

Desarrollo de PCR para el gen FMR1 y aplicación en mujeres con reserva ovárica reducida

Peralta, Sofía¹; Furfuro, Sandra Beatriz²; Pelletan, Leonardo³; Cejas, Jimena Beatriz²

¹ Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas.

² Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas, Laboratorio de Análisis de ADN.

³ Instituto de Medicina Reproductiva de Mendoza, Laboratorio.

Correo electrónico de contacto: jimecejas@hotmail.com

Recibido: 14 de agosto de 2026 — Aceptado: 30 de agosto de 2026

Introducción

El gen FMR1 se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq27.3). La particularidad de este gen radica en que en su región 5' no traducida (5' UTR) presenta una secuencia de repeticiones del triplete citosina-guanina-guanina (CGG), la cual puede alterarse y expandirse^[1]. Según el número de estas repeticiones de CGG, los alelos pueden clasificarse en:

- Alelos normales: 5 - 44 repeticiones CGG.
- Alelos intermedios: 45 - 54 repeticiones CGG ("zona gris")
- Alelos premutados (PM): 55 - 200 repeticiones CGG
- Alelos mutados o mutación completa (MC): ≥ 200 repeticiones CGG^[2,3].

La manifestación clínica de pacientes con MC es el Síndrome del cromosoma X frágil (FXS), mientras que Síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil (FXTAS) e Insuficiencia Ovárica Primaria Asociada al Cromosoma X Frágil (FXPOI) se evidencia en PM. El número de expansiones aumenta durante la transmisión genética entre generaciones^[1].

La complejidad del análisis de este tipo de secuencias radica en que, la expansión de regiones ricas en CG, lleva a la formación de estructuras secundarias del ADN tales como horquillas (hairpins) y estructuras G-quadruplex. que

dificultan la correcta amplificación de dicho gen en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^[4]. Por esto, los laboratorios de Biología Molecular recurren a la técnica TP-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de repetición de tripletes), la cual utiliza un primer de repetición encargado de generar segmentos de la secuencia repetida^[5].

El costo de los kits comerciales para la TP-PCR es marcadamente más elevado que las pruebas convencionales, es por esto que, para el diagnóstico de los cambios en el gen *FMR1*, se busca realizar una prueba preliminar que permita evaluar si se trata de un paciente normal, PM o MC^[5].

Se define a la reserva ovárica reducida (ROR) a la situación clínica en la cual el ovario pierde su potencial reproductivo pero se continúa con menstruaciones regulares observándose alteraciones en las pruebas de función ovárica, presentando una disminución en la cantidad y/o calidad de ovocitos^[6].

Se diferencia de la insuficiencia ovárica prematura (IOP) porque esta corresponde al cese anticipado de la función ovárica (endócrina y reproductiva) antes de los 40 años, manifestándose por amenorrea secundaria, hipoestrogenismo e hipogonadismo hipergonadotrófico^[7]. Alteraciones en la reserva ovárica pueden diagnosticarse mediante el dosaje de la hormona antimülleriana (HAM) y el recuento de folículos antrales (AFC)^[6].

La etiología de IOP Y ROR puede deberse a causas autoinmunes, iatrogénicas, idiopáticas, y genéticas. La mayoría de las causas genéticas de la IOP se encuentran bien establecidas, siendo la premutación del gen *FMR1* una de las más conocidas^[6,8].

Conocer la prevalencia de las premutaciones de *FMR1* en mujeres con ROR es clave para establecer la causa de infertilidad y ofrecer asesoramiento preconcepcional y genético ante el riesgo de transmisión de FXS. Por esto, surge como problema de investigación la optimización e implementación de una PCR convencional que nos permita realizar el diagnóstico preliminar del gen *FMR1*, como alternativa a kits comerciales de mayor costo.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una técnica de PCR convencional para detectar cambios en el número de repeticiones en el gen *FMR1*.

Objetivos específicos

1. Comparar los resultados obtenidos mediante la PCR desarrollada con los de la técnica comercial Amplidex, evaluando concordancia y eficacia diagnóstica.
2. Aplicar la PCR desarrollada para determinar la prevalencia de alelos premutados en mujeres con diagnóstico de ROR en la región de Cuyo.
3. Analizar la distribución de alelos premutados según el número de repeticiones CGG, correlacionando los hallazgos con parámetros clínicos y de reserva ovárica (HAM, FSH, LH y Estradiol).

Metodología

Para objetivo 1 se realizaron un total de 15 pruebas utilizando el kit enzimático Expand Long (Roche®), en las cuales se ajustaron: concentración de ADN, dNTP, y Taq polimerasa.

Para la validación de esta técnica se estudiaron

12 pacientes previo consentimiento informado y anteriormente analizados mediante TP-PCR utilizando el kit Amplidex.

Para objetivo 2 y 3 se estudiaron a 25 pacientes menores de 40 años, con diagnóstico de ROR, provenientes de clínicas reproductivas de Mendoza, previo consentimiento informado.

Las muestras fueron obtenidas mediante venopunción (6mL de sangre con EDTA) y posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante salting out.

Para la PCR-convencional se utilizaron primers Forward (5'-TCAGGCGCTCAGCTCCGTTTCGG TTTCA-3') y Reverse (5'-AAGCGCCATTGGA GCCCGCACTTCC-3')^[9] 10 µM, específicos para la región 5' UTR del gen *FMR1*, dNTP 25µM, betaína 5 µM^[10], enzima y buffer (2) kit Expand Long (Roche®), ciclado según especificación del fabricante. La TP-PCR se realizó según especificación del fabricante, kit Amplidex® *FMR1* PCR (AsuraGen®).

Los amplificados fueron separados por electroforesis capilar utilizando el secuenciador SeqStudio, analizados con el software GeneMapper (v.6.1).

Análisis estadístico: paired t-test, post-hoc de Wilcoxon, software GraphPad-Prism.

Resultados

Para el objetivo 1, de los 12 pacientes analizados: 3 fueron heterocigotas normales, 3 homocigotas normales, 3 premutados, y 3 mutados (tabla 1).

Comparando ambas técnicas, el 58,3% de las muestras presentó los mismos resultados; el 41,7% presentó una diferencia de una repetición. No se obtuvieron diferencias significativas entre ambas técnicas. (Figura 1)

Para los objetivos 2 y 3, las pacientes estudiadas presentaron edad media de 34 años, HAM promedio de 0,5284 ng/mL (<0,96 ng/mL), confirmando diagnóstico de ROR; el 44% un aumento de FSH, el 16% un aumento de LH y el 4% una disminución de estradiol. De las 25

pacientes estudiadas mediante PCR convencional, 16 fueron heterocigotas normales; 14/16 presentaron alelos normales y 2/16 en el rango intermedio (45-55 repeticiones CGG) (Figura 2), y 11 fueron homocigotas confirmadas mediante TP-PCR.

Discusión y conclusión

La metodología utilizada para la PCR convencional permite obtener un diagnóstico preliminar con una exactitud similar a la TP-PCR, permitiendo validar la técnica en el diagnóstico molecular para cambios en el gen FMR1. En esta serie inicial de

tamizaje no se hallaron pre-mutaciones del gen FMR1 en la población estudiada con diagnóstico de ROR; sin embargo, el screening de alteraciones en este gen sigue siendo un paso fundamental en el diagnóstico etiológico y asesoramiento genético preconcepcional, considerando que las expansiones CGG del mismo tienen tanto un impacto en la salud reproductiva como en la salud de la descendencia.

Palabras clave: Repeticiones CGG - Premutación FMR1 - Insuficiencia ovárica prematura - Infertilidad.

	TP-PCR	PCR Convencional
Heterocigotas normales		
Paciente 1	28-30	29-30
Paciente 2	30-37	30-37
Paciente 3	27-30	28-30
Homocigotas normales		
Paciente 4	29	29
Paciente 5	30	30
Paciente 6	29	29
Premutados		
Paciente 7	20-87	20-90
Paciente 8	30-72	30-72
Paciente 9	28-57	29-58
Mutados		
Paciente 10	≥ 200	Sin pico
Paciente 11	30 - ≥ 200	30
Paciente 12	28 - ≥ 200	29- sin pico

Tabla 1. Se muestran los alelos obtenidos mediante cada técnica en los diferentes grupos de pacientes.

Figura 1

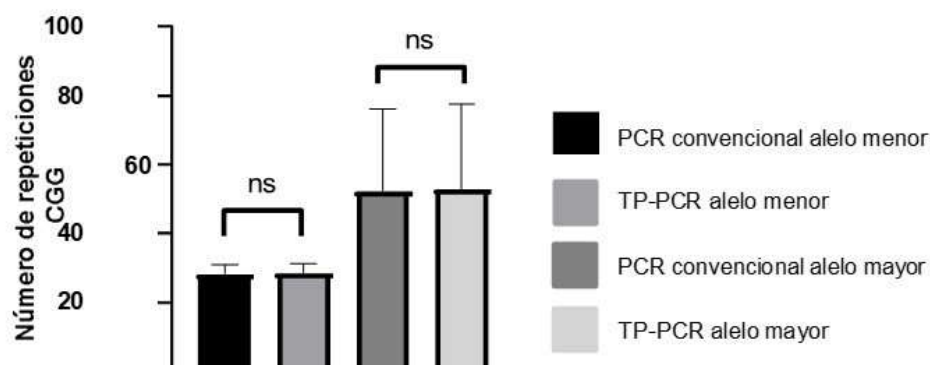


Figura 1. Comparación del número de repeticiones CGG del gen FMR1 obtenidas mediante PCR Convencional y TP-PCR. El gráfico muestra que las diferencias obtenidas de una repetición CGG no es estadísticamente significativa (Paired t-test seguido de Wilcoxon test. P value alelo menor=0,0625, P value alelo mayor=0,5).

Figura 2

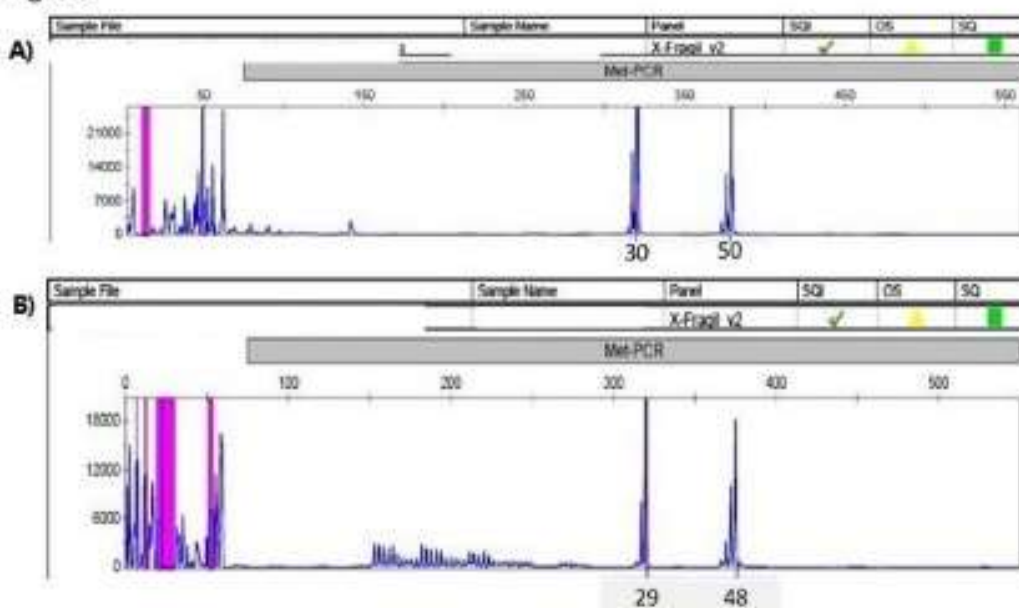


Figura 2. Electroferogramas correspondientes a dos pacientes estudiadas en este proyecto de investigación. A) Corresponde a una muestra analizada mediante PCR convencional y B) Corresponde a una muestra analizada mediante el TP-PCR. Ambos pueden diferenciarse porque en B se observan picos en escalera que corresponden al tercer primer utilizado en este tipo de reacciones. Los alelos obtenidos corresponden al rango intermedio (45-55 repeticiones CGG), las cuales pueden expandirse a premutación o mutación completa a la descendencia.

Referencias bibliográficas

1. Tassone F, Protic D, Allen EG, et al. Insight and Recommendations for Fragile X-Premutation-Associated Conditions from the Fifth International Conference on FMR1 Premutation. *Cells* 2023;12. <https://doi.org/10.3390/cells12182330>.
2. Ezzell Hunter J, Berry-Kravis E, Hipp H, et al. FMR1 Disorders. 1998.
3. Nolin SL, Glicksman A, Tortora N, et al. Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation

- alleles. *Am J Med Genet A* 2019;179:1148–56. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61165>.
4. Tabolacci E, Nobile V, Pucci C, et al. Mechanisms of the FMR1 Repeat Instability: How Does the CGG Sequence Expand? *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23105425>.
 5. Ramos C, Ocampos M, Barbato IT, et al. Molecular analysis of FMR1 gene in a population in Southern Brazil: Comparison of four methods. *Pract Lab Med* 2020;21. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2020.e00162>.
 6. Greene AD, Patounakis G, Segars JH. Genetic associations with diminished ovarian reserve: A systematic review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:935–46. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0257-5>.
 7. Webber L, Davies M, Anderson R, et al. ESHRE Guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction* 2016;31:926–37. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew027>.
 8. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Horm Res* 2007;68:196–202. <https://doi.org/10.1159/000102537>.
 9. Cheng YKY, Lin CSW, Kwok YKY, et al. Identification of fragile X pre-mutation carriers in the Chinese obstetric population using a robust FMR1 polymerase chain reaction assay: Implications for screening and prenatal diagnosis. *Hong Kong Medical Journal* 2017;23:110–6. <https://doi.org/10.12809/hkmj164936>.
 10. Henke W, Herdel K, Jung K, et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1997;25.