

AVANCES EN INVESTIGACIÓN Y POSIBLES APLICACIONES EXPERIMENTALES EN EL SÍNDROME X FRÁGIL

Dra. Yolanda de Diego Otero. MSc. PhD.

Coordinadora del grupo de investigación CTS-546.



Laboratorio de Investigación. Fundación IMABIS. Hospital Carlos Haya. Málaga.

E-mail: yolanda.diego.exts@juntadeandalucia.es Telf.: 951290346/658146062

Las condiciones genéticas se sitúan entre las causas más frecuentes de la discapacidad intelectual. Los mecanismos genéticos moleculares causantes de estas patologías incluyen impronta genómica, mutaciones clásicas como deleciones/inserciones y cambios de aminoácidos, mutaciones dinámicas de inestabilidad de tripletes, así como herencia mitocondrial. Dentro del contexto de la discapacidad intelectual y los trastornos del desarrollo infantil, nuestro grupo de investigación se ha interesado en mecanismos moleculares alterados por mutaciones genéticas específicas, mecanismos de regulación genética (impronta genómica, disomía uniparental), los fenómenos epigenéticos, y la identificación de genes específicos que afectan la función de sistema nervioso. Desde hace más de 15 años hemos dedicado nuestros esfuerzos a desvelar los posibles mecanismos celulares que conducen a la sintomatología del Síndrome X frágil y el autismo entre otros trastornos.

El Síndrome X Frágil es la causa más frecuente de retraso mental hereditario, se estima que afecta aproximadamente a 1 de cada 2633 varones y 1 de cada 4000 mujeres (Fernandez-carvajal y col. 2009a). En este síndrome aparecen otras características junto con la discapacidad intelectual como, la hipotonía en la primera infancia, retraso del desarrollo psicomotor, macroorquidismo (tamaño de testículos grandes), displasia del tejido conjuntivo (hiperlaxitud articular, prolapso de la válvula mitral), otitis recurrente en la infancia, anomalías faciales como cara alargada y orejas grandes y evertidas de implantación baja, estrabismo y convulsiones. Entre otras características están los problemas de comportamiento, la hiperactividad, los rasgos autistas, la agresividad, el retraso en el lenguaje y problemas de aprendizaje.

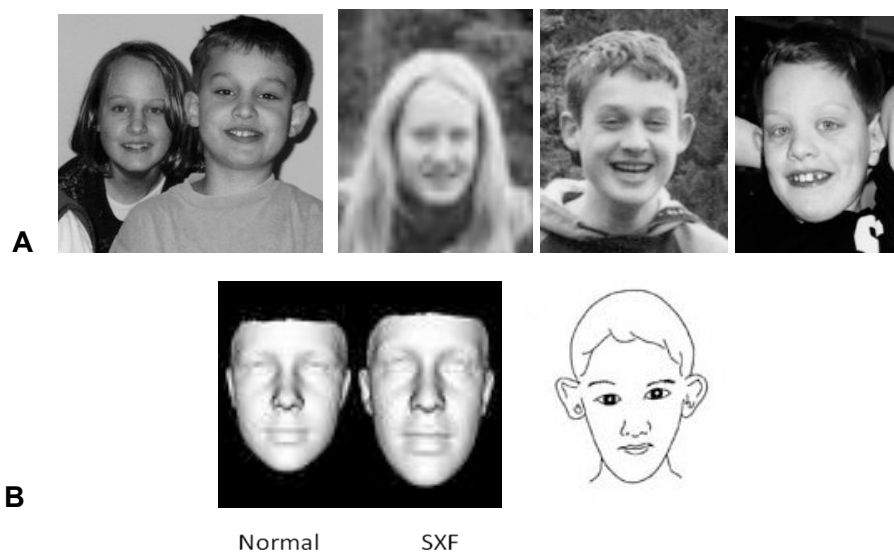


Figura 1: A) Afectados por el Síndrome X frágil. B) Esquemas de las características faciales.

El defecto genético es una región inestable de ADN en el gen FMR1 localizado en la banda Xq23.7 en el cromosoma X. Esta zona aumenta de tamaño por la expansión del número de

tripletes CGG (mutación completa con más de 200 CGG y metilación del promotor del gen) cuando el alelo inestable es transmitido desde la madre a sus hijos, tanto chicos como chicas que podrían estar afectados en mayor o menor medida por la sintomatología que caracteriza el Síndrome.

Existe un estado intermedio que se conoce como premutación cuando el alelo tiene entre 56 y 200 CGG, que aparece con una frecuencia de 1 cada 251 en varones y 1 cada 238 en mujeres. Los varones portadores de una premutación se lo transmiten a todas sus hijas que heredan un tamaño similar al número de repeticiones CGG del padre, y que no manifiestan discapacidad intelectual, pero sí podrían manifestar menopausia precoz por fallo ovárico en un 20% de las mujeres portadoras de premutación menores de 40 años, conocido con el nombre de FXPOI (Fragile X-associated primary ovarian insufficiency). También se ha descrito recientemente una nueva sintomatología asociada a la premutación, que ocurriría en portadores mayores de 50 años y aparece como un parkinsonismo, temblor intencional y ataxia que se conoce con el nombre de FXTAS (fragile X-associated tremor/ataxia síndrome) (Kraff y col 2007). También hay investigaciones que apoyan la aparición de autismo y de patología psiquiátrica en casos de premutación (Bourgeois y col 2009).

Se sabe que el tamaño de repeticiones es un polimorfismo en la población general que puede presentar entre 6 y 55 CGG en la región promotora del gen FMR1, sin que se afecte la inteligencia ni el comportamiento. Nuevos avances apuntan a una posible zona gris que se propone entre 45 y 55 repeticiones que podría ser inestable en familias donde se detecta una pérdida de los tripletes AGG de estabilización que interrumpen la secuencia de CGG cada 10 repeticiones y que aparecen siempre en los alelos normales (Fernandez-Carvajal I, y col 2009b),

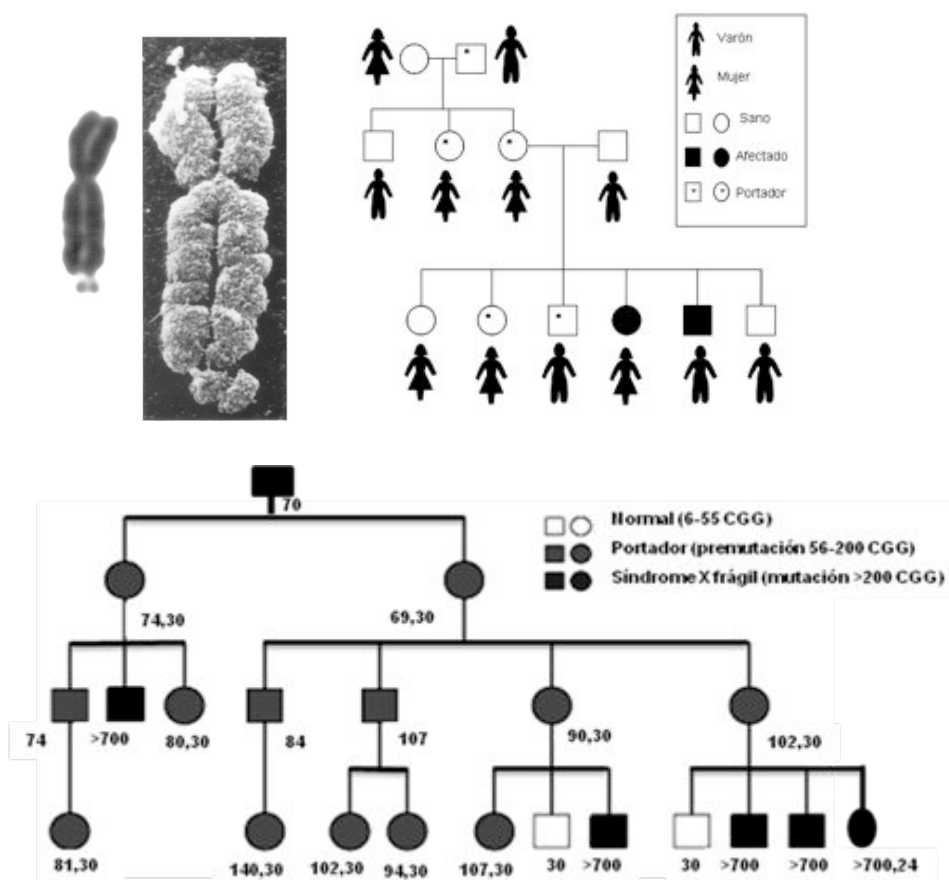


Figura 2: A) Cromosoma X mostrando la fragilidad citogenética que aparece en los afectados por el Síndrome X frágil. B) Ejemplo de herencia C) Pedigree mostrando la herencia inestable en el número de CGG.

El diagnóstico se realiza a través de pruebas genéticas moleculares de ADN, detectando la expansión de los tripletes, por la técnica de Southern-blot o por PCR. El diagnóstico precoz es fundamental para que los pacientes puedan seguir un programa de estimulación temprana que se sabe que tiene efectos muy positivos sobre el desarrollo de las habilidades de los afectados. En los centros especializados se propone un equipo multidisciplinar para la atención a los afectados y sus familias, que permita un diagnóstico certero, un consejo genético adecuado, así como un apoyo psicológico y asistencia social que les permita conseguir el máximo desarrollo de su potencial y la prevención de nuevos casos a través del uso de las nuevas opciones disponibles a través de reproducción asistida con diagnóstico preimplantacional o donación de ovocitos, o el diagnóstico prenatal de los embarazos de riesgo en familias con herencia del gen Fmr-1 inestable.

TRATAMIENTOS DEL SÍNDROME X FRÁGIL.

En la actualidad los tratamientos farmacológicos utilizados en los pacientes tienen un efecto limitado sobre los síntomas que manifiestan, se han propuesto estimulantes del sistema nervioso central como el metilfenidato, para el tratamiento de la hiperactividad, y los antipsicóticos como la risperidona o el Aripiprazol para tratar los trastornos agresivos y autolesivos. Para tratar la ansiedad se proponen fármacos como Alprazolam o Loracepan; también se utilizan fármacos anticonvulsivos en los casos específicos para tratar la epilepsia (Berry-Kravis y Potanos 2004). En general, los tratamientos empleados son sintomáticos, sin existir aún un enfoque específico que evite la aparición de los síntomas observados en la patología.

Ya a finales de los 80 se habían iniciado los ensayos de tratamiento en pacientes con el Síndrome, para comprobar la efectividad de Ácido Fólico (Fisch y col. 1988) o el propranolol (Cohen y col 1991) en el tratamiento de algunos síntomas precoces del Síndrome. Sin embargo es en los últimos 5 años cuando se han publicado una serie de iniciativas terapéuticas experimentales, en base a los hallazgos descritos en investigaciones básicas que indicarían que existen problemas en la neurotransmisión como base fisiopatológica del síndrome. Estos estudios indican un posible exceso de excitación glutamatérgica o disminución en la inhibición gabaérgica. Recientemente se han publicado los resultados de un ensayo en adultos con el SXF en el que se comprueba la eficacia de una dosis única de Fenoban, un potente y selectivo antagonista glutamatérgico del receptor mGluR5 (Berry-Kravis y col. 2009). También recientemente se ha propuesto una posible disfunción colinérgica en el Síndrome X frágil que podría estar implicada en la sintomatología y han descrito que el ensayo con donezepil un inhibidor de la acetilcolinesterasa, mejora significativamente funciones cognitivas y de comportamiento en pacientes afectados (Kesler y col. 2009). Ensayos de tratamiento previos ya han comprobado la efectividad parcial de distintos compuestos como el litio que ha demostrado eficacia para mejorar el comportamiento y el aprendizaje (Berry Kravis y col 2008), la L-acetilcarnitina que demuestra eficacia para reducir la hiperactividad y mejorar la relación social de los niños afectados de 6 a 13 años (Torrioli y col. 2008). También se ha comprobado los beneficios de la melatonina para tratar los problemas del sueño que sufren los pacientes afectados por el Síndrome (Wirojanan y col 2009).

Experimentos recientes en modelos animales, llevan a pensar que el tratamiento con fármacos antagonistas de los receptores del glutamato pueden representar un avance significativo en el tratamiento del síndrome. En los últimos estudios publicados, sobre tratamientos experimentales desarrollados en modelos animales del Síndrome X frágil, se indica que tanto en el ratón como en el modelo en mosca *drosophila*, se revierte parcialmente el fenotipo con antagonistas de los receptores del glutamato mGluR5 (McBride y col. 2005, Yan y col 2005). Estos

hallazgos abren nuevas vías de investigación terapéutica para el síndrome. Varios ensayos clínicos se están desarrollando actualmente en el Síndrome X frágil o autismo (uno de los trastornos más frecuentes en el Síndrome). Así podemos encontrar un ensayo con vitaminas (James y col 2009) para tratar el estrés oxidativo descrito en niños autistas (James y col. 2004) desarrollado en el instituto de investigación del "Arkansas Children's Hospital". En cuanto al SXF se están desarrollando ensayos para comprobar la eficacia de drogas como el STX209 (Arbaclofen) para el tratamiento de la irritabilidad en pacientes (Seaside 2009). Otro ensayo fase-I con el fármaco Donezepil se ha propuesto por la Universidad de Stanford (2008), para comprobar la eficacia en memoria y atención de los pacientes con el Síndrome. También se comprueba si antibióticos como la minociclina, que tiene un efecto positivo en ratones puede ser efectiva en los pacientes (Paribelo 2009). O en su caso el Aripiprazol para tratar los comportamientos agresivos de los pacientes (Indiana 2009). O el Riluzol para el comportamiento obsesivo compulsivo en los afectados (Christian 2009). También un única dosis del fármaco NPL-2009, para comprobar su seguridad (Neuropharm 2008). Otro ensayo ha sido propuesto con el fármaco antagonista de receptores de glutamato AFQ056 realizado por Novartis, para comprobar su efectividad en problemas de comportamiento y aprendizaje en los pacientes (Novartis 2008). Recientemente la farmacéutica Hoffmann-La Roche ha propuesto un ensayo fase II con el fármaco RO4917523, para comprobar sus eficacia en comportamiento y cognición en pacientes (Hoffmann-La Roche 2009).

Nuestros estudios preclínicos publicados en marzo del 2009 avalan la hipótesis del exceso de radicales libres en cerebro y que un tratamiento antioxidante mejora la sintomatología que manifiesta el ratón Fmr1-KO modelo del síndrome que es comparable a la descrita en pacientes. Hemos comprobado que el compuesto lipofílico antioxidante alfa-tocoferol y la melatonina regulan la producción excesiva de radicales libres, controlan el estrés oxidativo y mejoran el aprendizaje y comportamiento (hiperactividad y ansiedad) del modelo de ratón del síndrome X frágil (el Bekay, 2007, de Diego-Otero y col. 2009. Romero y col 2009).

Actualmente a pesar de todos los enfoques terapéuticos experimentales, los tratamientos farmacológicos disponibles tienen un efecto limitado sobre los síntomas más frecuentes de los pacientes afectados por el síndrome. Por todo ello entendemos que es importante desarrollar nuevos enfoques terapéuticos experimentales para comprobar la efectividad de compuestos que han resultado positivos en el modelo en ratón del Síndrome.

RADICALES LIBRES DEL OXIGENO Y ANTIOXIDANTES.

En los organismos aeróbicos se generan radicales libres del oxígeno durante la fisiología normal de la célula. La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la cadena respiración oxidativa. Otras enzimas capaces de producir superóxido son la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. Así, para mantener la homeostasis celular, debe lograrse un equilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y su consumo (Schafer y col. 2001).

Las especies reactivas de oxígeno en muy baja concentración son beneficiosas para los organismos vivos, ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos. También son utilizados en la señalización celular y muy significativamente en el sistema nervioso central están involucradas en la denominada señalización redox.

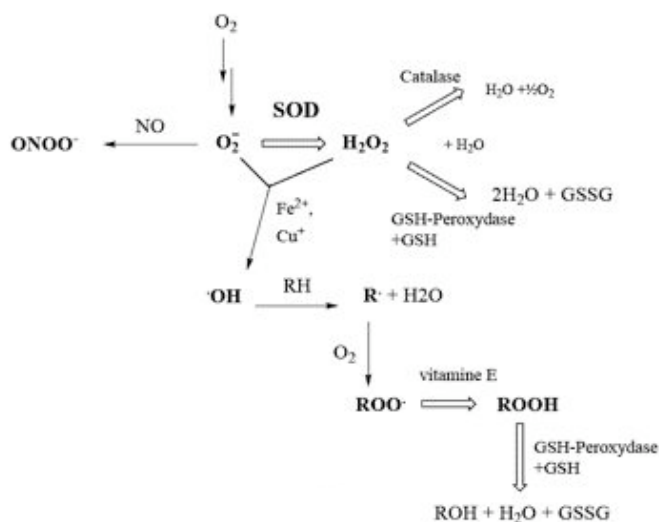


Figura 1. Las especies reactivas del oxígeno y su sistema de detoxificación (versión simplificada). Si el sistema se ve desbordado, surge una situación de estrés oxidativo. SOD: superóxido dismutasa, GSH: glutatión.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas que suelen causar los radicales libres. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando el radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos. Los antioxidantes celulares mejor estudiados son: las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C, y vitamina E. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar las células. Los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles, polifenoles y bioflavonoides obtenidos de frutos y vegetales (Schafer y col. 2001).

Tabla 1. Clasificación de antioxidantes.

<u>Exógenos</u>	<u>Endógenos</u>	<u>Cofactores</u>
Vitamina E	Glutatión	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas:	Hierro
Licopeno	Superóxidodismutasa (SOD)	Selenio
	Catalasa	
	Glutatión peroxidasa	

El sinergismo se produce cuando dos o más antioxidantes presentes en un sistema muestran un efecto total superior al que se puede estimar por una simple adición de sus acciones individuales. En algunas ocasiones el papel sinergista consiste en regenerar el antioxidante oxidado mediante una reacción REDOX que cataliza su paso al estado reducido original. Esto es

lo que ocurre entre la vitamina C y la vitamina E, cuando la primera regenera a la segunda (Cederberg. y col. 2001).

Nuestro grupo de investigación está desarrollando un ensayo terapéutico experimental piloto en el Síndrome X frágil, que se está llevando a cabo durante el año 2010 financiado por el Ministerio de Sanidad. Tratamos de comprobar si una combinación de antioxidantes es efectiva para reducir los síntomas de hiperactividad y ansiedad que manifiestan los pacientes. En el modelo ratón del síndrome se han demostrado resultados positivos, lo que justifica su ensayo en pacientes.

REFERENCIAS:

- Berry-Kravis E, y col. 2008. Open-label treatment trial of lithium to target the underlying defect in fragile X syndrome. *J Dev Behav Pediatr.* 29(4):293-302.
- Berry-Kravis E, y col. 2009. A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. *J Med Genet.* 46(4):266-71.
- Bourgeois JA, y col. 2009. A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. *J Clin Psychiatry.* 70(6):852-62.
- Cederberg J, Simán CM, Eriksson UJ. 2001. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res.* 49(6):755-62.
- Chiurazzi P, Neri G, Oostra BA. 2003. Understanding the biological underpinnings of fragile X syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 15(6):559-66.
- Cohen IL, Tsiouris JA, Pfadt A. 1991. Effects of long-acting propranolol on agonistic and stereotyped behaviors in a man with pervasive developmental disorder and fragile X syndrome: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychopharmacol.* 11(6):398-9.
- de Diego-Otero Y, y col. 2009. Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency. *Neuropsychopharmacology.* 34(4):1011-26.
- el Bekay R, y col. 2007. Enhanced markers of oxidative stress, altered antioxidants and NADPH-oxidase activation in brains from Fragile X mental retardation 1-deficient mice, a pathological model for Fragile X syndrome. *Eur J Neurosci.* 26(11):3169-80.
- Erickson CA, y col. 2009. Open-Label Memantine in Fragile X Syndrome. *J Autism Dev Disord.* Jul 16.
- Fernandez-Carvajal I, y col. 2009a. Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *J Mol Diagn.* 11(4):324-9.
- Fernandez-Carvajal I, y col. 2009b. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn.* 11(4):306-10.
- Fisch GS, y col. 1988. Folic acid treatment of fragile X males: a further study. *Am J Med Genet.* 30(1-2):393-9.
- James SJ, y col. 2009. Efficacy of methylcobalamin and folinic acid treatment on glutathione redox status in children with autism. *Am J Clin Nutr.* 89(1):425-30.
- James SJ, y col. 2004. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr.* 80(6):1611-7.
- Kraff J, y col. 2007. Screen for excess FMR1 premutation alleles among males with parkinsonism. *Arch Neurol.* 64(7):1002-6.
- Kesler SR, Lightbody AA, Reiss AL. 2009. Cholinergic dysfunction in fragile X syndrome and potential intervention: a preliminary 1H MRS study. *Am J Med Genet A.* 149A(3):403-7.
- Romero-Zerbo Y, y col. 2009. Protective effects of melatonin against oxidative stress in Fmr1 knockout mice: a therapeutic research model for the fragile X syndrome. *J Pineal Res.* 46(2):224-34.
- Schafer F, Buettner G. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30 (11): 1191-212.
- Torrioli MG, y col. 2008. A double-blind, parallel, multicenter comparison of L-acetylcarnitine with placebo on the attention deficit hyperactivity disorder in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet A.* 146(7):803-12.

- Uttara B, y col. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 7(1):65-74.
- Wilson JX. 2009. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *Biofactors*. 35(1):5-13.
- Wirojatanan J, y col. 2009. The efficacy of melatonin for sleep problems in children with autism, fragile X syndrome, or autism and fragile X syndrome. *J Clin Sleep Med*. 5(2):145-50.
- Yan QJ, y col. 2000. Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*. 49(7):1053-66.

Referencias de ensayos clínicos experimentales en desarrollo:

- Neuropharm. 2008. Open Label Study Investigating Safety and Efficacy of NPL2009 50 mg - 150 mg on Prepulse Inhibition Tests and Continuous Performance Tasks, Adults With Fragile X Syndrome. May, 2 2008. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00637221?term=fragile+X+syndrome&rank=8>
- Novartis. 2008. Efficacy, Safety and Tolerability of AFQ056 in Fragile X Patients. July 17 2008. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00718341?term=fragile+X+syndrome&rank=10>
- Seaside Therapeutics, LLC. 2009. Safety, Tolerability and Efficacy Study of STX209 in Subjects With Fragile X Syndrome. August 18, 2009 <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00788073?term=fragile+X+syndrome&rank=3>
- Stanford 2008. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00220584?term=Fragile+X+syndrome&rank=7>
- Hoffmann-La Roche 2009. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01015430?term=Fragile+X+syndrome&rank=11>
- Indiana University School of Medicine. Aripiprazole in Fragile X Syndrome. September 16, 2009. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00420459?term=fragile+X+syndrome&rank=6>
- Christian Sarkine Autism Clinic. Indiana University. Riluzole in Fragile X Syndrome. September 15, 2009. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00895752?term=fragile+X+syndrome&rank=7>