,28} el estudio de la expresión de FMRP en raíces de cabello parece ser el más conveniente para tamizaje poblacional, pues no existe traslape de los porcentajes de expresión de individuos afectados con los no afectados, tanto en hombres como mujeres. En ambos sexos se da una correlación entre el coeficiente intelectual y la expresión de FMRP en las raíces pilosas, lo que tiene valor para predecir la capacidad intelectual de los niños con la mutación completa. Además, el ensayo inmunohistoquímico en raíces de cabello tiene una serie de ventajas, como no requerir personal experimentado al coleccionar la muestra, obtención simple, menos daño y ansiedad para el paciente, y menos infecciones como las causadas por la punción de la vena del brazo.⁸

En el presente estudio no se encontró personas con el SXF; un resultado similar se informó en países como Brasil

Cuadro 1. Frecuencia del SXF en diferentes muestras poblacionales

País	Población meta	Tipo de tamizaje	N	Frecuencia
Holanda ¹⁷	Varones con retraso mental	Inmunohistoquímico en linfocitos de sangre	412	2/412 (0,48%)
España ¹⁵	Niños con retraso mental	Inmunohistoquímico en raíces de cabello	65	1/65 (1,5%)
El Perú ¹⁸	Niños y niñas con retraso mental, autismo, problemas de lenguaje, problemas de aprendizaje	Inmunohistoquímico en raíces de cabello	200	7/200 (3,5%)
Cuba ¹⁹	Varones con retraso mental	Inmunohistoquímico en linfocitos de sangre	7 712	37/7 712 (0,48%)
Brasil ²⁰	Varones y mujeres con retraso mental	Molecular (PCR)	85	0/85 (0%)
Chile ²¹	Varones con retraso mental, características clínicas para el SXF y algunos con resultado citogenético	Clínico y molecular (PCR e hibridación de Southern)	99	23/99 (23,2%)
Costa Rica*	Niños y adolescentes con retraso mental, autismo, historia familiar, problemas de aprendizaje, TDAH; RDPM	Inmunohistoquímico en raíces de cabello y sangre	118	0/118 (0%)

*Presente estudio

y Cuba, y en general, en la mayoría de los estudios la frecuencia fue muy baja, a diferencia de El Perú y Chile (Cuadro 1). En el caso de El Perú, los casos tamizaje positivos no se confirmaron molecularmente.¹⁸ La prevalencia de X frágil en personas con retraso mental que cita la bibliografía posiblemente estaba sobrestimada, pues se consideraba de un 3% a un 16%.²⁹ Sin embargo, más recientemente se acepta que la prevalencia del síndrome en estas poblaciones es muy baja, aproximadamente del 0% al 8% con un promedio del 1,8%.¹⁴ Si el tamizaje se acompaña de una preselección con puntaje clínico para el síndrome, se puede mejorar la eficiencia de este hasta un 6,7%.³⁰ Es quizás por ese motivo que la frecuencia en poblaciones seleccionadas chilenas fue muy alta, pues los sujetos que se estudiaron tenían fenotipo sugestivo de X frágil y algunos contaban con resultado citogenético positivo.²¹ Diferente resultado mostró otro estudio en este mismo país, en el que se incluyeron niños con retraso mental de origen desconocido, sin realizar la preselección clínica, donde la frecuencia resultó ser del 1,7%, congruente con lo esperado.³¹ Por tanto, es importante tener en cuenta el puntaje clínico para encontrar el mayor número posible de afectados.

Los datos de este estudio no concordaron con los de Castro y Cuenca,^{12,13} quienes realizaron un tamizaje basado en la detección del marcador citogenético, en una población de 118 estudiantes costarricenses con retraso mental. La frecuencia encontrada en este estudio fue del 6%. Sin embargo, esta frecuencia podría estar sobrestimada, debido a que el ensayo citogenético ya no se realiza por su baja

especificidad y sensibilidad.¹⁴ Esto obedece a que en el cromosoma X pueden expresarse otros sitios frágiles ubicados en las bandas Xq27-Xq28 (FRAXD, FRAXE, FRAXF), que son citológicamente indistinguibles del sitio FRAXA. Por otra parte, puede pensarse que la frecuencia del SXF es más baja en la población costarricense que la reportada para muchas poblaciones. La prevalencia de la enfermedad en Cuba se determinó en 1/18 000 habitantes, más baja que la esperada.¹⁹ Sequeira y cols no encontraron premutaciones en una muestra de 943 recién nacidos costarricenses (comunicación personal), a pesar de que la bibliografía informa que la prevalencia de portadores de la premutación es de aproximadamente 1/800.²⁹ La frecuencia del SXF en autistas es de aproximadamente el 6%, aunque también se han reportado frecuencias más bajas (2,5%).³² En Costa Rica, 222 autistas fueron investigados para el SXF mediante análisis de ADN, y se encontraron 4 afectados (datos no publicados), para una frecuencia del 1,8%, por debajo de lo reportado en la bibliografía. De manera que la idea de una baja frecuencia del síndrome en el país, podría estar apoyada por estos hallazgos, pero se requieren más estudios que deberían incluir una mayor muestra poblacional.

En conclusión, la técnica inmunohistoquímica para la detección de la FMRP, es un método fiable, relativamente sencillo, rápido y de bajo costo, por lo que es ideal para el tamizaje en varones. El ensayo en raíces de cabello es fiable, tanto para el tamizaje en varones, como en mujeres con algún grado de deficiencia intelectual. Tomando en cuenta lo

anterior, la inmunodetección puede ser de gran utilidad en la identificación de casos no diagnosticados, junto con el tamizaje en cascada para determinar los familiares en riesgo de ser portadores o de estar afectados. Esto es de gran relevancia porque permite la intervención temprana en programas educativos para los afectados y el asesoramiento genético para los familiares en riesgo.

Agradecimientos: A Rob Willemsem, de la Universidad de Erasmus, por el entrenamiento brindado a uno de nosotros (ICV); a Fernando Ortiz, técnico del Laboratorio de Citogenética (INISA); al personal técnico del Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital México; al CONICIT y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Referencias

1. Crawford DC; Acuna JM; Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001;3: 359-371.
2. Hagerman RJ. Physical and behavioral phenotype. In: Hagerman RJ; Hagerman PJ; editors. *Fragile X syndrome: diagnosis; treatment and research*. 2nd edition. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1996: 3-87.
3. Ferrando-Lucas M; Banús-Gómez P; López-Pérez G. Aspectos cognitivos en niñas con síndrome X frágil. *Rev Neurol* 2004; 38: S53-S57.
4. Penagarikano O; Mulle J; Warren S. The pathophysiology of fragile X syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 109-129.
5. Willemsen R; Mientjies E; Oostra BA. FXTAS: a progressive neurologic syndrome associated with fragile X permutation. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005; 5: 405-410.
6. Bear MF; Huber KM; Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 2004; 24: 370-377.
7. Willemsen R; Smits A; Mohkamsing S; van Beerendonk H; de Haan A; de Vries B; et al. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique. *Hum Genet* 1997; 99: 308-311.
8. Willemsen R; Anar B; de Diego- Otero Y; de Vries B; Hilhorst-Hofstee Y; Smits A; et al. Noninvasive test for fragile X syndrome; using hair root analysis. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 98- 103.
9. Lambiris N; Peters H; Bollmann R; Leschik G; Leisti J; Salonen R; et al. Rapid FMR1- protein analysis of fetal blood: an enhancement of prenatal diagnostics. *Hum Genet* 1999; 105: 258-260.
10. Cuenca P; Morales F; Castro I. Diagnóstico directo de la mutación que causa el síndrome del cromosoma X frágil. Experiencia en Costa Rica. *Acta Méd Costarric* 2002; 44: 27-33.
11. Castro I; Cuenca P. Tamizaje de sitio frágil en el cromosoma X en una población de retardados mentales. *Rev Méd Hosp Nal Niños Costa Rica* 1987; 1: 1- 14.
12. Castro I; Cuenca P. Frecuencia del síndrome del cromosoma X frágil en la Escuela de Enseñanza Especial "Fernando Centeno Güell". *Acta Pediatric Costarric* 1996; 10: 99- 106.
13. Pembrey ME; Barnicoat AJ; Carmichael B; Bobrow M; Turner G. An assessment of screening strategies for fragile X syndrome in the UK. *Health Technol Assess* 2001; 5: 29-42.
14. Rifé-Soler M; Sánchez A; Ramos F; Milá-Recasens M. Estudio de la proteína FMRP en la raíz de cabello: aplicación al diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil. *An Pediatr (Barc)* 2003; 59: 431-435.
15. Strauss WM. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In: Ausubel FM; Brent R; Kingston RE; editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley; 1998: 2.2.1-2.2.3.
16. Rousseau F; Heitz D; Biancalana V; Blumenfeld S; Kretz C; Boue J; et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673-1681.
17. de Vries BB; Mohkamsing S; van den Ouweland AM; Halley DJ; Niermeijer MF; Oostra BA; et al. Screening with the FMR1 protein test among mentally retarded males. *Hum Genet* 1998; 103: 5202.
18. Gallardo-Jugo B; Klein-Zighelbouim E; Ruiz-Farfán EM; Noli-Erquinio L; Chávez-Pastor M; Rodríguez-O'Donnell A. Diagnóstico inmunohistoquímico en pacientes con retardo mental de causa no conocida que acuden al Instituto Especializado de Salud del Niño y hogar Clínica San Juan de Dios de agosto de 2004 a febrero de 2005 con fines preventivos en familias en riesgo. Recuperado el 12 de diciembre de 2008; En: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc/informes_tecnicos/82.pdf .
19. Lardoeyt R; Lantigua A; Willemsem R; Collazo T; Esperón A; Maceira L. Epidemiología y genética del Síndrome de X Frágil en Ciudad de la Habana; Cuba. *Acta Biol Colomb* 2008; 13: M64.
20. Mulatinho M; Llerena J; Pimentel M. FRAXA screening in Brazilian institutionalized individuals with non specific severe mental retardation. *Genet Test* 2000; 4: 283-287.
21. Alliende MA; Aravena T; Valiente A; Curotto B; Santa María L; Cortés F. Tamizaje clínico y análisis de mutaciones en el gen FMR1 en 99 varones con características clínicas del síndrome de X- frágil. *Rev Chil Pediatr* 2006; 77: 34-42.
22. Yeargin-Allsopp M; Murphy C; Cordero J; Decoufle P; Hollowell JG. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10 years old children; metropolitan Atlanta; 1985 to 1987. *Dev Med Child Neurol* 1997; 39: 142-149.
23. Guillén-Navarro E; Glóver-López G. Causas monogénicas de retraso mental ligado al X. *Rev Neurol* 2006; 42 (Supl 1): S45-S49.
24. Willemsen R; Oostra B. FMRP detection assay for the diagnosis of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 97: 183-188.
25. Lardoeyt-Ferrer R; Lantigua-Cruz A. Experiencias técnicas en el uso de la prueba inmunohistoquímica para el diagnóstico del síndrome de X frágil. *Rev Cubana Invest Biomed* 2004; 23: 259-265.
26. Maddalena A; Richards CS; McGinniss MJ; Brothman A; Desnick RJ; Grier RE; et al. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease- specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American College of Medical Genetics. *ACMG* 2001; 3: 200-205.
27. Tassone F; Hagerman RJ; Iklé DN; Dyer PN; Lampe M; Willemsen R et al. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 84: 250-261.
28. Tuncbilek E; Alikasifoglu M; Aktas D; Duman F; Yanik H; Anar B; et al. Screening for the fragile X syndrome among mentally retarded males by hair root analysis. *Am J Med Genet* 2000; 95: 105-107.
29. Murray J; Cuckle H; Taylor G; Hewison J. Screening for fragile X syndrome. *Health Technol Assess* 1997; 1:1-69.
30. de Vries BB; Mohkamsing S; van den Ouweland AM; Mol E; Gelsema K; van Rijn M; et al. Screening for the fragile X syndrome among the mentally retarded: a clinical study. The Collaborative Fragile X Study Group. *J Med Genet* 1999; 36: 467-70.
31. Aspíllaga HM; Jara SL; Avendano BI; Lopez SM. Fragile X syndrome. Clinical analysis of 200 Chilean patients with unspecific mental retardation. *Rev Med Chile* 1998; 126:1447-1454.
32. Dissanayake C; Bui Q; Bulhak-Paterson D; Huggins R; Loesch D. Behavioural and cognitive phenotypes in idiopathic autism versus autism associated with fragile X syndrome. *J Child Psychol Psychiatry* 2008; 50: 290-299.