



**Citogenética y
genética molecular
del retraso mental
ligado al cromosoma X,
aplicación al
diagnóstico de
portadoras y prenatal**

**Félix Prieto García
Francisco Martínez Castellano
Francisco Palau Martínez
Magdalena Beneyto Juan
Lourdes Badía Garrabou**



MINISTERIO DE ASUNTOS SOCIALES

Real Patronato de Prevención
y de Atención a Personas con Minusvalía

080
7 JUN. 1991

SIS

Reina Regente, 5 - bajo
Apdo. 667
SAN SEBASTIAN-3

A2.17

R-4795 (2)

**CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR
DEL RETRASO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA X,
APLICACION AL DIAGNOSTICO DE PORTADORAS
Y PRENATAL**

**Félix Prieto García
Francisco Martínez Castellano
Francisco Palau Martínez
Magdalena Beneyto Juan
Lourdes Badía Garrabou**

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal. Hospital «LA FE».

Valencia, 1990

**CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR DEL RETRASO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA X.
APLICACION AL DIAGNOSTICO DE PORTADORAS Y PRENATAL**

- . **AUTORES:** Félix Prieto García, Francisco Martínez Castellano, Francisco Palau Martínez, Magdalena Beneyto Juan y Lourdes Badía Garrabou. Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal. Hospital "La Fe" de Valencia.
- . **DOCUMENTOS** 25/91
- . **EDITA:** Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía.
- . **DISTRIBUCION:** SIIS. Centro de documentación e información. Concertado con el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía. Serrano, 140, 28006 Madrid.
- . **IMPRIME:** Artegraf.
- . Primera edición: Marzo, 1991. 1.000 ejemplares

Diseño cubierta: Javier González Solas

- . NIPO: 380-91-001-8
- . DEPOSITO LEGAL: M - 11.228 - 1991

CITOGENETICA Y GENETICA MOLECULAR
DEL RETRASO MENTAL LIGADO AL CROMOSOMA X,
APLICACION AL DIAGNOSTICO DE PORTADORAS Y
PRENATAL

Memoria de Investigación sobre Citogenética y Genética Molecular del retraso mental ligado al cromosoma X, realizada por el Dr. Félix Prieto García y su grupo de trabajo de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital "LA FE" de Valencia.

Esta Memoria corresponde al periodo
Enero de 1970 - Marzo de 1990

Premio Reina Sofía 1990, de investigación sobre prevención de las deficiencias.

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos expresar nuestro agradecimiento a las familias con pacientes afectos de minusvalías psicofísicas, verdaderas protagonistas de esta Memoria de Investigación. A ellas nuestro afecto y admiración.

Nuestro reconocimiento al Dr. Andreas Gal del Institut für Humangenetik der Universität Bonn por el estudio sobre ligamiento genético realizado en la familia con síndrome dismórfico y retraso mental ligado al cromosoma X.

También al Dr. Vicente Rubio del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Caja de Ahorros de Valencia por el estudio realizado en relación con la valoración de ornitina carbamil transferasa (OTC) en algunos miembros de esta misma familia.

SUMARIO

	Pag.
1.- Introducción.	9
2.- Síndrome del Cromosoma X-frágil.	15
2.1.- Genética Molecular en el Síndrome X-frágil.	17
2.2.- Metodología.	19
2.3.- Resultados.	25
3.- La aplicación de la Genética Molecular a los re- trasos mentales ligados al cromosoma X con citogé- tica normal y causa desconocida.	32
3.1.- Planteamiento del problema diagnóstico y - genético.	32
3.1.1.- Metodología.	38
3.1.2.- Análisis formal de los estudios de ligamiento.	41
3.1.3.- El locus de este síndrome con RMLX está localizado en el brazo corto del cromosoma X(Xp11.22-Xp21.1).	43

3.1.4.- ¿Que utilidad práctica tienen estos estudios?.	49
3.1.5.- ¿Cual es el futuro que se vislumbra con la aplicación de la genética molecular al estudio de los retrasos mentales ligados al cromosoma X?.	50
4.- Bibliografía.	53

1.- INTRODUCCION.

Se estima que el 0,5% de los recién nacidos vivos y el 6% de los nacidos con malformaciones congénitas mayores presentan una cromosomopatía responsable del cuadro malformativo y de un posterior retraso mental (Karter y Warkany, 1983).

Por ser estas cromosomopatías debidas a un exceso (trisomias completas o trisomias parciales) o a un defecto en la cantidad de material genético (deleciones), su identificación ha sido siempre un objetivo preferente, porque solo el conocimiento del material genético implicado en una cromosomopatía permite relacionar esta con el cuadro malformativo y la implicación que esta puede tener con el retraso mental.

Durante la década de los años 60 y al comienzo de la década de los 70, solo se disponía de la técnica autorradiográfica para intentar identificar los cromosomas. Este método, por ejemplo, en los síndromes de Wolf (4p-) y de Lejeune (5p-), diferenciaba el cromosoma del par 4 ó 5 implicado, porque en el primer síndrome el cromosoma delecionado forma parte del

par que replica su ADN más tardíamente, mientras que en el segundo síndrome el cromosoma deleciónado forma parte del par que replica más precozmente (Prieto y cols. 1975). Este método autorradiográfico con representar una ayuda para la diferenciación de ambos síndromes tenía muchas limitaciones.

La descripción de los métodos de bandas al comienzo de la década de los años 70 fué un logro importante, porque con estos métodos no solo se podían identificar cada uno de los cromosomas, sino también sus aberraciones. Así en el síndrome de Lejeune y debido a la variabilidad que bajo el punto de vista citogenético presentan los pacientes con este síndrome, pudimos demostrar que el segmento cromosómico responsable del síndrome asignado en principio por Niebuhr (1972) a la porción distal de la banda p14 y proximal de la banda p15, debería circunscribirse a la región proximal de la banda p15 (Prieto, 1974; Prieto y cols. 1976).

El estudio citogenético aplicado de forma sistemática junto con distintos métodos de identificación de los cromosomas en 12.042 pacientes remitidos para estudio desde 1970-1990, nos ha permitido conocer el cariotipo en 974 pacientes con malformaciones y retraso mental en diferentes síndromes que cursan con alteraciones citogenéticas de los autosomas (Tabla 1).

Tabla 1.- Alteraciones autosómicas numéricas

(Periodo= 1970 - 31 marzo 1990, sobre un total de estudios citogenéticos realizados = 12.042).

	trisomias completas	regulares	mosaicos c/transloc. robertson.	asociadas a otras alter.	TOTAL
Cromos.21	738	31	26	11	806
Cromos.13	23	-	6	-	29
Cromos.18	59	4	-	2(*)	65
Cromos. 9	-	3	-	-	3
Cromos. 8	2	1	-	-	3

	822	39	32	13	906

(*) 2 casos triplo X y trisomía 18 asociados.

Mediante este estudio se detectaron además 26 familias de alto riesgo genético (Tabla 2 y 3). A cada una de ellas pertenecen varios miembros portadores de alteración cromosómica equilibrada (Prieto y cols. 1989). Por ejemplo, una de estas familias identificada al estudiar una niña con cariotipo: 46,XX,-3,+der(3),t(3;4)(p27;p11) permitió identificar a 16 miembros sanos de su familia que eran portadores de t(3;4)(p27;p11) (Prieto y cols. 1980b; Beneyto y cols. 1989).

Estas familias, que en su descendencia tuvieron hijos con cromosopatía "de novo" (974 parejas) o cromosopatía heredada (26 familias), fueron asesoradas genéticamente. Además se les ofertó para sucesivas gestaciones la posibilidad de un diagnóstico citogenético prenatal.

El estudio citogenético permitió reconocer además, que la trisomía 21 puede producirse mas facilmente en algunas familias portadoras de: microcromosoma peculiar (Prieto y cols. 1981a), inversión de material genético en un cromosoma (Prieto y cols. 1981b), translocación reciproca en la que está implicado un autosoma 21 (Prieto y cols.1980a; Prieto y Badía, 1983) o de un gen mutante que puede predisponer una no-disyunción (Prieto y cols.1986).

Tabla 2.- Trisomias y monosomias parciales

	heredadas	"de novo"	TOTAL
Trisomias			
parciales	17	13	30
Monosomias			
parciales(*)	2	36	38

	19	49	68

(*) 12 casos con síndromes de Lejeune (5p-)

todos "de novo"

3 casos con síndromes de Wolf (4p-)

Tabla 3.- Trisomias 13 y 21 por translocación robertsoniana

Tipo de translocac.	Trisomía 21		Trisomía 13		TOTAL
	"de novo"	heredada	"de novo"	heredada	
t(13q;21q)	1	2	-	-	3
t(14q;21q)	10	3	-	-	13
t(21q;21q)	10	0	-	-	10
t(13q;14q)	-	-	1	2	3
t(13q;13q)	-	-	3	0	3

	21	5	4	2	32

2.- SINDROME DEL CROMOSOMA X-FRAGIL

La citogenética también puede detectar un síndrome asociado a retraso mental que fué descrito por Martin y Bell en 1943. Este síndrome está asociado con un marcador citogenético (Lubs, 1969). Se trata de un punto frágil localizado en los brazos largos del cromosoma X a nivel de la banda Xq27.3 (Sutherland y Mulley, 1990). Actualmente se considera este síndrome del cromosoma X-frágil la causa heredada más frecuente de retraso mental.

Mediante el estudio citogenético utilizando medio de cultivo TC199 envejecido, hemos identificado 17 familias en las que la valoración del cariotipo detectó el cromosoma X-frágil en 35 varones y 18 portadoras. El estudio del árbol genealógico familiar en estas familias sugiere un patrón de herencia dominante ligada al cromosoma X con penetrancia incompleta; sin embargo, la experiencia obtenida del estudio de estas 17 familias junto con la de otros estudios (Sutherland y Mulley, 1990) demuestra que la utilidad del marcador citogenético para el diagnóstico de portadoras es limitada dado que aproximadamente el 50% de estas manifiesta un fenotipo normal y no presentan el X-frágil, ni siquiera en el 1% de las metafases analizadas, mientras que su utilidad para el

diagnóstico prenatal ha resultado ser también poco fiable. Además no permite detectar los varones transmisores no penetrantes. Todo ello representa una seria limitación para asesorar genéticamente a estas familias y limita en gran medida las posibilidades para hacer un diagnóstico prenatal correcto.

2.1.- Genética Molecular en el Síndrome X-frágil

Existen hoy en día unas técnicas de análisis molecular, que permiten el estudio y diagnóstico de este síndrome con mayor fiabilidad. Se basan en el uso de polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs) de gran utilidad como marcadores genéticos. Se conoce un número cada vez creciente de RFLPs, y aquellos que están genéticamente ligados al gen responsable del síndrome serán útiles para el diagnóstico. Si una madre es heterocigota para el marcador, el estudio de la familia permite la identificación del alelo que cosegrega con la mutación. Dado que existe la posibilidad de una recombinación entre el marcador y el gen X-FRA, el análisis de marcadores a ambos lados del gen puede ser útil para detectarla, y evitar un diagnóstico erróneo. Es necesario conocer con la máxima seguridad las frecuencias de recombinación entre el X-FRA y los distintos marcadores, así como su ordenación en el cromosoma pues nos indicarán la fiabilidad de los diagnósticos.

Hay considerable evidencia a favor de la existencia de diferencias familiares en el ligamiento entre el gen del factor IX de coagulación y el gen X-FRA (Brown y cols., 1987; Brown y cols., 1988), maximizándose la probabilidad de los datos (con un nivel de significación de $P < 0,0005$) bajo el supuesto de un 20% de familias que presentan un fuerte

ligamiento entre el gen del factor IX (F9) y el X-FRA y un 80% donde el ligamiento es menor, aproximadamente 35 cM.

2.2.- Metodología

El ADN genómico total se obtuvo a partir de sangre periférica, con EDTA como anticoagulante. Muestras de 10 µg de ADN se sometieron a digestión con 4-6 veces de exceso de enzima de restricción, A continuación se fraccionaron mediante electroforesis en gel de agarosa a 35 voltios durante toda la noche. Posteriormente el ADN se transfirió a membranas de nylon (Hybond N, Amersham) según el procedimiento descrito por Southern (Southern, 1975).

La hibridación con la sonda marcada se realizó en SSC 5x, lauroilsarcosina 0,1%, SDS 0,02%, agente de bloqueo (Boehringer Mannheim) 5% y formamida desionizada 50%, incubándose toda la noche a 42°C con 20-40 ng de sonda marcados por ml.

Los lavados fueron 2 x 5 min. en SSC 2x, SDS 0,1% a temperatura ambiente y 2 x 15 min. en SSC 0,1x/0,5x, SDS 0,1% a 65°C.

Para el marcaje de la sonda y su posterior detección se utilizó el kit no radioactivo de la casa Boehringer Mannheim. La sonda se marca por oligomarcaje con Digoxigenina, que posteriormente es reconocida por anticuerpo antidigoxigenina

conjugado con fosfatasa alcalina. Este enzima cataliza una reacción coloreada que permite la visualización de las bandas. La sensibilidad que alcanza este método (0,1 pg de ADN) permite la detección de secuencias de copia única en el genoma humano, pero es algo menor que la del ^{32}P , lo que implica una cierta mayor dificultad técnica, así como el uso de mayores cantidades de sonda.

Una vez visualizadas las bandas de los filtros es posible lavarlas con dimetil-formamida (siguiendo las especificaciones de los fabricantes) para una nueva hibridación con otra sonda. Sin embargo el filtro es muy sensible a este proceso, por lo que difícilmente podrá ser utilizado más de dos veces.

Sin embargo, todos estos inconvenientes se ven ampliamente compensados por la ausencia de riesgos que comporta el no trabajar con radioactividad, deja de ser necesaria la disponibilidad de una zona reservada exclusivamente para el ^{32}P y se eliminan las complicaciones de los desechos radioactivos. Por otro lado, la definición de las bandas puede ser mayor, lo cual es de considerable interés para ciertos polimorfismos (Fig.1). Otra gran ventaja que no posee el ^{32}P es que la sonda marcada puede almacenarse durante prolongados periodos de tiempo a $-20^{\circ}C$ sin perder apenas actividad y permiten ser reutilizadas.

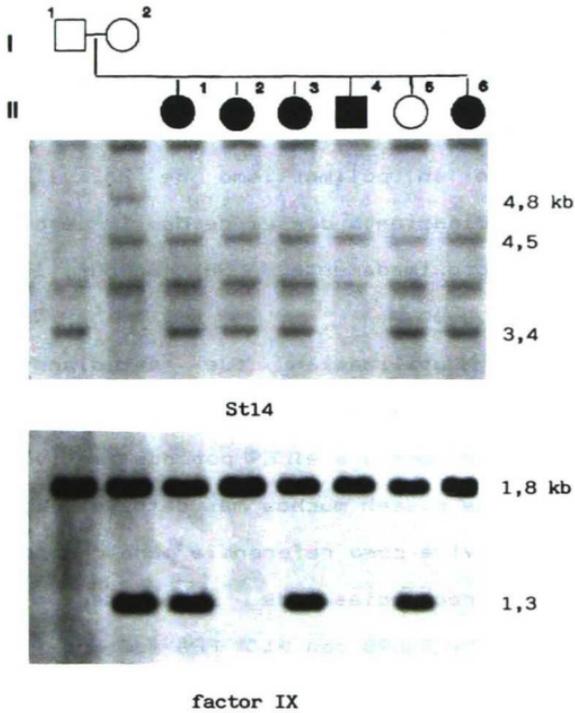


Fig. 1.- Polimorfismos detectados para las sondas St14 y factor IX con la enzima TaqI. Los dos filtros - corresponden a la familia 6.

La relación de sondas y enzimas de restricción utilizadas en este estudio están reflejadas en la tabla 4.

Recientemente recibimos dos nuevas sondas: 4DB-B y 4DB-IV. Esta es una variante de la 4D-B que reconoce dos polimorfismos más con Xmn I y aumenta la informatividad aproximadamente un 16%. La 4DB-B reconoce un polimorfismo de Bgl II con fuerte desequilibrio de ligamiento con el de Msp I, pero ligeramente más informativa, aproximadamente un 32% (Schnur, 1989).

La estrategia de utilización fue estudiar primero los marcadores más cercanos por ambos lados (DXS52, DXS105 y DXS98). También se estudió el F9 por dos motivos: por una parte, dado que se poseen muchos más datos de ligamiento con el X-FRA, nos servirá como referencia para conocer con mayor exactitud las frecuencias de recombinación entre los marcadores DXS105 y DXS98 con el X-FRA mediante análisis de ligamiento multipuntual. Por otro lado es interesante su estudio para determinar la naturaleza y región responsable de la heterogeneidad de ligamiento entre el X-FRA y el F9, así como si también afecta a los marcadores más próximos por el momento conocidos.

Tabla 4.- Sondas utilizadas

Sonda	Locus	Enzimas	Informat.	Ø con XFRA (LOD)	Referencias
(proximales)					
52A	DXS51	Taq I	0,50	0,21(14)	Drayna,1984
VIII	F9	Taq I	0,30	0,22*(55)	Tonnesen,1984
XIII	F9	Dde I	0,36		Winship,1984
55.E	DXS105	Hind III	0,48	0,06-0,18	Arveiler,(a)
cX55.7	DXS105	Taq I			Hofker,1987
		Stu I			Rekilä,1988
4D-B	DXS98	Msp I	0,28	0,05(3,4)	Boggs,1984
(distales)					
St-14	DXS52	Bcl I	0,32	0,12*(77)	Oberle,1985
		Taq I	0,81		
DX13	DXS15	Bgl II	0,50	0,14(13)	Harper,1984
F.814	F8C	Bcl I	0,34	0,11-0,16	

(*) Estimada por análisis multipuntual.

Con marcadores informativos a ambos lados la probabilidad de error es el producto de sus frecuencias de recombinación (suponiendo que no exista interferencia) y por tanto será baja: 0,6% para DXS98 y DXS52, 2,8% para F9 y DXS52. Sin embargo, si los marcadores sólo son informativos por un lado del X-FRA, la probabilidad de error es la propia frecuencia de recombinación y por tanto será bastante mayor. De aquí la necesidad de otras sondas de localización algo más lejana pero que puedan ser útiles en caso de que las más cercanas no sean informativas. Por el lado distal, dada la alta informatividad de DXS52, una sola hibridación suele ser suficiente. Sin embargo, al ser menor la informatividad de DXS105 y DXS98, el número de hibridaciones necesarias para la zona proximal puede variar ampliamente de unas familias a otras: de dos a ocho.

Posteriormente, un diagnóstico prenatal cuando la familia ya ha sido estudiada sólo requerirá hibridar el ADN del probando con las dos sondas informativas más cercanas, de aquí la necesidad de aconsejar a las familias que se realice el estudio lo antes posible.

2.3.- Resultados

En nuestra Unidad con el método descrito, hemos estudiado por el momento 53 individuos pertenecientes a 7 familias distintas, 28 hembras y 25 varones (Figs. 2,3,4, y 5).

De las 23 hembras estudiadas citogenéticamente, el sitio frágil Xq27.3 pudo ser detectado en 10. Entre las 13 hembras restantes hay 5 que son portadoras obligadas, por lo que solamente en 8 no estaba clara su condición de portadora o no.

Mediante análisis de la segregación de los haplotipos en sus respectivas familias pudo concluirse que la mujer II-2 de la familia F1, era portadora de la mutación del X-FRA. Mientras que otras cuatro hembras (II-3 de la familia F2, III-2 de la familia F3, II-1 y II-5 de la familia F5) no eran portadoras basándonos en los marcadores genéticos DXS52 por un lado y DXS105 y/o DXS98 por el otro. En la familia F1 resultó ser portadora de la mutación del X-FRA la hembra III-2.

Otro caso (III-2 de la familia F2) su madre fue informativa para F9 y DXS52. La probando heredó el alelo materno del factor IX asociado a la mutación, mientras que el perteneciente a DXS52 era el asociado al alelo normal, lo que indica que se ha producido una recombinación entre ambos marcadores. A falta de marcadores informativos más cercanos a X-FRA que indiquen donde

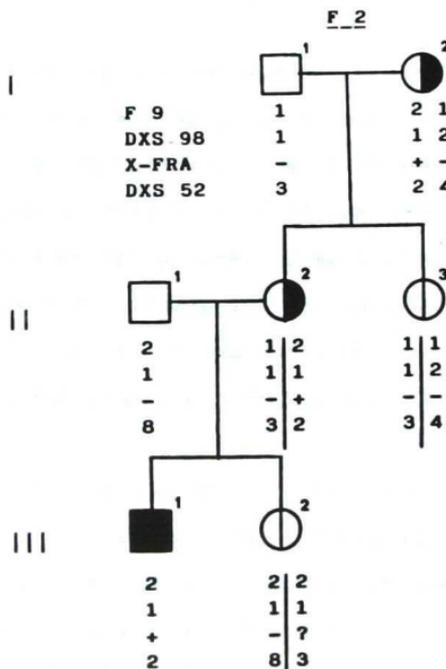
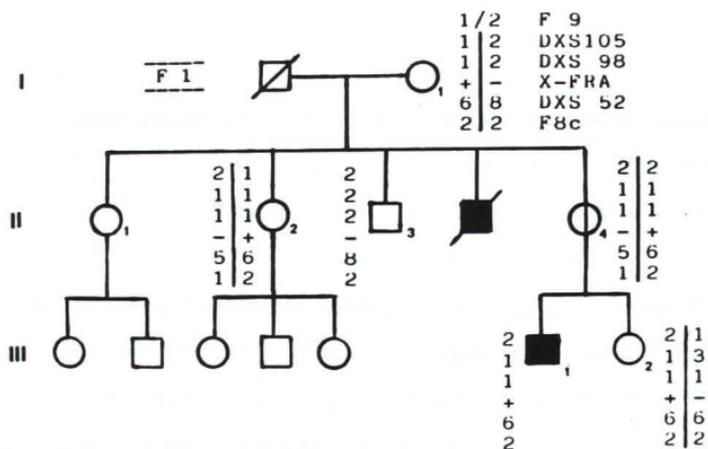


Fig. 2.- Haplotipos de las familias F1 y F2. No se incluyen los marcadores que no resultan informativos.

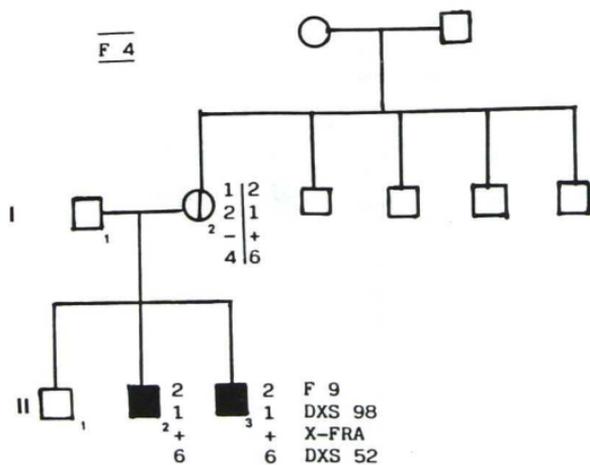
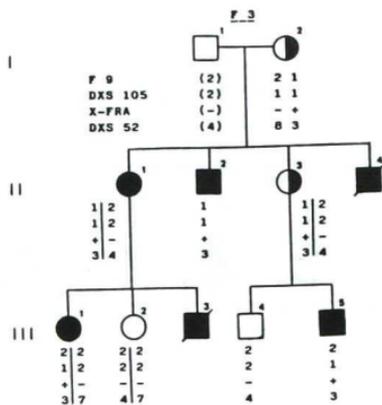


Fig. 3.- Haplotipos de las familias F3 y F4.

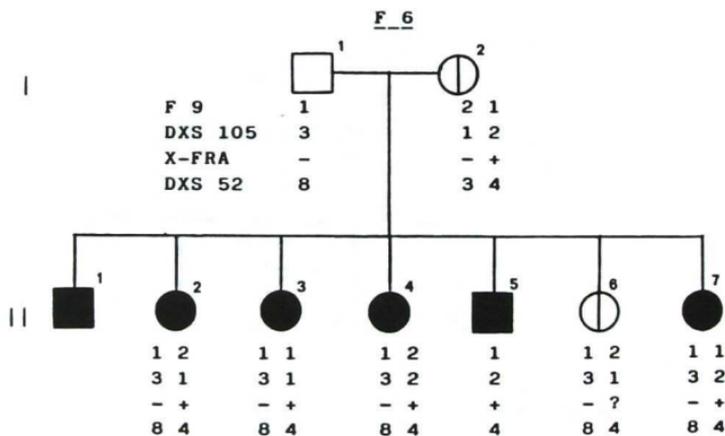
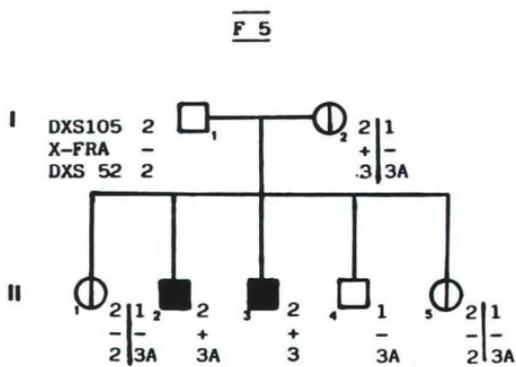
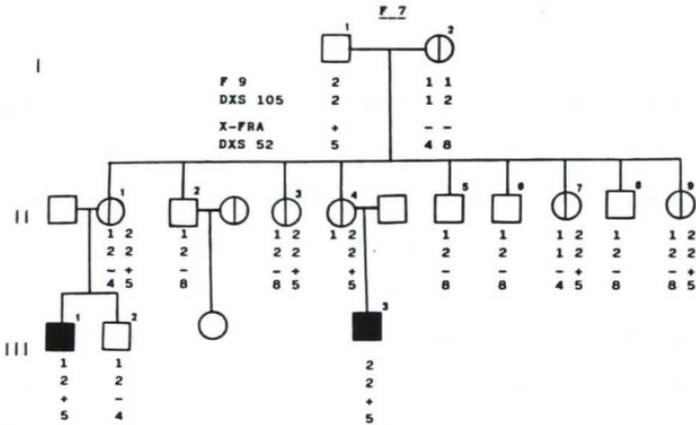


Fig. 4.- Haplotipos de las familias F5 y F6.



CLAVE

-   Varón, hembra con fenotipo normal
-   Afectos y con marcador citogenético
-  No afecta y con marcador citogenético
-  Estudiada citogenéticamente
-  Difunto

Fig. 5.- Haplotipos de la familia F7 y claves utilizadas para los arboles genealógicos.

se ha producido la recombinación, no es posible conocer si es o no portadora.

El caso correspondiente a la hembra II-6 de la familia F6, es el más complejo e interesante. En la familia destaca ya la alta penetrancia en las hembras: Las cuatro hembras en las que se detectó el sitio frágil (además en elevada frecuencia) sufren retraso mental. La quinta (II-6) en la que no se detectó, posee el mismo alelo materno del marcador DXS52 que los cinco hermanos afectados estudiados. Sin embargo, con respecto a DXS105, dos hermanas poseen el mismo alelo que ella y los otros tres hermanos el otro alelo. Esto hace muy difícil establecer la fase de ligamiento entre el gen X-FRA y DXS105, en la madre y hace indispensable el cálculo de probabilidades de ser portadora en función de los marcadores estudiados y las frecuencias de recombinación con el X-FRA.

Finalmente en otra familia (F7), el estudio molecular nos ha permitido detectar cinco hermanas portadoras en las que el estudio citogenético había sido negativo en todas ellas. Esta familia fué estudiada a raíz de que una de estas portadoras tuviera un hijo con retraso mental debido a X-frágil. El estudio molecular demuestra que el abuelo del probando (I-1) es un varón transmisor sano.

Como conclusiones de este estudio sobre genética molecular del retraso mental debido al X-frágil se deduce que es importante para un futuro.

1.Fijar con mayor significatividad tanto el orden preciso de los marcadores disponibles, como las frecuencias de recombinación con el gen responsable de la mutación; así como la naturaleza de la posible heterogeneidad de ligamiento en la región proximal de X-FRA.

2.Utilizar nuevos marcadores localizados mucho más próximos al X-FRA que incrementarán la fiabilidad del diagnóstico y disminuirán la proporción de casos dudosos por recombinación entre los marcadores; en última instancia permitirán el aislamiento del gen o los genes responsables del síndrome.

3.- LA APLICACION DE LA GENETICA MOLECULAR A LOS RETRASOS MENTALES LIGADOS AL CROMOSOMA X CON CITOGENETICA NORMAL Y CAUSA DESCONOCIDA.

3.1.- Planteamiento del problema diagnóstico y genético.

El grupo de síndromes con retraso mental ligado al cromosoma X que no presentan el marcador citogenético X-frágil, lo integran síndromes de muy diversa naturaleza en los que el retraso mental se puede asociar a un defecto bioquímico (Lesh y Nyhan, 1965), alteraciones neurológicas (Partington y cols. 1988), displasia ósea (Christian y cols. 1977) y a cuadros malformativos de muy diversa naturaleza (Juberg y Marsidi, 1980; Prieto y cols. 1987; Renpenning y cols. 1962). Incluso parece haber un tipo de retraso mental similar, sino clínicamente idéntico, al asociado con X-frágil en el cual no se observa este marcador citogenético (Proops y cols. 1983; Arveiler y cols. 1988b).

Aproximadamente se han descrito 70 trastornos ligados al cromosoma X asociados con retraso mental (McKusick, 1988). Excluyendo aquellos síndromes en los cuales el retraso

mental es debido a un error del metabolismo (síndrome de Lesch-Nyham), un gen dominante letal en el hemizogoto (síndrome de Aicardi) y otros debidos a causas diversas; quedan 19 fenotipos en los cuales el retraso mental parece ser el elemento primario. Recientemente han sido descritas otras 18 entidades (Neri y cols., 1991) publicadas con posterioridad a la octava edición del catálogo de McKusick.

Estas 37 formas de retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX) cuya patogenia es desconocida, pueden ser subdivididas en formas dismórficas y no-dismórficas, según que presenten dismorfias menores y malformaciones o falta de estas.

Cuatro familias estudiadas por nosotros fallan a mostrar el X-frágil a pesar de que en tres de ellas los varones afectados tienen un fenotipo que podría catalogarse como síndrome de Martin Bell.

La cuarta familia tenía ocho varones afectados en dos generaciones, con un cuadro sindrómico dismórfico y retraso mental asociado al cromosoma X (Prieto y cols. 1987). En la figura 6 se muestra el árbol familiar que abarca tres generaciones. Además de los ocho varones afectados, hay siete varones sanos, tres hembras portadoras obligadas y cinco hembras susceptibles del diagnóstico de estado de portador.

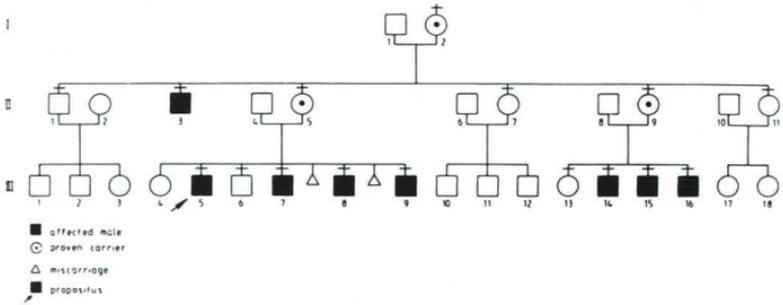


Fig. 6.- Pedigrí de la familia con síndrome dismórfico y retraso mental ligado al cromosoma X.

Los varones afectados presentan (Tabla 5) un síndrome caracterizado por retraso mental, dismorfia facial, pabellones auriculares malformados y de implantación baja, crecimiento dental anormal, fosita cutánea en la zona inferior de la espalda, clinodactilia, luxación patelar, extremidades inferiores malformadas, fondo de ojo anormal y atrofia cerebral subcortical.

El análisis citogenético, realizado con tinción convencional y la identificación de los cromosomas con un método de bandas G (Seabright, 1971), en algunos de estos pacientes (III-5, III-7, III-8, III-14 y III-15) mostró un cariotipo diploide normal sin visualización del punto X-frágil en la banda Xq27.3. Los análisis cromosómicos en metafases obtenidas de linfocitos cultivados en medio 199 deficitario en ácido fólico no mostraron tampoco el marcador X-frágil, aún siendo este un método que facilita la expresividad de los sitios frágiles.

La heterogeneidad que presentan los diversos síndromes de retraso mental ligado al cromosoma X (RMLX) sean entidades bien caracterizadas o casos familiares no específicos, tales como la familia descrita, puede ser mejor conocida mediante el mapeado genético con marcadores polimórficos de ADN en una región determinada del cromosoma X, al mismo tiempo que estos marcadores sirvan para realizar el diagnóstico de portadoras y el diagnóstico prenatal. Por otro lado, la aplicación de la estrategia de la genética inversa (Orkin, 1986) puede llevar a conocer el tipo de mutación y a la clonación del gen causante, tomando como punto de partida la región reconocida por el marcador genéticamente más cercano.

3.1.1.- Metodología

Análisis del ADN.- Las muestras se procesaron según la metodología descrita por Gal y cols. (1985). El ADN genómico total se obtuvo en 16 miembros de la familia a partir de leucocitos de sangre periférica con EDTA como anticoagulante. Muestras de 10 microgramos de ADN se sometieron a digestión con diferentes enzimas de acuerdo con las instrucciones del suministrador. Los fragmentos obtenidos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa a 35 voltios durante toda la noche. Posteriormente el ADN se transfirió a filtros de nitrocelulosa, según el procedimiento descrito por Southern (Southern, 1975). Los filtros se prehibridaron durante toda la noche a 66° en buffer de Tris-ClH 50mM a pH7.5, conteniendo 100 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón, SSC5x, SDS 0,1%, EDTA 1mM, 0,2% (p/v) cada uno de seroalbumina bovina (SAB), Ficoll y polivinilpirrolidona (PVP). El ADN unido a los filtros de nitrocelulosa se hibridó con sondas marcadas con ³²P (15ng/ml) durante 48h a 66° C en la misma solución. Después de la hibridación los filtros se lavaron dos veces en SSC5x a temperatura ambiente, seguido de un lavado en SSC2x, SDS 0,1%, pirofosfato sódico 0,1% y 0,02% de SAB, Ficoll y PVP a 66° C durante 20 minutos con agitación suave de los filtros. Un segundo lavado se realizó durante otros 20 minutos a 63° C con la misma solución conteniendo SSC1x. Los fragmentos hibridados con la sonda marcada con ³²P

se detectaron por autorradiografía empleando película RX-Fuji, en presencia de placas intensificadoras después de 7 días de exposición a -70° C.

La relación de sondas utilizadas en este estudio están expuestas en la Tabla 6. El marcado de las sondas con 32 P era realizado por "nick translation" empleando un kit comercial (Amersham) con una actividad específica de sobre $1-2 \times 10^6$ cpm/microgramo.

Tabla 6.- Cartografiado físico de los loci marcadores de ADN utilizados en la localización del síndrome dismórfico con RMLX.

<u>Locus</u>	<u>(Sonda)</u>	<u>Localización</u>
MIC2	(p19B)	Xpter
DXS278	(CRI-S232)	Xp22.3
DXS9	(RC8)	Xp22.3-p22.2
DXS16	(pSE3,2-L)	Xp22.3-p22.2
DXS43	(pD2)	Xp22.2
DXS28	(C7)	Xp21.3
DXS92	(pXG-16)	Xpter-p11.21
DXS269	(p20)	Xp21.3-p21.2
DXS84	(L754)	Xp21.1
DXS148	(cX5.7)	Xp21.1
OTC	(pH0731)	Xp21.1
DXS255	(M27 β)	Xp11.22
DXS106	(cpX203)	Xq12.1-q13.1
DXS95	(pXG-7)	Xq21
DXS94	(pXG-12)	Xq22
DXS102	(cX38.1)	Xq26.2-q27.1
DXS305	(St35-691)	Xq28
DXS115	(767)	Xq28

3.1.2.- Análisis formal de los estudios de ligamiento

El análisis de los estudios de ligamiento se realizó mediante la determinación de los "lod scores" (Morton, 1955) para el locus de la enfermedad y cada uno de los marcadores en un rango de valores de recombinación genética. Los "lods" son logaritmos de base 10 de la probabilidad de que el locus de la enfermedad y los loci de los marcadores estén ligados con una determinada fracción de recombinación en contraposición a no estar ligados. Los cálculos del análisis de ligamiento bipuntual (locus vs locus) y multiloci (multipuntual) se realizaron utilizando el programa informático FAP (Neugebauer y cols. 1984). Este programa se basa en el siguiente principio: Calcula la probabilidad global de los datos en dos posibles alternativas, que los dos loci estén ligados con la fracción de recombinación dada y que no estén ligados. El cociente de estas dos posibilidades constituye la probabilidad de que los loci estén de hecho ligados. El logaritmo base 10 de este cociente es el "lod score". El límite mínimo generalmente exigido para considerar que dos loci estén ligados es de 3 (una probabilidad 1000:1 a favor del ligamiento) que coincide con una probabilidad global del 95%. Una salvedad es el caso de las enfermedades ligadas al cromosoma X y ello es debido al hecho de que sabemos de antemano que el locus de estas enfermedades está localizado en este cromosoma, por lo que un "lod score" menor de 3 puede

tener indicación de ligamiento.

El análisis de ligamiento de multiloci permite establecer qué orden físico entre varios marcadores analizados y el locus de la enfermedad es el más probable y definir, por tanto, cual es el marcador que se encuentra más cercano al locus en cuestión.

3.1.3.- El locus de este síndrome con RMLX está localizado en -
el brazo corto del cromosoma X (Xp11.22-Xp21.1)
(Watty, Prieto y cols., Am J Med Genet, 1991) (*)

Las sondas utilizadas para determinar la localización del locus (Tabla 6) reconocen genes o regiones distribuidas a lo largo de todo el cromosoma X, tal como se indica en la columna localización.

Los resultados de los análisis de ligamiento de doble-punto (marcador vs, locus sindrómico RMLX) están resumidos en la Tabla 7. Los resultados del tipaje FRLP de cada familiar para los marcadores con "lod scores" positivos a una fracción de recombinación $\theta = 0,01$ están listados en la Tabla 8. No se detectó ninguna recombinación entre el locus de la enfermedad y dos loci mapeados en Xp21.1, el gen OTC (ornitina transcarbamilasa) y la región DXS148, con un "lod score" máximo de 1,15 para cada uno. Debido al número limitado de meiosis informativas, estos resultados no son suficientes para asignar el locus de la enfermedad con total certeza en Xp. Pero, también se obtuvieron valores bastante altos de "lod score" sugestivos de ligamiento con los loci marcadores DXS84 y DXS225. Estos flanquean el gen OTC y el locus DXS148, siendo DXS84 distal a ambos. Tanto DXS84 como DXS225 mostraban una frecuencia de recombinación de aproximadamente un 10% con el locus de la enfermedad, un valor compatible con lo esperado,

Tabla 7.- "Lod scores" (z) para varias fracciones de recombinación (c) para el ligamiento entre el locus RMLX y los loci de marcadores del cromosoma X.

Locus	Fracciones de recombinación							=max	10max
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40		
MIC2	-∞	-3,46	-1,92	-1,25	-0,62	-0,32	-0,19	0,00	0,50
DXS278	-∞	-4,48	-1,84	-0,84	-0,08	0,14	0,13	0,15	0,36
DXS9	-∞	1,51	1,20	2,02	1,72	1,24	0,66	2,04	0,08
DXS16	-∞	1,51	1,20	2,02	1,72	1,24	0,66	2,04	0,08
DXS43	-∞	1,51	1,20	2,02	1,72	1,24	0,66	2,04	0,08
DXS92	-∞	0,64	1,25	1,41	1,34	1,05	0,61	1,42	0,14
DXS28	-∞	0,64	1,25	1,41	1,34	1,05	0,61	1,42	0,14
DXS269	-∞	0,64	1,25	1,41	1,34	1,05	0,61	1,42	0,14
DXS84	-∞	0,62	1,16	1,25	1,11	0,80	0,42	1,25	0,10
DXS148	1,15	1,13	1,04	0,93	0,68	0,41	0,14	1,15	0,00
OTC	1,15	1,13	1,04	0,93	0,68	0,41	0,14	1,15	0,00
DXS255	-∞	1,26	1,77	1,81	1,57	1,16	0,63	1,82	0,09
DXS106	-∞	-0,86	-0,23	-0,02	0,09	0,07	0,02	0,09	0,22
DXS95	-∞	-0,86	-0,23	-0,02	0,09	0,07	0,02	0,09	0,22
DXS94	-∞	-3,32	-1,33	-0,56	0,03	0,21	0,18	0,22	0,32
DXS102	-∞	-1,62	-0,33	0,13	0,43	0,43	0,28	0,45	0,24
DXS305	-∞	-2,48	-0,56	0,11	0,52	0,50	0,31	0,52	0,20
DXS115	-∞	-3,91	-1,89	-1,08	-0,38	-0,08	0,03	0,03	0,40

Tabla B.- Resultados del tipaje de FRLP de los miembros familiares - para diez loci marcadores importantes para la localización del locus RMLX. Los símbolos de los alelos se muestran - según Kidd y cols. (1988).

Individuos:									
Locus	I.2	II.1	II.3	II.5	II.7	II.9	II.11		
DXS9	1 2	2	2	1 2	1 1	1 2	1 1		
DXS16	1 2	2	2	1 2	1 1	1 2	1 1		
DXS43	1 2	2	2	1 2	1 1	1 2	1 1		
DXS92	1 2	1	1	1 2	1 2	1 2	2 2		
DXS28	1 2	1	1	1 2	1 2	1 2	2 2		
DXS269	1 2	2	2	1 2	1 2	1 2	1 1		
DXS84	1 2	2	1	1 2	1 2	1 1	1 1		
DXS148	1 2	2	1	1 1	1 2	1 1	1 1		
OTC	1 2	2	1	1 1	1 2	1 1	1 1		
DXS255	2 4	2	2	2 3	- -	2 3	2 3		

Individuos:									
Locus	III.5	III.6	III.7	III.8	III.9	III.13	III.14	III.15	III.16
DXS9	2	1	2	2	2	1 1	2	2	2
DXS16	2	1	2	2	2	1 2	2	2	2
DXS43	2	1	2	2	2	1 2	2	2	2
DXS92	1	2	1	1	1	1 2	1	1	1
DXS28	1	2	1	1	1	1 2	1	1	1
DXS269	2	1	2	2	2	1 2	2	2	2
DXS84	2	1	2	2	2	1 1	-	1	1
DXS148	1	1	1	-	1	1 1	-	1	1
OTC	1	1	1	-	1	1 1	-	1	1
DXS255	2	3	2	2	2	1 2	2	2	2

- : no determinado.

basado en la distancia física que separa estos marcadores. Por otra parte, también se observó ligamiento entre el locus de la enfermedad y seis loci de las partes media y distal de Xp (DXS92, DXS269, DXS28, DXS43, DXS16 y DXS9). Además, se excluyó el ligamiento de los loci de la región Xpter (DXS278 y el locus pseudoautosómico MIC2) y del brazo largo Xq (Tabla 7 y datos que no se muestran).

De acuerdo con los datos del ligamiento, el análisis de múltiples meiosis informativas también sugiere que el locus de la enfermedad es localizado en el brazo corto Xp entre DXS255 y DXS84 . Además de esto, se realizó un análisis multipuntual con el programa FAP. Se construyó un mapa genético simplificado para la región delimitada por los loci DXS255 y DXS9 mediante la determinación del orden y las fracciones de recombinación entre los diferentes loci marcadores. A partir de ahí, se determinó cada una de las posibles localizaciones del locus de este síndrome con RMLX dentro de este mapa. De nuevo, la mayor probabilidad era para el orden que situaba el locus de la enfermedad entre DXS255 y DXS84. Respecto a este orden, el resto de posibles ordenes mostraban una probabilidad mucho menor (Tabla 9). En conclusión, todos los resultados sugieren una localización del locus de este síndrome con RMLX en Xp21.1-Xp11.3 (Fig. 7).

La valoración de ornitina carbamil transferasa (OTC) en los pacientes III-7, III-9 y en su madre II-4, mediante el estudio en orina de la relación orotato-creatinina, permite excluir la existencia de déficit de ornitina transcarbamilasa, ya que son comparables al resultado del control y no aumentan substancialmente tras la ingesta proteica, lo que sugiere una no afectación del gen de la OTC a pesar de su proximidad con el gen mutante responsable de este síndrome con RMLX.

Tabla 9.- Analisis multipuntual para varias posiciones del locus RMLX y cinco loci marcadores.

Orden	Cociente de probabilidad ^a
DXS255 - XLMR/OTC - DXS84 - DXS28 - DXS9 ^b	1,00
XLMR - DXS255 - OTC - DXS84 - DXS28 - DXS9	$1,9 \times 10^{-2}$
DXS255 - OTC - DXS84 - DXS28 - DXS9 - XLMR	$2,1 \times 10^{-2}$
DXS255 - OTC - DXS84 - DXS28 - XLMR - DXS9	$3,5 \times 10^{-3}$
DXS255 - OTC - DXS84 - XLMR - DXS28 - DXS9	$6,8 \times 10^{-3}$

a = Para cada orden, el cociente de probabilidad máximo se presenta en relación con el orden con la mayor probabilidad máxima.

b = Las fracciones de recombinación entre los loci marcadores utilizados para el análisis fueron 0,15, 0,06, 0,20 y 0,12 respectivamente.

3.1.4.- ¿Que utilidad práctica tienen estos estudios?

La localización genética del locus de la enfermedad y el ligamiento a varios loci marcadores permite determinar el estado de portador de las hermanas de los individuos afectados haciendo posible así el consejo genético y el diagnóstico prenatal en este síndrome. El problema real reside en el hecho de que el ligamiento obtenido no es altamente significativo para ninguno de los marcadores ("lod score" = 1,15 para $\theta = 0,00$ en el caso de DTC y DXS148), y no podemos conocer exactamente si el riesgo de recombinación es elevado o no. La solución definitiva pasa por detectar la mutación (¿tal vez una microdelección?) que ha originado el síndrome y con ello conocer con total certeza el estado de portador o no de estas mujeres.

3.1.5.- ¿Cual es el futuro que se vislumbra con la aplicación de la genética molecular al estudio de los retrasos mentales ligados al cromosoma X?

El hallazgo de la mutación causante de la enfermedad y de marcadores polimórficos de ADN estrechamente ligados permitirá un diagnóstico de portadoras heterocigotas y un consejo genético fundamentado en datos concretos y personales.

Por otro lado, la localización de los distintos loci que condicionan estas enfermedades a lo largo del cromosoma X y la detección de la mutación causante, servirán para diferenciar o relacionar distintos síndromes con retraso mental ligado al cromosoma X, con o sin rasgos dismórficos, que en la actualidad sólo pueden definirse por su descripción clínica fenotípica (Fig. 7). Es así seguro que algunos de ellos pueden deberse a diferentes mutaciones de un mismo gen. Esto es, su definición definitiva y todo a lo que posteriormente ella conduce, sería determinada por los estudios de genética molecular. Esto es especialmente importante para aquellos síndromes raros, con pocos miembros en la familia, a los que no es posible aplicar la estrategia de ligamiento genético descrita, por lo que la única posibilidad es valorar en ellos la presencia o ausencia de las mutaciones que se vayan describiendo en otros síndromes ya mapeados sobre el cromosoma X.

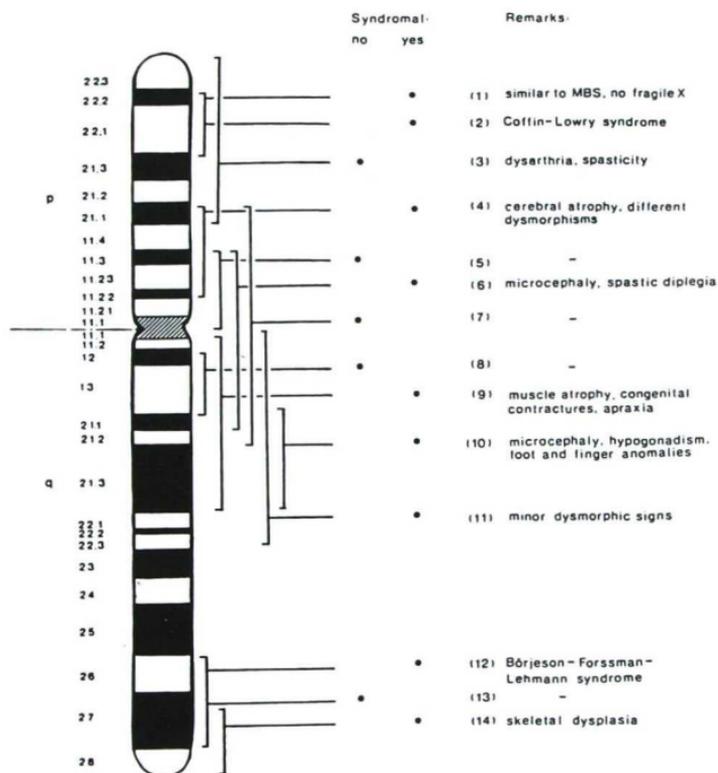


Fig. 7.- Localización de loci de genes RMLX diferentes al locus X-frágil, en la familia objeto de estudio (4) y en otros síndromes (Watty y cols. 1991).

- (*) Estos resultados han sido presentados, parcialmente, en:
- 10º Seminario Internacional sobre Mapeado Genético Humano (HGM10) en la Conferencia de New Haven, 1989. Gal y cols., Cytogenet Cell Genet 1989, 51: 1001.
 - Reunión Anual de la American Society of Human Genetics - celebrada en Baltimore, 1989 (Watty, Prieto y cols., Am J Hum Genet 1989, 45: A167).

4.- BIBLIOGRAFIA

- Arveiler B, Oberlé I, Vincent A, Hofker MH, Pearson PL, Mandel JL (1988a). Genetic mapping of the Xq27-q28 region: new RFLP markers useful for diagnostic applications in fragile-X and hemophilia-B families. Am J Hum Genet 42: 380-389.
- Arveiler B, Alembik Y, Hanauer A, Jacobs P, Tranebjaerg L, Mikkelsen M, Puissant H, Larget-Piet L, Mandel JL (1988b). Linkage analysis suggest at least two loci for X-linked non-specific mental retardation. Am J Med Genet 30: 473-483.
- Beneyto M, Prieto F, Badia L, Palau F, Benac A, Domene J (1989). Diagnóstico prenatal en portadores de translocación recíproca. II Congreso de Diagnóstico Prenatal. Tenerife. Junio.
- Boggs BA, Nussbaum RL (1984). Two anonymous X-specific human sequences detecting restriction fragment length polymorphisms in region Xq26->qter. Somat Cell Mol Genet 10: 607-613.
- Brown WT, Jenkins EC, Gross AC, Chan CB, Krawczak MS, Duncan CJ, Sklower SL, Fish GS (1987). Further evidence for genetic heterogeneity in the fragile X syndrome. Hum Genet 75: 311-321.

-Brown WT, Gross AC, Chan CB, Jenkins EC, Mandel JL, Oberlé I, Arveiler B, Novelli G, Thibodeau S, Hagerman R, Summers K, Turner G, White BN, Mulligan L, Forster-Gibson C, Holden JJA, Zoll B, Krawczak M, Goonewardena P, Gustavson KH, Petterson U, Holmgren G, Schwartz C, Howards-Peebles PN, Murphy P, Breg WR, Veenema H, Carpenters NJ (1988). Multilocus analysis of the fragile X syndrome. *Hum Genet* 78: 201-205.

-Christian JC, de Meyer W, Franken EA, Huff JS, Khairi S, Reed T (1977). X-linked skeletal dysplasia with mental retardation. *Clin Genet* 11: 128-136.

-Drayna D, Davies K, Hartley D, Mandel JL, Camerino G, Williamson R, White R (1984). Genetic mapping of the human X chromosome by using restriction fragment length polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 81: 2836-2839.

-Gal A, Mücke J, Theile H, Wieacker PE, Ropers HH, Wienker TF (1985). X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease: Suggestion of linkage with a cloned DNA sequence from the proximal Xq. *Hum Genet* 70: 38-42.

-Gal A, Watty A, Prieto F, Beneyto M, Neugebauer M (1989). Linkage analysis in a family with X-linked dysmorphic mental retardation. *Cytogenet Cell Genet* 51: 1001 (supl.).

-Harper K, Pembrey ME, Davies KE, Winter RM, Hartley O, Tuddenham EGB (1984). A clinically useful DNA probe closely linked to haemophilia A. *Lancet* II: 6-8.

-Hofker MH, Bergen AAB, Skraastad MI, Carpenter NJ, Veenema H, Connor JM, Bakker E, Van Ommen GJB, Pearson PL (1987). Efficient isolation of X chromosome-specific single-copy probes from a cosmid library of a human X/hamster hybrid-cell line: mapping of new probes close to the locus for X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 40: 312-328.

-Juberg RC, Marsidi I (1980). A new form of X-linked mental retardation with growth retardation, deafness and microgenitalism. *Am J Hum Genet* 32: 714-722.

-Karter H, Warkany J (1983). Congenital malformations. Etiologic factors and their role in prevention. *N Engl J Med* 308: 424-431.

-Lesh M, Nyham WL (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med* 36: 561-570.

-Lubs HA (1969). A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 21: 231-244.

- Martin JP, Bell J (1943). A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 6: 154-157.
- McKusick VA (1988). "Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive and X-Linked Phenotypes". Baltimore, London: The John Hopkins University Press, 8th Edition.
- Morton NE (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7: 277-318.
- Neri G, Gurrieri F, Gal A, Lubs HA (1991). XLMR genes: Update 1989, *Am J Med Genet* 38: 186-189.
- Neugebauer M, Willems J, Baur MP (1984). Analysis of multilocus pedigree data by computer. In Albert ED, Baur MP, Mayr WR (eds): "Histocompatibility Testing 1984." Berlin, Heidelberg, New York: Springer, pp 52-58.
- Niebuhr E (1972). Localization of the deleted segment in the cri-du-chat syndrome. *Humangenetik* 16: 357-358.
- Oberlé I, Drayna D, Camerino G, White R, Mandel JL (1985). The telomeric region of the human X chromosome long arm: presence of a highly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency. *Proc Natl Acad Sci* 82: 2824-2828.

-Orkin SH (1986). Reverse genetic and human diseases. Cell 47: 845-850.

-Partington MW, Mulley JC, Sutherland GR, Hockey A, Thode A, Turner G (1988). X-linked mental retardation with dystonic movements of the hands. Am J Med Genet 30: 251-262.

-Prieto F (1974). Identificación de las aberraciones cromosómicas por listado de bandas con el método de tripsina Giemsa. Tesis doctoral. Valencia.

-Prieto F, Badia L, Orellana F, Herranz J, Sanz M, Monfort A, Sainz C (1975). Síndromes 4p- y 5p-. Su identificación por el estudio cromosómico. Rev Esp Pediat 31: 581-590.

-Prieto F, Badia L, Abeledo G, Amigo V, Marty ML (1976). Niveles de deleción cromosómica en el síndrome de maullido de gato. An Esp Pediat 9: 3-6.

-Prieto F, Badia L, Asensi F, Roques V (1980a). Two reciprocal translocations $t(9p+;13q-)$ and $t(13q-;21q+)$. A study of the families. Hum Genet 54: 7-11.

-Prieto F (1980b). Estudio familiar en 38 niños malformados con trisomía o monosomía parcial autosómica. VIII Congreso Nacional de Genética Humana. Pamplona. Octubre.

-Prieto F, Badia L, Ribes C, Medina V (1981a). Trisomie 21 par translocation 21/21 chez deux fils d'une mere avec un microchromosome surnumeraire. Ann Genet 24: 117-119.

-Prieto F, Badia L, Asensi F, Moya A, Figuera MJ (1981b). Pericentric inversions of chromosome 12 in two families. Hum Genet 57: 131-133.

-Prieto F, Badia L (1983). Adjacent 2 translocation involving 13q and 21q. J Med Genet 20: 155.

-Prieto F, Badia L, Cortina H, Perez-Aytes A, Cambra J (1986). Cromosompatias y malformaciones congénitas. Ponencia. XIV Congreso Nacional de Genética Humana. Bilbao. Noviembre.

-Prieto F, Badia L, Mulas F, Monfort A, Mora F (1987). X-linked dysmorphic syndrome with mental retardation. Clin Genet 32: 326-334.

-Prieto F, Badia L, Beneyto M, Palau F, Benac A, Cabo A, Domenech J, Perez Campos E (1989). Inversión pericéntrica familiar del cromosoma 20. Importancia del diagnóstico prenatal en estas familias. Progr Diagn Pren 1: 35-38.

-Proops R, Mayer M, Jacobs PA (1983). A study of mental retardation in children in the Island of Hawaii. Clin Genet 28: 81-96.

-Rekilä AM, Väisänen ML, Kähkönen M, Leisti J, Winqvist R (1988). A new RFLP with Stu I and probe cX55.7(DXS105) and its usefulness in carrier analysis of fragile X syndrome. Hum Genet 80: 193.

-Renpenning HJ, Gerrard JW, Zeleski WA, Tabata T (1962). Familial sex-linked mental retardation. Canad Med Assoc J 87: 954-956.

-Seabright M (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet II: 971-972.

-Schnur RE, Ledbetter SA, Ledbetter DH, Merry DE, Nussbaum RL (1989). New polymorphisms at the DXS98 locus and confirmation of its location proximal to FRAXA by in situ hybridization. Am J Hum Genet 44: 248-254.

-Southern EMC (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-517.

-Sutherland GR, Mulley JC (1990). Diagnostic molecular genetics of the fragile X. Clin Genet 37: 2-11.

-Tonnesen T, Sondergaard F, Güttler F, Oberlé I, Moisan JP, Mandel JL, Hauge M, Damsgard EM (1984). Exclusion of haemophilia B in males fetus by chronic villus biopsy. Lancet II, 932.

-Watty A, Prieto F, Beneyto M, Neugebauer M, Gal A (1989). Linkage analysis in a family with X-linked dysmorphic mental retardation. Am J Hum Genet 45: A167 (supl.).

-Watty A, Prieto F, Beneyto M, Neugebauer M, Gal A (1991). Gene localization in a family with X-linked syndromal mental retardation (Prieto syndrome). Am J Med Genet 38: 234-239.

-Winship PR, Anson DS, Rizza CR, Brownlee (1984). Carrier detection in haemophilia B using two further intragenic restriction fragment length polymorphisms. Nucl ACid Res 12: 8861-8865.

Los Estados Miembros deben tomar medidas apropiadas para la prevención de deficiencias y discapacidades y para asegurar la divulgación de los conocimientos y la tecnología pertinentes.

Naciones Unidas: Programa de acción mundial para las personas con discapacidad (Párrafo 95).



REAL PATRONATO DE PREVENCIÓN
Y DE ATENCIÓN A PERSONAS CON MINUSVALÍA

Madrid - Tel. 8866 490410 - Fax 848 73 87

