

Desarrollo de una reacción de PCR convencional para diagnosticar cambios en el gen FMR1.

Peralta, Sofía¹; 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.

Correo electrónico de contacto: jimecejas@hotmail.com

Recibido: 8 setiembre de 2025 – Aceptado: 8 de octubre de 2025

Palabras claves: Síndrome X Frágil, FXPOI, Repeticiones CGG.

Keywords: Fragile X syndrome, Gen FMR1, CGG repeats.

Introducción: El síndrome del cromosoma X frágil (FXS), la insuficiencia ovárica primaria asociada al cromosoma X frágil (FXPOI) y el síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil (FXTAS) son trastornos vinculados a alteraciones en el gen FMR1. Este gen presenta una repetición CGG polimórfica en su región 5' no traducida; las mutaciones en esta región son responsables de los síndromes mencionados. (1) Los alelos FMR1 se clasifican según el número de repeticiones CGG: normales (5–44 repeticiones), intermedios (45–54, “zona gris”), premutados (55–200, asociados a FXTAS y FXPOI) y mutados (>200 repeticiones, causantes de FXS). (2)(3)

FXS constituye la causa más común de discapacidad intelectual hereditaria, con mayor incidencia en varones. (1) FXPOI se caracteriza por amenorrea prolongada antes de los 40 años y niveles elevados de FSH en mujeres portadoras de premutación. (4) FXTAS, por su parte, es un trastorno neurodegenerativo de aparición tardía que afecta a varones y, en menor frecuencia, a mujeres con premutación. (1)

El diagnóstico molecular se basa en la amplificación por PCR para identificar el número de repeticiones CGG. Muchos laboratorios desarrollan protocolos internos de PCR convencional que permiten detectar hasta alelos premutados. Sin embargo, si en varones no se observa producto amplificado, o si en mujeres homocigotas sólo se detecta un alelo, se recurre a técnicas comerciales capaces de identificar todo el rango de expansión. Dado que estos kits son costosos, se hace necesaria la implementación de una PCR convencional más accesible que abarque la mayor variedad posible de alelos FMR1. (5)

Objetivo: Diseñar una técnica de PCR convencional eficaz para detectar variaciones en el número de repeticiones CGG del gen FMR1.

Metodología: Este estudio se enmarca en un diseño experimental de desarrollo metodológico. Se analizaron 12 muestras previamente tipificadas con el kit comercial AmpliDeX® Asuragen, contando con

consentimiento informado por parte de los pacientes. De las muestras evaluadas, 6 eran homocigotas, 3 heterocigotas, 2 portadoras de premutación y 1 con mutación completa.

El ADN se extrajo mediante la técnica de Salting Out. Las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis capilar en secuenciador SeqStudio, y se procesaron con el software GeneMapper v6.1. Para la amplificación del gen FMR1, se probaron tres enzimas comerciales:

MyFi™ Mix (Meridian Bioscience), cuyo mix incluye polimerasa, $MgCl_2$ y dNTPs.

QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit, que contiene polimerasa, $MgCl_2$, dNTPs y Q Solution, un aditivo diseñado para regiones ricas en GC.

Expand Long Template PCR System (Roche), compuesto por una mezcla enzimática y tres buffers con concentraciones crecientes de $MgCl_2$.

Resultados

Enzima MyFi™: Se realizaron siete pruebas, seis orientadas a la amplificación del gen FMR1 y una al gen SRY como control, el cual se amplificó exitosamente. En los ensayos dirigidos a FMR1, se ajustaron las condiciones de PCR basándose en los parámetros del fabricante, modificando temperatura de annealing según el T_m de los primers. A bajas temperaturas, se observaron productos inespecíficos. También se modificaron el número de ciclos, la temperatura de elongación y la concentración de ADN templado. No se obtuvo amplificación específica del gen FMR1.

Enzima QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit: Se realizó una única prueba. No se observó amplificación del gen objetivo y se detectaron picos inespecíficos, no atribuibles a las muestras analizadas.

Enzima Expand Long Template PCR System (Roche): Dado que esta enzima está recomendada para regiones ricas en GC, se llevaron a cabo cinco ensayos, variando temperatura de annealing, número de ciclos, concentración de $MgCl_2$ y dNTPs. No se obtuvieron productos específicos de PCR.

Discusión: A pesar de los múltiples intentos de optimización, no se logró amplificar con éxito el gen FMR1 con ninguna de las enzimas utilizadas. Este resultado pone de manifiesto las dificultades técnicas asociadas a la amplificación de regiones con alto contenido GC, como es el caso de la región 5' no traducida del gen FMR1. La formación de estructuras secundarias estables en el ADN puede dificultar la acción de la polimerasa, haciendo necesario el uso de aditivos que reduzcan la estabilidad de estas estructuras o la implementación de ciclos térmicos con rampas lentas de temperatura.

En la literatura, se ha descrito que la amplificación del gen FMR1 es particularmente desafiante, siendo frecuentes los falsos negativos cuando se utilizan métodos convencionales. Algunos estudios proponen la incorporación de aditivos como DMSO o betaina, que mejora la detección de expansiones largas.

La elección de las enzimas utilizadas en este trabajo respondió a su disponibilidad y características técnicas, que en teoría permitían la amplificación de regiones ricas en GC. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados, lo que refuerza la necesidad de una optimización específica y más profunda para este tipo de secuencias.

La experiencia adquirida permite establecer un punto de partida metodológico, identificando condiciones que no resultan efectivas. Este aprendizaje es especialmente valioso en contextos donde el acceso a kits comerciales es limitado o económicamente inviable.

Conclusión: La enzima MyFi™ Mix no produjo amplificación específica del gen FMR1. El kit QIAGEN Multiplex PCR Plus generó productos inespecíficos, y la Expand Long Template PCR System tampoco logró la amplificación del gen objetivo. Si bien no se alcanzó el resultado esperado, este trabajo permitió identificar limitaciones técnicas relevantes y adquirir experiencia en el ajuste de condiciones de PCR para genes complejos.

Este estudio fortaleció las habilidades prácticas del equipo en biología molecular, constituyendo un punto de partida sólido para futuras optimizaciones de protocolos diagnósticos. Se propone continuar con nuevas pruebas que incluyan aditivos y condiciones de ciclado más específicas. La construcción de este protocolo local contribuirá al desarrollo de herramientas diagnósticas accesibles y efectivas en el análisis del gen FMR1.

Bibliografía

1. Tassone F, Protic D, Allen EG, Archibald AD, Baud A, Brown TW, Budimirovic DB, Cohen J, Dufour B, Eiges R, Elvassore N, Gabis LV, Grudzien SJ, Hall DA, Hessler D, Hogan A, Hunter JE, Jin P, Jiraanont P, Klusek J, Kooy RF, Kraan CM, Laterza C, Lee A, Lipworth K, Losh M, Loesch D, Lozano R, Mailick MR, Manolopoulos A, Martinez-Cerdeno V, McLennan Y, Miller RM, Montanaro FAM, Mosconi MW, Potter SN, Raspa M, Rivera SM, Shelly K, Todd PK, Tutak K, Wang JY, Wheeler A, Winarni TI, Zafarullah M, Hagerman RJ. Insight and Recommendations for Fragile X-Pre-mutation-Associated Conditions from the Fifth International Conference on FMR1 Pre-mutation. *Cells*. 2023 Sep 21;12(18):2330. doi: 10.3390/cells12182330. PMID: 37759552; PMCID: PMC10529056.

2. Hunter JE., Berry-Kravis E., Hipp H., Todd P., Adam M., Feldman J., Mirzaa G., Pagon R, Wallace S., Bean L., Gripp K, Amemiya A. FMR1 Disorders. GeneReviews. 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>
3. Nolin SL, Glicksman A, Tortora N, Allen E, Macpherson J, Mila M, Vianna-Morgante AM, Sherman SL, Dobkin C, Latham GJ, Hadd AG. Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles. *Am J Med Genet A*. 2019 Jul;179(7):1148-1156. doi: 10.1002/ajmg.a.61165. Epub 2019 May 2. PMID: 31050164; PMCID: PMC6619443.
4. Touraine P, Chabbert-Buffet N, Plu-Bureau G, Duranteau L, Sinclair AH, Tucker EJ. Premature ovarian insufficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2024 Sep 12;10(1):63. doi: 10.1038/s41572-024-00547-5. PMID: 39266563
5. Ramos C, Ocampos M, Barbato IT, Graça Bicalho MD, Nisihara R. Molecular analysis of FMR1 gene in a population in Southern Brazil: Comparison of four methods. *Pract Lab Med*. 2020 May 6;21:e00162. doi: 10.1016/j.plabm.2020.e00162. PMID: 32426440; PMCID: PMC7225725.