



Departamento de
Farmacología y Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga



Instituto de Investigación
Biomédica de Málaga

Síndrome X frágil: eficacia en el ensayo experimental con antioxidantes de un trastorno genético del neurodesarrollo infantil

Memoria de Tesis Doctoral presentada por ROCIO CALVO MEDINA

Licenciada en Medicina y Cirugía

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Rocío Calvo Medina

 <http://orcid.org/0000-0003-3322-4265>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Doña YOLANDA DE DIEGO OTERO, Doctora en Biología, coordinadora del grupo PAIDI CTS-546 y CoIR del grupo de Investigación en Salud Mental del área 2 del IBIMA.

CERTIFICA que Doña ROCIO CALVO MEDINA, licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA el trabajo titulado: **“Síndrome X frágil: eficacia en el ensayo experimental con antioxidantes de un trastorno genético del neurodesarrollo infantil”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Málaga, Enero 2016

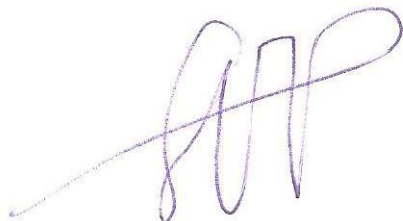


Dra. Yolanda de Diego Otero
Directora

Doña LUCIA PEREZ COSTILLAS, Doctora en Medicina, Profesora del Departamento de Salud Pública y Psiquiatría de la Universidad de Málaga, investigadora del grupo PAIDI CTS-546 y del grupo de Investigación en Salud Mental del área 2 del IBIMA.

CERTIFICA que Doña ROCIO CALVO MEDINA, licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA el trabajo titulado: **“Síndrome X frágil: eficacia en el ensayo experimental con antioxidantes de un trastorno genético del neurodesarrollo infantil”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Málaga, Enero 2016



Dra. Lucía Pérez Costillas

Directora

Yo, ROCIO CALVO MEDINA, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación titulado "**Síndrome X frágil: eficacia en el ensayo experimental con antioxidantes de un trastorno genético del neurodesarrollo infantil**", y que ha sido realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), bajo la dirección de las Dras. Yolanda de Diego Otero y Lucía Pérez Costillas

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga,
Enero 2016



Fdo. Rocío Calvo Medina

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo gracias a los siguientes proyectos financiados por el Ministerio de Sanidad y por proyecto de Excelencia de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía, siendo la investigadora principal: M^a Yolanda de Diego Otero.

1. PROYECTO: Implicación de las vías de señalización intracelular mediadas por la activación de RAC1 GTPasa, como una posible nueva diana terapéutica para el Síndrome X frágil.

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Economía y Competitividad.
Código: SAF2008-00486.

ANUALIDAD FINANCIADA: 2009-2011.

2. PROYECTO: Ensayo piloto de tratamiento, en fase II, doble ciego, aleatorizado, de una vía cruzada, para investigar la efectividad y seguridad de la combinación de Ácido Ascórbico (vitamina C) y Tocoferol (vitamina E) versus placebo para el tratamiento de los trastornos cognitivos y de comportamiento de los niños y adolescentes con Síndrome X frágil.

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Sanidad. Código: TRA-152.

ANUALIDAD FINANCIADA: 2010-2011.

3. PROYECTO: Ensayo de tratamiento fase III, doble ciego, aleatorizado, de una vía cruzada, para investigar la efectividad y seguridad de la combinación de Ácido Ascórbico (vitamina C) y
4. Tocoferol (vitamina E) versus placebo para el tratamiento de los trastornos cognitivos y de comportamiento de los afectados con Síndrome X frágil.

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Sanidad. Código: EC10-191.

ANUALIDAD FINANCIADA: 2011-2014.

5. PROYECTO: Ensayo piloto fase II, aleatorizado, doble ciego controlado con placebo, de una vía cruzada, para investigar la efectividad de la combinación de Ácido Ascórbico (vitamina C) y Tocoferol (vitamina E) versus placebo para el tratamiento de los trastornos neuropsiquiátricos en mujeres portadoras de la mutación del Síndrome X frágil.

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Sanidad. Código: EC11-434.

ANUALIDAD FINANCIADA: 2012-2015.

6. PROYECTO: Nuevas dianas terapéuticas para el Síndrome X frágil: Mecanismos moleculares mediados por proteínas Rho-GTPasas y NADPH-oxidasa, ensayos experimentales en modelos animales transgénicos y en humanos.

ENTIDAD FINANCIADORA: Consejería de Economía, Innovación y Ciencia. P10-CTS-05704

ANUALIDAD FINANCIADA: 2011-2016

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas.

ARTICULOS

- de Diego-Otero Y, **Calvo-Medina R**, Quintero-Navarro C, Sánchez-Salido L, García-Guirado F, del Arco-Herrera I, Fernández-Carvajal I, Ferrando-Lucas T, Caballero-Andaluz R, Pérez-Costillas L.

A combination of ascorbic acid and α -tocopherol to test the effectiveness and safety in the fragile X syndrome: study protocol for a phase II, randomized, placebo-controlled trial.

Trials. 2014 Sep 3; 15:345.

- Lima-Cabello, E. Garcia-Guirado F., Pérez-Costillas L. **Calvo-Medina R**, Quintero-Navarro C., el Bekay-Rizky R., Sanchez-Salido L. and de Diego-Otero Y.

An abnormal nitric oxide metabolism contributes to brain oxidative stress in the mouse model for the Fragile X Syndrome, a possible role in intellectual disability. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Volume 2016 (2016), Article ID 8548910.

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8548910>

- el Bekay-Rizky R, García-Guirado F., **Calvo-Medina R.**, Sánchez-Salido L., Pérez-Costillas L. and de Diego-Otero Y.

Rac1-GTPase abnormal regulation in brain areas from the Fragile X mouse model, new target to treat anxiety and cognition

Neuronal plasticity. En revisión 2015.

CAPÍTULO DE LIBRO

Coordinadoras: Isabel García Alonso. Begoña Medina Gómez y Yolanda de Diego Otero.

Todo sobre el Síndrome X frágil. Guía para familias y profesionales.

CAPÍTULO 2: Aspectos médicos de los pacientes con síndrome X Frágil

Autores: **Rocío Calvo Medina**, Carolina Quintero Navarro, Lucía Pérez Costillas y Lourdes Sánchez Salido

Altaria publicaciones. Serie: Aula inclusiva. 2014. ISBN: 978-84-941845-7-4

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes presentaciones en congresos y reuniones científicas.

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Carolina Quintero, **Rocio Calvo Medina**, Lourdes Sánchez Salido, Elena Lima Cabello, Francisco García Guirado, Isabel Fernández Carvajal, Lucía Pérez Costillas

Título: A phase II randomized placebo-controlled double-blind pilot clinical trial to test the safety and effectiveness of Ascorbic acid and Alpha-tocopherol on behavioral and learning problems in the Fragile X syndrome.

Congreso: National Fragile X Foundation 13th International Fragile X Conference.

Poster No. 0118-000105

Lugar de Celebración: Continental Conference Center. Miami, Florida. USA. 28-29 Julio 2012.

- Autores: Lucía Pérez Costillas, Carolina Quintero, **Rocío Calvo Medina**, Lourdes Sánchez Salido, Elena Lima Cabello, Francisco García Guirado, Isabel Fernández Carvajal, Yolanda de Diego Otero.

Ponencia: Ensayo Clínico piloto fase II, aleatorizado y controlado con placebo a doble ciego para evaluar seguridad y efectividad de los antioxidantes ácido ascórbico y alfa-tocoferol sobre los problemas de comportamiento y aprendizaje del síndrome de X frágil.

Congreso: XVI Congreso Nacional de Psiquiatría

Poster No. PO-417.

Lugar de Celebración: Palacio de Congresos y de la Música. Bilbao, España. 25-28 Septiembre 2012.

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Carolina Quintero, **Rocio Calvo Medina**, Francisco García Guirado, Lourdes Sánchez

Salido, Elena Lima Cabello, Isabel Fernández Carvajal, Lucía Pérez Costillas.

Ponencia: A randomized placebo-controlled double-blind pilot clinical trial to test the effectiveness of Ascorbic acid and Alpha-tocopherol on learning problems in males affected of the Fragile X syndrome.

Congreso: Jacques Monod Conference «Mechanisms of Intellectual Disability: from genes to treatment».

Conferencia código: CJM 06

Lugar de celebración: Roscoff, Brittany, Francia. 3-7 Octubre 2012.

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Carolina Quintero, **Rocío Calvo Medina**, Lourdes Sánchez Salido, Francisco García Guirado, Lucía Pérez Costillas, Isabel Fernández Carvajal

Ponencia: A phase III clinical trial to test the effectiveness of Ascorbic acid and Alpha-tocopherol on the Fragile X Syndrome.

Congreso: European Human Genetics Conference

Lugar de celebración: May 31-June 3, 2014. Milán. Italy. (Control No. 2014-A-475-ESHG) *Comunicación* J08.11

Publicación: *European Journal of human Genetics*. 2014. Vol. 22 *Supl.1:* 425.

- Autores: Francisco García Guirado, Elena Lima Cabello, Rajaa el Bekay Rizky, **Rocío Calvo Medina**, Carolina Quintero Navarro, Isabel Fernández Carvajal, Lucía Pérez Costillas, Yolanda de Diego Otero.

Ponencia: An Abnormal nitric oxide metabolism contributes to brain oxidative stress in the mouse model for the Fragile X syndrome, a pathophysiological role in intellectual disability.

Congreso: 17th International Fragile X and other Early-Onset Cognitive Disorders Workshop

Lugar de Celebración: IGBMC. Illkirch, Strasbourg, France. 27-30/10/2015.

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Lucía Pérez Costillas, **Rocio Calvo Medina**, Carolina Quintero Navarro, Lourdes Sánchez, Francisco García Guirado, Isabel Benítez del Pino, Isabel Fernández Carvajal.

Ponencia: Fragile X syndrome treatment with ascorbic acid and Alpha-Tocopherol: a phase III clinical trial.

Congreso: 17th International Fragile X and other Early-Onset Cognitive Disorders Workshop

Lugar de Celebración: IGBMC. Illkirch, Strasbourg, France. 27-30/10/2015.

**Dedicatoria: A mis padres porque siempre están
A la vida por ponerme a prueba**

*Had I the heavens' embroidered cloths,
Enwrought with golden and silver light,
the blue and the dim and the dark cloths
of night and light and the half-light,
I would spread the cloths under your feet:
But I, being poor, have only my dreams;
I have spread my dreams under your feet;
Tread softly because you tread on my dreams
WILLIAM BUTLER YEATS*

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras Lucía y Yolanda que han sido el empuje y el tesón, con una curiosidad científica y una paciencia infinitas. Gracias. Yolanda eres el corazón de este proyecto.

A mis compañeros del servicio de pediatría, especialmente a la sección de neuropediatría (Jacinto, M^{ra}Dolores, Esther, Cati y Tere) que hacen el día a día más fácil ofreciendo su ayuda y su amistad. Es un placer trabajar con vosotros.

A los que han estado ahí, ellos saben quiénes son. Porque han sabido sacar de mí lo mejor que llevo dentro y que a veces olvido. A Isabel, las Rocíos, Laura, Juli, Cristian, Almu... no tengo palabras

A mis padres que siempre están para echar una mano y que han hecho de mí todo lo bueno que tengo.

A Alberto por enseñarme a remar incluso a contracorriente, esto también es suyo.

A Eduardo por ser el mejor primo del mundo, y a su compañera de fatigas Carmen, gracias por tanto rojo y tanto tiempo

A mis niños que hacían los descansos más felices y el esfuerzo más difícil. Me llenáis de amor.

Y a los retos que hacen interesante la vida, y a los que los ponen porque nos hacen vivirla aunque nos duela.

INDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- AA : Aminoácidos
- AGG : Triplete de adenina-guanina-guanina
- ANOVA : Análisis de la varianza
- ARN : Ácido ribonucleico
- mRNA : RNA mensajero
- CGG: Triplete de citosina-guanina-guanina
- CTRS-R : Escala de Connors revisada, versión para profesores
- CPRS-R : Escala de Connors revisada, versión para padres
- DI : Discapacidad intelectual
- DNA : Ácido desoxirribonucleico
- DSM-IV : manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, IV edición revisada
- FMR1 : Gen de retraso mental ligado al sitio frágil 1 (*fragile mental retardation*)
- FMRP : Proteína codificada por el gen de FMR1 (*fragile mental retardation protein*)
- Fmr1-KO : *Fmr1-KOut* (*Gen FMR1 anulado*)
- FRAXA : Fragilidad A del cromosoma X
- FXTAS : Tremor/ataxia relacionado con el X frágil
- FXPOI : Insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil
- GSH : Glutatión reducido
- GSSG : Glutatión oxidado
- HPA : eje hipotálamo-pituitario-adrenal
- LAC : L acetil cisteína
- MDA : Ácido malondialdehído
- Mel : Melatonina
- mGluR : Receptor metabotrópico de glutamato
- NES : Señal de exportación nuclear
- NLS : Señal de localización nuclear

- NMDA: Ácido N-metil-D-aspartato
- NOS : Sintasa del óxido nítrico
- PCR : Reacción en cadena de la polimerasa
- Prot : Proteínas
- RIA : Radioinmunoensayo
- ROS : Especies reactivas de oxígeno
- SNC : Sistema nervioso central
- SXF : Síndrome X frágil
- TDHA : trastorno por déficit de atención e hiperactividad
- TEA : trastorno del espectro autista
- Vit. C : Vitamina C (ácido ascórbico)
- Vit. E : Vitamina E (α -tocoferol)
- VTN : Varones transmisores normales
- WB : *Western blot*
- WT : *Wild type*
- Xq27.3 : Brazo largo del cromosoma X, banda 27.3
- XLID : Discapacidad intelectual ligada al cromosoma X

RESUMEN

RESUMEN

La principal causa hereditaria de trastornos del desarrollo infantil, que cursa con discapacidad intelectual, es el Síndrome X frágil (SXF), afecta a 1 de cada 2600 recién nacidos. A pesar de ser una de las enfermedades hereditarias de la infancia más frecuentes, es todavía un gran desconocido entre la población general e incluso entre los profesionales implicados en su atención. En este síndrome aparecen otras características junto con la discapacidad intelectual como, la hipotonía en la primera infancia, falta de interacción con la madre y el medio, retraso del desarrollo psicomotor, macroorquidismo, 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. En el fenotipo conductual aparecen importantes problemas de comportamiento, hiperactividad, rasgos autistas, agresividad, retraso en el lenguaje y problemas de aprendizaje, así como epilepsia.

En la actualidad solo se emplean en el SXF tratamientos sintomáticos sin existir aun un enfoque específico que evite la aparición de los síntomas. 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 SXF. Estudios preclínicos publicados en marzo del 2009 avalan la hipótesis del exceso de radiales libres en cerebro del modelo animal del SXF y plantean que un tratamiento antioxidante mejoraría la sintomatología y el pronóstico del Síndrome. Se ha comprobado que el compuesto lipofílico antioxidante alfa-tocoferol (vitamina E) regula el estrés oxidativo y mejoran el aprendizaje y comportamiento del modelo de ratón del síndrome X frágil

En la primera parte realizamos una valoración del patrón bioquímico específico en individuos con SXF en comparación con sus hermanos sanos. Para ello se tomaron muestras de 18 participantes con SXF y de 15 hermanos sanos con edades comprendidas entre los 6 y los 30 años. Se analizaron una serie de metabolitos sanguíneos relacionados con el eje HPA, el estado de estrés oxidativo y el nivel de antioxidantes. Los niveles de hormonas suprarrenales

adrenalina y noradrenalina están significativamente elevados en muestras sanguíneas de pacientes afectados por SXF comparados con muestras de controles sanos. Se aprecia también una reducción de los niveles plasmáticos de vitamina C en plasma y alteración en niveles de otros antioxidantes. Estos resultados avalan la importancia de suplementar la dieta con antioxidantes para reducir el efecto de los radicales libres sobre las células.

En una segunda parte presentamos los resultados de un ensayo piloto que comprueba la efectividad y seguridad del tratamiento con una combinación de dos antioxidantes, el ácido ascórbico y el tocoferol (vitaminas C y E) en individuos con SXF entre 6-18 años. Intentamos mejorar dos aspectos en los participantes, por un lado las alteraciones bioquímicas del estrés oxidativo y por otro lado los problemas cognitivos y de comportamiento observados en los pacientes afectados por el SXF. El ensayo se ha realizado de manera aleatorizada, con un estudio doble ciego controlado con placebo, manteniendo el tratamiento durante 12 semanas. Hemos incluido un total de 30 participantes, todos afectados de SXF con sintomatología conductual evidente. 15 recibieron el tratamiento y 15 el placebo. En cada grupo se realizaron subgrupos para el análisis de datos dividiéndolos en mayores y menores de 13 años y entre los que tomaban o no algún psicofármaco. Se administraron vitamina C (ácido ascórbico 10 mg/kg) y vitamina E (d-alfa-tocoferol 10mg/kg). Se comprueba descenso significativo de los niveles de adrenalina y ácido homovalínico en orina. A nivel conductual comprobamos la mejoría en los resultados del cuestionario de Conner's para padres y profesores en relación con hiperactividad, que es estadísticamente significativa en el grupo de participantes de 6-13 años. En la subescalas manipulativa y verbal de inteligencia revisada para niños de wechsler (WISC-R), los beneficios son evidentes en los participantes más jóvenes que aún no han precisado medicación psicotrópica. También se aprecia mejoría en el inventario de comportamiento en el desarrollo. Se obtiene resultados favorables en la valoración del índice general del bienestar psicológico (PWBGI) en los padres de los participantes. Se comprobó la seguridad del tratamiento con un seguimiento estrecho de los posibles efectos secundarios o mala tolerancia a los fármacos. No se han observado efectos secundarios por lo que el uso de

estos compuestos tiene un buen perfil de tolerabilidad y seguridad, factor que aporta más interés a los resultados de esta investigación.

Estos resultados justifican la realización de un ensayo con mayor número de pacientes y un seguimiento a más largo plazo lo que permitirá conclusiones más fiables. También apoyan el interés por diagnósticos más precoces que permitirían instaurar las terapias en edades tempranas, en las que su eficiencia parece mayor al valorar los resultados obtenidos en nuestra serie.

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DE LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO DE ORIGEN GENÉTICO.....	1
2. ASPECTOS CLÍNICOS GENERALES DEL SXF.....	3
2.1 SXF antecedentes históricos.....	3
2.2 Fenotipo clínico de los individuos SXF.....	5
2.3 Fenotipo cognitivo-conductual en la mutación completa.....	10
Perfil cognitivo.....	10
Alteración de la memoria.....	10
Déficit de atención.....	11
Trastorno del aprendizaje.....	12
Alteración en percepción e integración sensorial.....	12
Afectación del lenguaje.....	13
Afectación de la conducta social.....	14
2.4 Patrón de herencia del SXF.....	16
3. MECANISMOS BIOQUÍMICOS, ANATÓMICOS Y GENÉTICOS QUE SUBYACEN AL SÍNDROME.....	19
3.1 El gen y la proteína.....	19
3.2 Alteraciones bioquímicas.....	23
3.3 Activación del eje HPA y estrés oxidativo.....	25
4. ENSAYOS EXPERIMENTALES DE TRATAMIENTO EN SXF.....	26
5. NUEVA DIANA TERAPÉUTICA: NORMALIZAR EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO TRATAMIENTO EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA.....	34
5.1 Concepto de estrés oxidativo.....	34
5.2 Estrés oxidativo en sistema nervioso central.....	35
5.3 Radicales libres y sistemas de protección.....	38

1.2. Ámbito del estudio.....	60
1.3 Población del estudio.....	60
Selección de participantes/ consentimiento informado.....	60
Criterios de inclusión.....	61
Criterios de exclusión.....	62
1.4 Aleatorización.....	62
2. Metodología del Protocolo del estudio.....	63
2.1.Evaluaciones.....	64
2.2. Abandono / cese del estudio.....	64
2.3. Criterios éticos: normativa aplicada.....	65
2.4. Detalles del tratamiento.....	66
Dosificación y administración de medicación.....	66
La preparación y el etiquetaje del tratamiento.....	66
Otras medicaciones autorizadas.....	66
2.5 Métodos específicos de evaluación.....	67
Evaluación de efectividad a nivel conductual.....	67
Evaluación de muestras	69
Parámetros médicos evaluados en los participantes.....	70
Recogida de efectos adversos	71
3. Procedimientos y control del ensayo.....	72
3.1 Selección de los participantes.....	72
3.2 Periodos de estudio.....	73
4. Análisis de los datos.....	74
4.1 Cálculo del poder estadístico, el establecimiento del tamaño y seguridad de la muestra.....	74
4.2 Estadísticos aplicados.....	74

<u>RESULTADOS:</u>	75
PARTE A- Patrón bioquímico en individuos SXF comparado con sus hermanos sanos.....	77
1. Características de la población.....	77
2. Características analíticas.....	78
PARTE B- Ensayo clínico: TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES PARA EL SINDROME X FRAGIL	93
1. Características de la población.....	93
2. Distribución de grupos y randomización.....	95
3. Seguimiento y efectos adversos.....	96
4. Resultados de las evaluaciones neuropsicológicas.....	97
5. Resultados analíticos relevantes.....	109
<u>DISCUSION</u>	119
PARTE A- Patrón bioquímico en individuos SXF comparado con sus hermanos sanos.....	121
PARTE B- Ensayo clínico: TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES PARA EL SXF	129
<u>CONCLUSIONES</u>	149
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	155
INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS.....	152
PUBLICACION DEL ENSAYO CON ANTIOXIDANTES.....	179

INTRODUCCION

1. ASPECTOS GENERALES DE LOS TRASTORNOS DEL NEURODESARROLLO DE ORIGEN GENÉTICO

Las causas de discapacidad intelectual (DI) pueden ser ambientales, genéticas o multifactoriales. En la actualidad se afirma que, al menos, el 30% de los pacientes que presentan trastornos del neurodesarrollo, como discapacidad intelectual, y un alto porcentaje de los que presentan trastornos conductuales, como los trastornos del espectro autista, tienen un origen genético. Se cree que las alteraciones genéticas individuales podrían explicar la mayoría de los casos. Desde anomalías cromosómicas o variantes en número de copias (CNV), que afectan a varios genes, a casos de mutaciones puntuales en un gen. Estas formas monogénicas se caracterizan por una heterogeneidad extrema, con más de un centenar de genes descritos que causan DI y están ligados al cromosoma X (XLID), y otros tantos asociados a formas autosómicas recesivas o autosómicas dominantes. En total, se han propuesto en la literatura más de 500 genes como causas de DI, con una gran heterogeneidad fenotípica en la severidad y síntomas asociados (Redin y cols., 2014. Tzschach y cols., 2015. Hu y cols., 2016). El Síndrome X-Frágil (causado por la mutación del gen FMR1) representa el 30% de toda la discapacidad intelectual ligada al cromosoma X.

Muchas de estas patologías son muy poco prevalentes perteneciendo al grupo de las llamadas enfermedades raras. El problema a la hora de investigar en estas enfermedades surge a varios niveles. Uno de ellos se asocia a las clasificaciones que usamos para aunar conceptos y criterios diagnósticos como el "manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la academia americana de psiquiatría" (DSM-IV) y la clasificación internacional de enfermedades (CIE 10). Estas clasificaciones presentan falta de validez ya que se basan únicamente en consensos sobre grupos de síntomas sin que se posean pruebas

biológicas objetivables que sirvan para comprobar los diagnósticos de manera objetiva (Bernstein CA y cols., 2011)

Otro problema surge en relación con la investigación del tratamiento de los trastornos del neurodesarrollo. Sería fundamental encontrar factores comunes biológicos, genéticos y ambientales que pudieran influir en el enfoque de dicha investigación, y con ello en las posibles alternativas terapéuticas (Artigas-Pallares J y cols., 2015)

Los trastornos del neurodesarrollo abarcan una serie de síntomas que se solapan y que a veces se podrían encontrar también en la población general (no hay un límite preciso entre la normalidad y la patología). Además, como hemos comentado, en la mayoría de casos no existen marcadores biológicos objetivos, por lo tanto el diagnóstico se presta a la subjetividad y a la aproximación que podemos lograr a través de los test psicométricos. Aun así, hoy en día existen pruebas genéticas de última generación para optimizar el diagnóstico y, en algunos casos, pruebas complementarias específicas que pueden ayudar a medir la eficacia de las medidas de intervención que queramos investigar.

Es muy difícil crear test validados que eliminen los posibles sesgos originados por cada cultura, la subjetividad del entrevistador o el ambiente social y familiar del paciente. Además debemos tener en cuenta que trabajamos con niños. En ellos encontramos dificultades añadidas para realizar los test. Las pruebas psicosométricas para valoración de la capacidad intelectual, por ejemplo, duran aproximadamente 1-2 h, valorando CI verbal, manipulativo y total. Precisan colaboración del individuo a entrevistar, un nivel mínimo de actitud proactiva y cierto nivel de empatía del entrevistador para captar la atención del menor.

Todos estos aspectos nos dan una idea de la dificultad que encuentra la investigación de la intervención psicofarmacológica en pacientes con DI o cualquier otro trastorno del neurodesarrollo. También hace evidente el interés que nos ofrecen ciertos síndromes sobre los que ya

se ha trabajado ampliamente en experimentación básica, como el SXF, de los que tenemos un nivel elevado de conocimiento de las bases neurobiológicas y genéticas en los que se asienta toda su sintomatología. A través del trabajo con animales de experimentación y con voluntarios que presentan estas patologías podemos conocer más acerca de su condición, pero también de los mecanismos que rigen los trastornos del neurodesarrollo y, en concreto, de la DI y los trastornos comportamentales.

2. ASPECTOS CLÍNICOS GENERALES DEL SÍNDROME X FRAGIL

2.1. SXF Antecedentes históricos:

El síndrome X frágil (SXF) es un trastorno del desarrollo neurológico heredado. Se caracteriza por problemas conductuales, de aprendizaje, y por un fenotipo específico físico y neuropsicológico. Presenta una clara comorbilidad con autismo y otros trastornos del neurodesarrollo.

Las últimas estimaciones apuntan que aproximadamente un 3% de la población mundial presenta algún grado de DI (Leonard H y cols., 2002). La discapacidad intelectual podría ser definida como la incapacidad para desarrollar habilidades y destrezas acordes a los estándares normales establecidos por los análisis de inteligencia en la población general, dentro del rango de edad. Entre los procesos sindrómicos asociados a alteraciones en el cromosoma X la principal causa de trastornos hereditarios del desarrollo infantil que cursa con discapacidad intelectual es el SXF (Hagerman PJ, 2008). Además, es la principal enfermedad genética causante de autismo hereditario. El SXF, al contrario que síndrome de Down en el que la mayoría de los casos son *de novo*, siempre es heredado y afecta a varios integrantes de la familia ya sea como portadores o afectados.

El síndrome X frágil (SXF) fue descrito por primera vez por los doctores Martin y Bell en 1943 (Martin JP y Bell J ,1943.). Observaron la existencia de familias con varios varones afectados por discapacidad intelectual, rasgos faciales característicos y macroorquidismo. Con una herencia ligada claramente al cromosoma sexual X. El perfil genético se describió en 1969, al comprobar que existía en los cromosomas X de estos pacientes la tendencia a mostrar un sitio frágil al observar la preparación citogenética de células en metafase y sólo cuando el cultivo celular se hacía en un medio pobre en ácido fólico. Esta zona frágil, localizada al final del brazo largo del cromosoma X en la banda Xq27.3, se denomina FRAXA y será la base de la nueva denominación del síndrome (Lubs HA y cols., 1969).

El SXF presenta una prevalencia de 1/2500-4000 en la población general. El hallazgo de la premutación es más común, con porcentajes que oscilan entre 1/130-250 mujeres y 1/250-810 hombres. (Turner G y cols., 1996; Fernández-Carvajal I y cols., 2009). El SXF podría ser más frecuente si se consideran como posibles candidatos a estudio los varones con trastorno de conducta y DI leves (Crawford DC y cols., 2002). Por otro lado, los resultados recientes de un meta-análisis que recoge datos de publicaciones previas en la literatura indicarían que la prevalencia del SXF sería menor de lo esperado, reduciéndose a un varón de cada 7143 y, en el caso de las mujeres, a una de cada 11110 (Hunter J y cols., 2014).

Por su relativa prevalencia en la población y ante la falta de hallazgos típicos en la primera infancia, el estudio del gen FMR1 para diagnosticar el SXF es actualmente uno de los test genéticos más solicitados a los laboratorios de genética molecular. Inicialmente el estudio consistía en un cariotipo valorado en un medio pobre en ácido fólico. Actualmente se realiza el estudio molecular (PCR o Southern blot) que permite valorar el número de trinucleótidos CGG en la zona de mutación dinámica descrita en esta patología. Con las actuales

técnicas se detectan más del 99% de los casos incluyendo a portadores y permutados. Se han desarrollado también técnicas para medir la expresión de la proteína FMRP en sangre y en raíz de cabello. Esta prueba es muy rápida y específica para varones con la mutación. La principal aplicación del test de expresión de FMRP sería el cribado (screening) del SXF en varones en poblaciones de riesgo. (Artigas-Pallares J y cols., 2001). Las más recientes técnicas de diagnóstico incluyen PCR para conocer en número de repeticiones de la zona de los triplete, el grado de metilación y el número de intersecciones AGG que pueden encontrarse distribuidas entre los triplete CGG , lo que completa el estudio de diagnóstico y ayuda sobremano a la hora de realizar un buen consejo genético familiar.

2.2 Fenotipo clínico de los individuos SXF:

Además de la asociación con DI de moderada a grave, estos individuos presentan características que se hacen más evidentes con la edad. Los rasgos físicos característicos comprenden los recogidos en la tabla 1.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	Cara alargada, macrocefalia Frente amplia y ancha Boca grande, labios gruesos Paladar ojival con mala oclusión dentaria Orejas grandes, prominentes y revertidas Mandíbula prominente Macroorquidismo (generalmente tras la pubertad).
ALTERACIÓN OFTALMOLÓGICA	Estrabismo 25-50% Defectos de refracción
ALTERACIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO	Hiperlaxitud articular, sobretodo distal Luxaciones Hernias Peptum excavatum Pies planos valgus Hiperelasticidad cutánea
ALTERACIONES ENDOCRINAS	En mutación completa: - Obesidad en fenotipo Prader-Willi - Pubertad precoz En premutados: - Fallo ovárico precoz - Hipotiroidismo
ALTERACIÓN CARDIOLÓGICA	Dilatación aórtica y Prolapso válvula mitral Asociados a alteración del tejido conectivo
ALTERACIÓN ORL	Otitis de repetición en la infancia Apneas obstructivas por adenoides

Tabla 1. Características fenotípicas propias de SXF

Algunos rasgos como la hipotonía, la sintomatología ORL y la hiperlaxitud articular, sobre todo a nivel distal, van disminuyendo con la edad. Otras características se hacen más patentes con los años (cara alargada, boca grande, orejas evertidas de implantación baja y grandes, macroorquidismo a partir de la pubertad). Los niños SXF suelen tener problemas visuales como estrabismo y, en ocasiones, son derivados al neuropediatra por rasgos autistas, hiperactividad, problemas escolares o convulsiones.

En la infancia es más evidente el fenotipo conductual y comportamental que el físico. En los primeros años de vida destaca por encima de todo un decalaje en la adquisición de hitos madurativos, sobre todo a nivel del lenguaje. Posteriormente se va conformando un cuadro sindrómico completo, que junto a las características físicas ya descritas se hace mucho más evidentes con la edad y más aún en varones que en mujeres. A partir de los 4-6 años se conforma el fenotipo conductual que es también muy característico en este síndrome (hiperactividad, comportamientos asociados al espectro autista, estereotipias, lenguaje poco comunicativo y reiterativo, hipersensibilidad a estímulos sensoriales) (De Vries BB y cols., 1997, Hagerman RJ, 2002). Este fenotipo cognitivo conductual del SXF se define como "el patrón característico a nivel motriz, cognitivo, lingüístico y de trastornos en el área social que se asocia de manera consistente con este trastorno biológico" (Artigas J y cols., 2001; Flint J y cols., 1994). Los niños presentan ansiedad, timidez, tozudez y agresividad. Destaca la impulsividad, defensibilidad táctil, contacto visual escaso y estereotipias frecuentes. Los problemas escolares vienen dados por la discapacidad intelectual presente en casi todos los pacientes, la hiperactividad y el déficit atencional, los problemas de memoria y los de procesamiento visoespacial y lingüístico. La asociación con ciertos rasgos de otros trastornos del neurodesarrollo (TDHA, TEA, epilepsia) y la individualidad personal, familiar y genética de cada individuo pueden condicionar comportamientos únicos en algunos pacientes, con menor o mayor sintomatología. La gravedad es altamente variable en los individuos afectados. Una de las variables implicadas en este hecho puede ser el efecto de la mutación del gen FMR1 en combinación con el fondo o "background" genético de cada familia (Hessl y cols., 2008).

Teniendo en cuenta que hasta un 30% de los niños afectados no presentan rasgos físicos característicos y que incluso pueden aparecer fenotipos físicos más cercanos a otros síndromes como Sotos o Prader

Willi, es posible que el diagnóstico se retrase en ocasiones hasta la adolescencia, principalmente en los casos de las niñas. Actualmente la media de edad de diagnóstico en España se sitúa en torno a los 3-4 años, lo que permitiría una actuación precoz a nivel escolar, el consejo genético a familiares y el seguimiento de portadores (Artigas J y cols., 2001). Lo importante es realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad, ya que cuanto antes se implante un programa de atención temprana y estimulación sensorial, mejor será el desarrollo posterior del individuo afectado por el SXF. Aunque lo ideal sería conseguirlo en edades más tempranas y por ello se están llevando a cabo programas pilotos de inclusión del SXF en los cribados neonatales, intentando incluir el estudio genético en la prueba del talón realizada en todos los recién nacidos.

En mujeres con SXF la sintomatología es más leve, se observa más variabilidad y es menos frecuente la aparición de las características físicas o los problemas médicos. A veces presentan problemas de atención, impulsividad y déficit en la ejecución de funciones incluso cuando su CI está dentro del rango normal (Hagerman RJ y cols., 2009; Berry-Kravis E, Potanos, 2004; De Vries y cols., 1996; Wang H y cols., 2010). Respecto a los rasgos autistas, que son poco comunes en las mujeres con SXF, puede aparecer timidez extrema, mutismo selectivo, fobias específicas, ansiedad social y déficit en cuanto a la socialización. Las mujeres con la premutación se presuponen asintomáticas y transmiten al 50% de su descendencia el gen, generalmente con un incremento de tripletes CGG, pudiendo tener hijos con permutación o con la mutación completa. Los varones portadores de una premutación tendrán hijas que serán en todos los casos portadoras de la premutación, heredando un número de repeticiones CGG muy similar a su padre o incluso un menor número de repeticiones (Hagerman RJ ,2002).

Se han descrito 2 nuevos subfenotipos asociados a los individuos portadores de la premutación. El fallo ovárico precoz, que aparece en un porcentaje de mujeres portadoras (Sherman SL, 2000). Y la asociación de temblor intencional, ataxia cerebelosa, parkinsonismo, deterioro cognitivo y atrofia generalizada en neuroimagen denominado FXTAS (fragile X tremor/ataxia Syndrome), que se observa en un porcentaje de individuos de ambos sexos mayores de 50 años que son portadores de premutación (Hagerman RJ y cols., 2001). Además, se observan alteraciones conductuales en individuos premutados en mayor porcentaje que en la población general. La causa parece ser el aumento de cantidad de ARNm del gen FMR1 a nivel cerebral que conduce a neurotoxicidad celular a nivel del sistema nervioso central.

Con respecto a la valoración neuroanatómica el SXF tiene también características específicas que son evidenciadas en necropsias y muestras de tejido cerebral de animales de investigación. Es característica la presencia de neuronas con mayor número de espinas dendríticas alargadas, delgadas y tortuosas a nivel de la corteza cerebral. También se evidencia un aumento de volumen intracraneal, sobre todo a nivel selectivo en regiones de sustancia gris subcorticales, y disminución de volumen a nivel del vermix cerebeloso posterior (Hoeft F y cols., 2010). Esta alteración cerebelosa se aprecia en varios estudios en los que se observa hipoplasia a nivel del vermix cerebeloso, como hemos comentado, y aumento del tamaño ventricular en adultos con SXF (Koukoui SD y cols., 2006; Hoeft F y cols. 2010). Se aprecia en estos individuos adultos también aumento de volumen en el caudado, tálamo y a nivel del giro fusiforme. Este hallazgo se aprecia también en niños de 1-3 años con SXF, lo que hace pensar que es una alteración que aparece ya desde el nacimiento. Otras regiones, que en un primer momento no presentan diferencias con el grupo control, se alteran en el seguimiento de estos pacientes (al realizar segundo control de RM en niños de 3-5 años) lo que parece indicar que son cambios evolutivos asociados a la falta de la proteína

FMRP (Tassone F y cols, 1999). Los estudios de tractografía también indican cambios a nivel de la sustancia blanca. La afectación a nivel cerebral en estos pacientes parece tener mucho que ver con las áreas más ricas en la proteína FMRP y cambia durante el desarrollo del paciente dependiendo del momento de máxima actividad mielinizante y de la poda sináptica en cada área. Los avances a nivel del estudio de neuroimagen podrían conducir a la creación de un catálogo de imágenes típicas del cerebro en el SXF que serían útiles para valorar la eficacia de posibles tratamientos futuros, y como biomarcador del síndrome (Hall SS y cols., 2014)

2.3 Fenotipo cognitivo-conductual en la mutación completa

PERFIL COGNITIVO:

Hasta el 80% de los niños SXF tienen DI de diferente grado que además se ve influenciada por los problemas conductuales. Al parecer los estudios demuestran una relación entre los niveles de proteína y el desarrollo cognitivo (Tassone F y cols., 1999)

Se ha comprobado que muchos de estos niños son capaces de superar sin problemas test de inteligencia alcanzando un cociente intelectual cercano a la normalidad, pero en realidad son incapaces de llevar una vida social y escolar normal, presentando problemas en el aprendizaje sobre todo en los conceptos abstractos, las matemáticas y la lógica. Aun así, la variabilidad de afectación intelectual es amplia, siendo siempre menor en mujeres y en los pacientes con mosaicismos. La capacidad de abstracción y de comprender conceptos complejos marca la diferencia.

ALTERACIÓN EN LA MEMORIA:

A nivel del desarrollo de la memoria existen pocos datos en la bibliografía acerca de los pacientes con SXF. Como ya sabemos la

memoria a largo plazo comprende la memoria implícita, que se asocia a habilidades aprendidas que realizamos automáticamente, y la memoria explícita que almacena hechos, experiencias y conceptos.

La memoria operativa está sustentada en áreas frontales y forma parte del complejo engranaje que nos permite resolver cuestiones en el entorno, permitiendo integrar y procesar toda la información sensorial y la aportada por la memoria. Esta memoria a corto plazo, cuya eficiencia es fundamental para la vida diaria, está alterada en los niños con SXF presentando mucha mayor afectación de la memoria asociada al bucle fonológico que a la agenda visoespacial. Estos hallazgos se ven también en mujeres afectas y explican, en parte, los problemas de comprensión y lenguaje de estos individuos (Baker S y cols., 2011). Por otro lado muestran facilidad para el procesamiento global y la memoria a largo plazo, sobre todo para estímulos visuales. Retienen la información visual con más facilidad que la auditiva, entre otras cosas por ser estímulos más persistentes.

DÉFICIT DE ATENCIÓN:

Una de las características más frecuentes en los niños con SXF es la tríada inatención, exceso de actividad e impulsividad severa y persistente que se observa en el 80% de los varones y en un 35% de las mujeres. Estos déficits no tienen que ver con el nivel intelectual del paciente sino, sobre todo, con su incapacidad para la inhibición de estímulos, sus problemas con la búsqueda organizada y la planificación de respuestas y con la menor atención selectiva, dividida y sostenida (comparando en estudios con otros individuos). Por tanto el problema de base estará desde el punto de vista neuropsicológico en la función ejecutiva (Cornish K y cols., 2001). De hecho, se ha demostrado que las medicaciones que mejoran la impulsividad y la hiperactividad en los niños con TDHA pueden ser útiles en estos niños afectos de SXF (Artigas-Pallares J, Brun -Gasco C, 2004).

TRASTORNO DEL APRENDIZAJE:

La limitación cognitiva y la forma en que procesan la información, con déficits sobre todo a nivel verbal, va a limitar su aprendizaje. Su capacidad de imitación y orientación espacial es buena. El aprendizaje en muchas ocasiones se logrará por imitación de actos repetitivos. Les cuesta aprender la relación causa efecto, la resolución de problemas y tienen dificultades para controlar el estrés que les produce no poder resolver estas cuestiones. Todo esto limita su capacidad de aprendizaje en edades tempranas y se verá más acentuado aún en la edad escolar, ya que el procesamiento de información y resolución de tareas de organización secuencial les cuesta más. Además, la abstracción, el cálculo matemático y el procesamiento de conceptos más complejos que se exigen a nivel escolar en cursos más avanzados hacen que las diferencias sean evidentes con niños de su edad (Renda MM y cols., 2014).

Aunque el cociente intelectual parece ser estable durante la edad adulta, existe cierta preocupación de que las personas con SXF pueden experimentar una pérdida de habilidades cognitivas con el envejecimiento que es más dramática que en la población general. El hallazgo de que FMRP regula también la expresión de proteína precursora de amiloide hace pensar que podrían presentar una variante de demencia o Alzheimer precoz (Westmark CJ y Malter JS 2007).

ALTERACIÓN EN LA PERCEPCIÓN E INTEGRACIÓN SENSORIAL:

La capacidad de fijación de la mirada y la sonrisa social deben apreciarse en los primeros 3 meses de vida. El interés por las expresiones faciales y los objetos, un seguimiento visual normal y el inicio de la manipulación indicarán una buena interacción con el medio y el desarrollo normal de las capacidades visoespaciales y

visoperceptivas. Los niños con SXF desarrollarán problemas para la integración sensorial con síntomas que van, desde hiper o hiposensibilidad a los estímulos sensoriales, hasta la defensibilidad táctil o la incapacidad para mantener el contacto visual o estar en lugares muy estimulantes. Todo esto condiciona mucho el comportamiento de estos niños en lugares públicos y su relación con el entorno.

Debemos añadir la asociación frecuente de déficits sensoriales. En un estudio con 104 participantes el 43% presentaban algún problema oftalmológico, estrabismo o defectos de refracción y hasta un 40% presentaban otitis media de repetición, que en edades tempranas se considera la primera causa de hipoacusia de transmisión (Artigas J y cols., 2001). Estudios neuropsicológicos realizados en grupos de voluntarios con SXF muestran un déficit importante a nivel visoespacial y visoperceptivo que afectará a la habilidad para manipular objetos en el espacio y para reproducir imágenes abstractas o concretas. Los individuos SXF pueden realizar tareas visoperceptivas pero son menos hábiles en tareas visomotoras o visoconstructivas. Estas limitaciones se han asociado con un correlato anatómico, al evidenciar niveles altos de expresión del gen FMRP a nivel del núcleo geniculado lateral sobretodos en neuronas magnocelulares que tienen una función importante en la coordinación de la información sensorial y su integración a nivel central (Koukoui SD y Chaudhuri A, 2007).

AFECTACIÓN DEL LENGUAJE:

El trastorno en el lenguaje es una de las causas que originan las primeras consultas y alarma familiar en estos niños. Hay un retraso en el inicio de las primeras palabras (niños: 2.8 años, niñas: 1.8 años). La mayoría terminan desarrollando el lenguaje, pero hay un porcentaje del 10% aproximadamente que precisaran finalmente apoyo, con lenguaje complementado con pictogramas o signos. Incluso existe un

4 % de niños con SXF que no llegan a desarrollar nunca un lenguaje comunicativo. Entre los que lo logran durante la edad escolar destaca un trastorno fonológico sintáctico que posteriormente podrá pasar a ser léxico sintáctico y semántico pragmático. Persistiendo en adultos los problemas pragmáticos (Gross C y cols., 2015).

Característicamente el lenguaje es estereotipado, acelerado y con dificultades de entonación y modulación. Se ve interferido por los trastornos de la conducta. Es muy habitual la repetición de palabras, preguntas y las ecolalias diferidas (repetir a menudo una frase de un anuncio, frases hechas o frases que han dicho otras personas). Presentan también articulación pobre de los sonidos, asociado a problemas con la planificación motora de los movimientos del habla.

El aprendizaje de palabras nuevas se suele dar con relativa facilidad una vez el niño ha iniciado el lenguaje oral. La memoria auditiva a largo plazo y la capacidad de imitación elevada favorecen este proceso, así como el de la correcta estructuración de las frases que, a menudo, es inadecuada a la edad mental de las personas con SXF (Ferrando Lucas MT y cols., 2003).

Desde el punto de vista funcional fallan en la habilidad social para comunicarse, la impulsividad les lleva a no respetar los turnos ni escuchar con atención, la timidez extrema y la evitación de la mirada les convierte en unos interlocutores nada agradables. Además, les cuesta mantener un tema concreto de conversación.

AFECTACIÓN DE LA CONDUCTA SOCIAL:

Muchas publicaciones hablan de la relación del SXF con el autismo (TEA). Se cree que hasta el 30% de los niños con SXF desarrollan comportamientos incluidos dentro del TEA. Es difícil dirimir si algunos comportamientos propios del SXF como la evitación de la mirada o las estereotipias tienen que ver con el desarrollo de TEA. A pesar de estos comportamientos los niños con SXF suelen tener interés por

relacionarse con el entorno y frustración cuando no lo logran. La ansiedad social, su extremada timidez y los problemas de percepción sensorial causan sus problemas de relación con el entorno. Se recomienda realizar estudios genéticos de SXF a niños con autismo, ya que en un 4% de los niños catalogados de TEA se encontrará la mutación (Artigas-Pallares J y Brun Gasca C., 2004)

En los test básicos de screening de autismo un alto porcentaje de niños SXF presentan puntuaciones altas. Varios estudios han intentado comparar grupos con SXF con grupos de TEA y otros trastornos del desarrollo. En estos estudios los niños catalogados de autismo coincidía con pacientes con menor desarrollo del lenguaje, menor CI, dificultad para la imitación y un alto nivel de ansiedad. Esto hace que quizá los criterios clásicos de autismo y los test más habituales fallen al catalogar a estos niños dentro del TEA (García-Nonell E y cols., 2006; Rogers SJ y cols., 2001).

El fenotipo conductual del niño con SXF, como ya hemos comentado, asocia componentes de espectro autístico. Son características las rabietas, y en niños mayores y, sobre todo en niñas, una timidez extrema. Las estereotipias dificultan el juego y las relaciones sociales. Son típicas las estereotipias de aleteo en la infancia y posteriormente fenómenos autolesivos, como rascado o morderse las manos. Ante situaciones nuevas o desconocidas, o ante el enfrentamiento a la mirada del otro se ha podido valorar la actividad simpática con controles de frecuencia cardiaca y tono vagal. Estos estudios demuestran que la base de estos comportamientos es el nivel de ansiedad y no el desinterés social como ocurre en los autistas (Hoeft F y cols., 2010b).

Toleran mal la frustración y son impacientes e impulsivos aunque conscientes de las malas acciones y con sentimiento de arrepentimiento. En la adolescencia y la adultez pueden aparecer conductas agresivas en hasta en el 30% de los varones. Se asocian a

ansiedad aguda o a la hiperexcitación relacionada con la estimulación ambiental. Esto determina que las limitaciones sociales y de relación de estos pacientes tienen su fundamento en la incapacidad de control del estrés y la ansiedad.

2.4. Patrón de herencia del SXF

El SXF se transmite con una herencia dominante y con penetrancia incompleta. Forma parte del grupo de enfermedades causadas por mutaciones en el gen del retraso mental X frágil (*FMR1*), denominadas trastornos asociados al X frágil (TASXF). Engloba al SXF, el síndrome de tremor/ataxia asociado al X frágil (FXTAS) y el síndrome de insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FXPOI) (Rooms L, Kooy RF, 2011).

Presenta el fenómeno de anticipación, que consiste en que la enfermedad puede aparecer dentro de una misma familia con manifestaciones clínicas más severas en las siguientes generaciones y que varones normales pueden ser portadores y transmitir la enfermedad a todas sus hijas que serán portadoras. Estos riesgos estudiados por Sherman aparecen en la figura 1, y a su discrepancia con lo esperado se le denominó "paradoja de Sherman"

Se encontró una nueva forma de mutación en este Síndrome, conocida como mutación dinámica. En la población general se describió una zona polimórfica de repeticiones de tripletes (CGG)_n, y un estadio de premutación inestable en el gen *FMR1*, que se origina cuando en esta zona se encuentra una expansión de 55-200 del triplete CGG_n. Esta zona de repeticiones, debido a la pérdida de tripletes AGG que hay cada 9-11 repeticiones, sufre inestabilidad, con riesgo de cambiar el número de tripletes (CGG)_n al pasar a la siguiente generación familiar, hasta expandirse a tamaños que duplican y hasta quintuplican el número de repeticiones. La prevalencia de portadores de premutación

en la población general es muy alta, una de cada 113-259 mujeres y uno de cada 260-813 varones (Hagerman PJ, 2008). El estado premutado del gen no afecta sustancialmente a la expresión de la proteína FMRP, sin embargo, aumenta la expresión del mRNA que codifica el gen FMR1, lo que en determinadas circunstancias ocasiona la aparición de FXTAS (Tassone F y cols., 2000). La presencia de la premutación en el gen FMR1 no provoca manifestaciones fenotípicas del SXF en los portadores (tanto varones como en mujeres), sin embargo se ha descrito que la expansión de los alelos premutados sólo se produce por vía materna, y la probabilidad de que esto suceda depende de la edad de la madre, del número de las repeticiones y del número de interrupciones AGG presentes en el gen FMR1 con un tamaño de premutación de 55-200 tripletes (CGG) n.

Los alelos premutados suelen expandirse al pasar por la vía materna a su descendencia y si superan las 200 repeticiones de tripletes (CGG)n y se metila la zona de tripletes, el individuo estará afectado por el síndrome, manifestando algún grado de sintomatología. Al existir un estadio de premutación hay una excepción a esta generalidad que son los varones transmisores normales (VTN), que suelen ser los abuelos maternos de estos niños afectados. Los VTN son intelectualmente normales, sin embargo transmitirán el gen FMR1 premutado a todas sus hijas (que correspondería al 50% de la descendencia total) y no suele presentar sintomatología neuropediátrica. Todos los hijos varones de un VTN serán sanos pues del par de cromosomas sexuales heredan el cromosoma Y del padre (Reyniers et al, 1993) Las mujeres portadoras (hijas de un VTN) presentan riesgos diferentes de transmitir la enfermedad a su descendencia de los calculados para una portadora con mutación completa que expresa en algún grado la enfermedad y que recibió el gen de la hija de un VTN (generación III), esto es un ejemplo del fenómeno de anticipación genética, al que nos hemos referido anteriormente (Fu YH y cols., 1991).

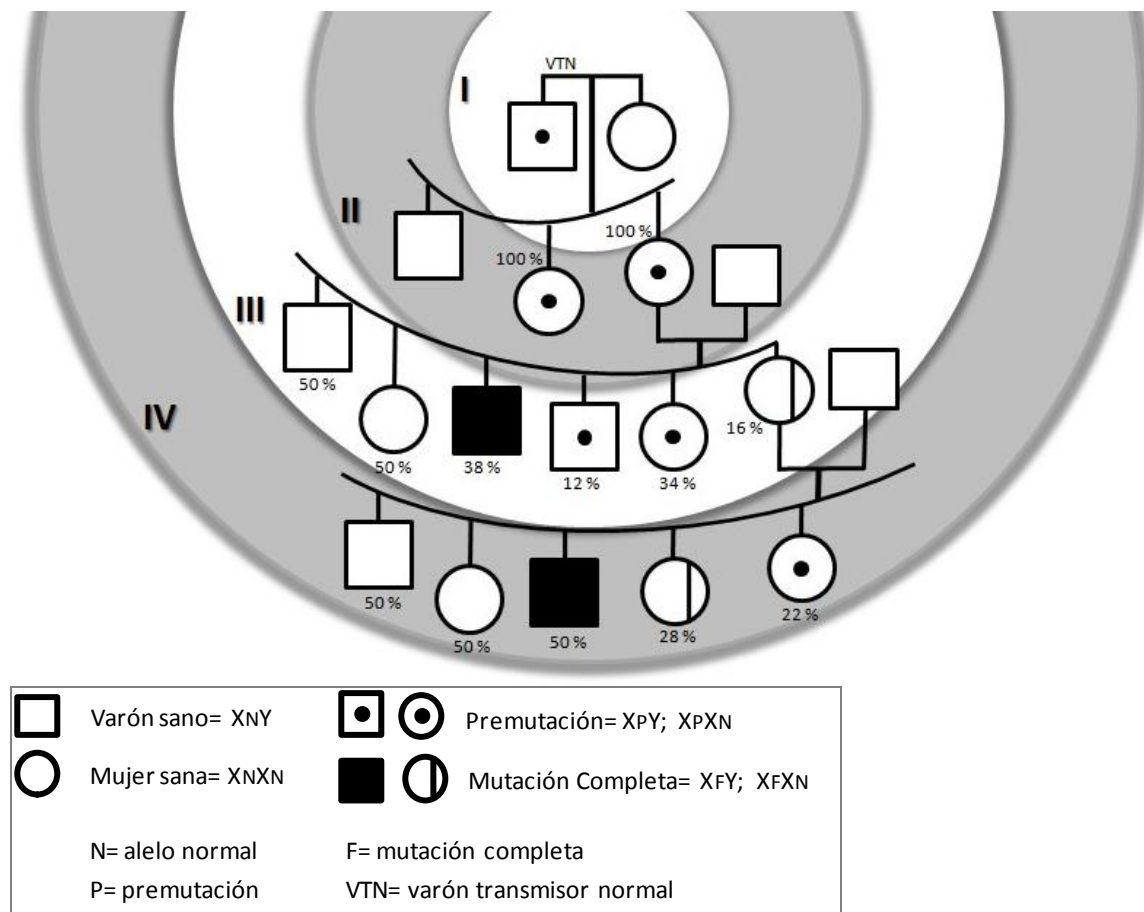


Figura 1: Ejemplo de herencia del SFX. En la figura se aprecia la conocida como “paradoja de Sherman”, fenómeno de anticipación por el que las manifestaciones clínicas pueden ser más severas en las siguientes generaciones y varones sanos (VTN) pueden transmitir el gen mutado a todas sus hijas que serán portadoras

Las mujeres se caracterizan por poseer dos cromosomas sexuales X en cada una de las células de su organismo, siendo portadoras si el gen FMR1 presenta una expansión en el rango de premutación o mutación completa en uno de los dos cromosomas. Las diferencias fenotípicas presentes entre una mujer portadora de una premutación y otra con mutación completa se explica por los distintos niveles de expresión de la proteína (FMRP) y por la inactivación que ocurre normalmente al azar entre el cromosoma X mutado y el normal, en cada célula del organismo. Hay mujeres portadoras normales que no tienen los rasgos característicos del síndrome. Aunque 1/3 de mujeres portadoras de la

mutación completa pueden tener algún grado de DI, en la mayoría de los casos la sintomatología es leve. Excepcionalmente en algunos casos los niveles bajos de FMRP provocan un fenotipo físico y neuropsiquiátrico similar al observado en varones afectados. En las mujeres portadoras la probabilidad de que su descendencia herede el cromosoma alterado es del 50% (Reyniers et al, 1993, Dyer-Friedman J et al, 2002, De Vries BB et al, 1996).

3 - MECANISMOS BIOQUÍMICOS, ANATOMICOS Y GENÉTICOS QUE SUBYACEN AL SÍNDROME

3.1. El gen y la proteína

El SXF es una enfermedad monogénica causada por la mutación de un único gen llamado FMR1, gen de retraso mental ligado al sitio frágil X (del inglés Fragile X Mental Retardation; FMR1), que se localiza en la región de la fragilidad FRAXA situada al final de brazo largo del cromosoma X en la banda q27.3, (Figura 2) lo que da nombre al síndrome (Verkerk AJ y cols., 1991). La mutación responsable de la enfermedad es la expansión de los tripletes CGG en la zona 5' no traducida (UTR) del primer exón del gen FMR1. La expansión de los tripletes CGG por encima de 200 unidades conlleva finalmente la metilación del promotor y la falta de expresión y funcionalidad del gen (mutación completa) (Lim JH y cols., 2005; Pieretti M y cols., 1991; Hansen RS y cols., 1992; Sutcliffe JS y cols., 1992; Verheij C y cols., 1993).

Se asumen varios mecanismos como causa de la expansión de tripletes. Se postula un inadecuado apareamiento de las cadenas de ADN durante la replicación del ADN (Schlötterer C y cols., 1992), o bien durante su reparación (Sinden RR y cols., 2001). La premutación (alelos que contienen entre 50-200 unidades de CGG) es inestable y

puede ser transmitida a la siguiente generación. Solo si lo trasmite la madre esta premutación puede expandirse hasta mutación completa (Devys D y cols., 1993; Feng Y y cols., 1995; Bat O y cols., 1997; Tassone F y cols., 2000).

Existen individuos con células en diferente situación (premutación y mutación completa). Estas variantes se encuentran en el 20-40% de los pacientes varones, y se la denomina "mosaicismo somático" (Nolin SL y cols., 1994; Rousseau F y cols., 1994). En estos pacientes el coeficiente intelectual es similar a un varón con la mutación completa (Devys D y cols., 1993; Rousseau F y cols., 1994). También existen individuos en los que a pesar de presentar la mutación completa no se produce la inactivación total del gen por lo que existe expresión de FMRP. Esto ocurre sobretodo en leucocitos y en estos pacientes el fenotipo es menos severo, se conoce como "mosaicismo de metilación" (Smeets HJ y cols., 1995; Wöhrle D y cols., 1996; Taylor AK y cols., 1999). El nivel de ARNm en estos individuos es significativamente más elevado (Tassone F y cols., 2000). La posible explicación del alto nivel de expresión del ARNm del gen FMR1 podría estar relacionada con un mecanismo compensatorio al existir dificultades en la traducción (Brouwer JR y cols., 2007).

La ausencia de FMRP tiene una relación directa con el grado de severidad de la afectación cognitiva en los individuos SXF. También se relaciona con ella el número de tripletes de CGG y el exceso de producción de ARNm del gen FMR1 en la premutación y en la mutación con metilación parcial (Bailey DB y cols., 2001; Tassone F y cols., 1999).

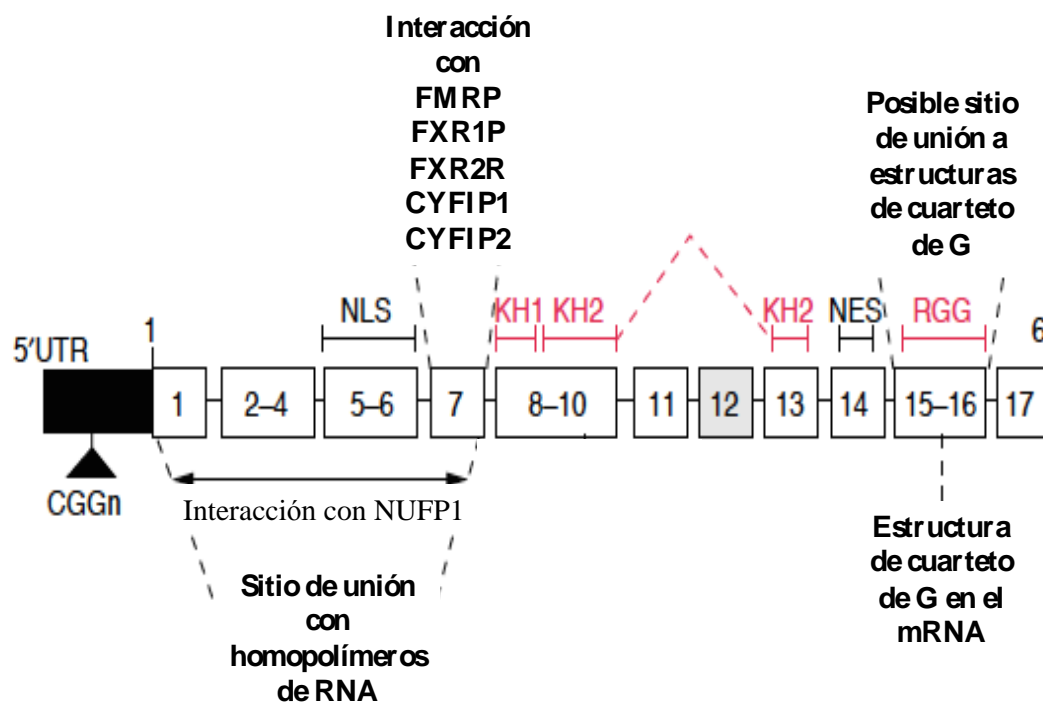


Figura 2. Estructura del gen *FMR1*, sitios de interacción con proteínas y ubicación de los dominios. Se distinguen los dominios KH1 y KH2, con el ajustamiento de los exones 11 y 12. La caja RGG entre los exones 15 y 16, así como los dominios de localización nuclear (NLS) y exportación (NES). Modificada desde Bardoni B y cols, 2002

Conocer estos mecanismos puede servir para buscar alternativas terapéuticas. Se ha demostrado *in vitro* la posibilidad de reactivar el gen *FMR1* desmetilando la mutación completa (Chiurazzi P y cols., 1999). También se estudia cuál es la señal de autorregulación del gen para caracterizarla y ver si se podría influir sobre ella artificialmente, para conseguir transcribir el gen en las células de individuos afectados y obtener así proteína funcional, que pueda evitar la manifestación del síndrome (Tassone F y cols., 2001).

La proteína codificada por el gen *FMR1* se nombra FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) tiene una alta expresión en el cerebro, y está implicada en el transporte y traducción de ARNms, fundamentalmente en la función sináptica (Jin P y Warren ST, 2000).

Se encuentran niveles altos de expresión de FMRP en neuronas del cerebro, en espermatogonias de los testículos, y en el tejido conectivo, particularmente en la capa epidérmica que se encuentra en activa división (Devys D y cols., 1993). Estudios sobre la localización intracelular muestran que FMRP se expresa predominantemente en el citoplasma de las células (Verheij C y cols., 1993; Bakker CE y cols., 2000; De Diego Otero Y y cols., 2000). En pacientes afectados, la ausencia de la proteína se asocia a una morfología anormal de las espinas dendríticas (Hinton VJ y cols., 1991; Rudelli RD y cols., 1985).

El ARNm de FMR1 se expresa en etapas tempranas del desarrollo embrionario. En el ratón adulto se expresa ARNm de FMR1 en el cerebro, testículos, ovarios, timo, esófago y bazo (Hinds HL y cols., 1993). A nivel cerebral se localiza sobre todo en hipocampo, en la corteza cerebral, motoneuronas y células de Purkinje. Dentro del gen FMR1 existen fragmentos que codifican proteínas que tienen relación con el transporte desde el núcleo al citoplasma de ARNm para su traducción (Feng Y y cols., 1997). También se reconocen fragmentos que tienen una función en el crecimiento sináptico y en la maduración, incluyendo NAP-22, que está presente en los terminales axónicos y en espinas dendríticas. Otras, incluyendo MAP1B, una proteína asociada a microtubulos, tienen una función en el transporte dentro de neuronas (de Diego Otero Y y cols. 2002, Zhang J y cols., 2001). FMRP también puede suprimir la traducción de ARNm en ensayos in vitro. Esto sugiere que FMRP puede modular la traducción y/o la estabilidad del ARNm (Laggerbauer B y cols., 2001; Li Z y cols., 2001).

Han sido identificados dos genes homólogos al gen FMR1, FXR1 que se localiza en el cromosoma 3q28 (Coy JF y cols., 1995) y FXR2 en el cromosoma 17q13.1 (Zhang J y cols., 1995) (en inglés: Fragile X Retardation gene 1 and 2). Juntas, estas tres proteínas forman una pequeña familia de proteínas relacionadas al X frágil (FXR) (Kirkpatrick LL y cols., 2001). Ambas contienen fragmentos con función y un

patrón de distribución en los tejidos similar, con un 98% de homología, lo que podría conllevar una posible compensación de función (Eberhart DE y cols., 1996; Tamanini F y cols., 2000; Ramos A y cols., 2006).

3.2. Alteraciones bioquímicas

La proteína FMRP, deficiente o ausente por completo en los pacientes con SXF, está involucrada en la regulación de la estabilidad del RNA, el transporte subcelular y la traducción de mRNAs neurales que codifican proteínas involucradas en el desarrollo de la sinapsis, la plasticidad neuronal y el desarrollo cerebral (Sidorov MS y cols., 2013; Brown V y cols., 2001; Chen E y cols., 2003).

En varias publicaciones se observa la asociación de la falta de FMRP con alteraciones de muchos mRNAs neurales. Esto provoca un aumento de las dismorfogénesis espinal y función alterada a nivel de la sinapsis con desequilibrio entre la excitación y la inhibición, por desaparición o sobreexpresión de receptores Glutamato/GABA (Gatto CL y cols., 2010). Estas alteraciones condicionan el fenotipo conductual de los pacientes con SXF. El déficit de FMRP que existe en la enfermedad provocaría alteraciones en la maduración de las sinapsis, con aumento de la densidad de espinas dendríticas de morfología inmadura. De este modo existe un exceso de conexiones sinápticas y, además, estas sinapsis no alcanzan un adecuado estado de madurez. Se afectará por tanto la poda sináptica y la selección de conexiones útiles. Ésta puede ser la base de la fisiopatología del fenotipo cognitivo conductual en el SXF (He CX y cols., 2013). Aunque algunos artículos demuestran como muchos de los genes cuya transcripción podría estar regulada por FMRP están también alterados en pacientes con trastorno del espectro autista (Iossifov I y cols., 2012).

La ausencia de FMRP produce una disregulación de múltiples sistemas de neurotransmisores y se aumenta la producción de proteína ineficaz

en el hipocampo y en todo el cerebro en general (Bagni M y cols., 2012).

Dentro de la etiopatogenia del SXF se ha propuesto el exceso de señal del receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) como responsable de parte de los síntomas neurológicos y psiquiátricos, incluyendo el déficit cognitivo, las convulsiones, ansiedad, estereotipias, y los problemas para la relación social. En ensayos experimentales en ratón Fmr1-KO (manipulados genéticamente para anular el gen y presentar fenotipo similar a los afectos de SXF) se ha comprobado que la reducción de la expresión de mGluR5 reducía la mayoría de la sintomatología evidenciada en estos animales de experimentación. En las necropsias se encontraron diferencias con el grupo control en aspectos como la densidad de espinas dendríticas en neuronas de la corteza piramidal, aunque otros rasgos como el macroorquidismo no se modificaron. Los resultados obtenidos con el uso de antagonistas de mGluR5 en modelos animales de SXF apoyan aún más esta teoría (Nakamoto M y cols., 2007).

Otras teorías implican la vía del glutamato en relación con los receptores de tipo AMPA (Pop AS y cols 2014.) por menor presencia en tejido nervioso de estos receptores. También parece haber posibilidad de disregulación del sistema gabaérgico (GABA) (Berry-Kravis EM, 2012).

Incluso el sistema endocannabinoide parece sufrir alteraciones (Tang AH y cols., 2015). Mediante aproximaciones farmacológicas y genéticas, se ha observado que el bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 normaliza el déficit cognitivo, la falta de sensibilización ante estímulos dolorosos y la susceptibilidad a padecer crisis epilépticas que aparecen en el modelo murino de SXF. Estas mejoras a nivel conductual fueron acompañadas de cambios a nivel bioquímico en la vía de señalización intracelular mTOR, clave en el procesamiento cognitivo, así como en la regularización de la densidad

y madurez de las espinas dendríticas neuronales. Por otro lado, el bloqueo farmacológico de receptores cannabinoides CB2 normalizó el fenotipo de ansiedad reducida que presentan los ratones con este síndrome.

Por otro lado, al parecer, la FMRP participa en la regulación de la estimulación sináptica por lo tanto, al estar ausente esta proteína en SXF habría una sobreproducción de la metalopeptidasa 9 (MMP9) en respuesta a la estimulación sináptica normal, lo que se asocia con varias condiciones patológicas, particularmente convulsiones y accidentes cerebro-vasculares. También parece asociarse con cambios sinápticos en relación con el aprendizaje y la memoria (Dziembowska M y cols., 2012).

3.3 Activación del eje HPA y estrés oxidativo

La disminución de la proteína FMRP parece estar relacionada también con una expresión más pobre de otras sustancias, especialmente las asociadas con la función Redox celular (el Bekay R y cols., 2007). Las consecuencias de una alteración del eje HPA pueden justificar parte del fenotipo conductual del SXF como la inadecuada respuesta al estrés ambiental y psíquico. En modelos animales *Fmr1-KO* se observan exceso de radicales libres dependientes de NADPH-oxidasa y estrés oxidativo elevado a nivel del SNC. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con la hiperactividad, el trastorno ansioso y el déficit cognitivo (De Diego-Otero Y y cols., 2009).

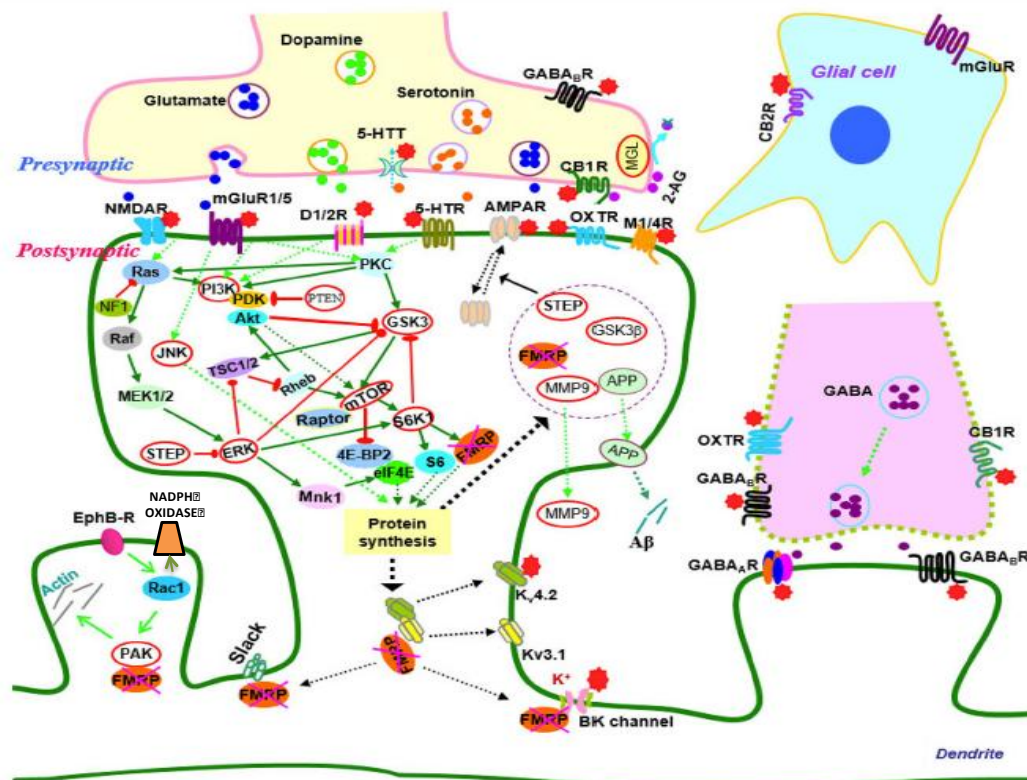


Figura 3. Interacciones de la proteína FMRP dentro de la neurona. Se puede ver que FMRP está regulada por Rac1 que a su vez regula a la producción de radicales libres desde la NADPH oxidasa. (Wang H y cols., 2015)

4. ENSAYOS EXPERIMENTALES DE TRATAMIENTO PARA SXF

Actualmente, el tratamiento farmacológico usado para SXF es únicamente sintomático y además tiene efectos limitados sobre los síntomas observados en los pacientes. Estimulantes del sistema nervioso central, como metilfenidato, se utilizan para tratar la hiperactividad. Fármacos antipsicóticos, como la risperidona, para tratar el comportamiento agresivo. Varios fármacos, sobretodo benzodiacepinas, han sido utilizados para tratar la ansiedad. Cuando aparecen comorbilidades como epilepsia se han prescrito fármacos anticonvulsivantes. Algunos fármacos, como la clonidina o los inhibidores de la recaptación de serotonina, se emplean con éxito en cohortes de niños con SXF para tratamiento de la ansiedad o el

trastorno comportamental (Berry-Kravis E y Potanos K, 2004). En general, se utilizan combinaciones de fármacos o drogas para tratar los síntomas clínicos, y no existen fármacos específicos que prevengan la aparición de estos. Todos estos tratamientos además, asocian efectos secundarios múltiples muchos de ellos neurológicos.

Los primeros intentos de tratamiento farmacológico buscando dianas terapéuticas en SXF fueron con ácido fólico, por asociación con la fragilidad del cromosoma X en medios pobres en este sustrato. Hoy en día se sabe que el efecto beneficioso que pudo aportar se asocia más a su mediación en la síntesis de neurotransmisores que en un efecto sobre la etiopatogenia (Sutherland GR y cols., 1977).

El conocimiento que se está adquiriendo gracias a los avances en genética y al estudio de la base fisiopatológica del síndrome ha permitido comenzar a probar nuevas dianas terapéuticas y nuevos tratamientos experimentales. El hecho de que la mutación fuera descrita en 1991, y que el modelo de ratón Fmr1-KO se desarrolló muy pronto han convertido el SXF en líder en la búsqueda de tratamientos para los trastornos del desarrollo neurológico (Hagerman RJ y cols., 2014).

Actualmente no existe tratamiento curativo de la enfermedad. El diagnóstico precoz, el seguimiento médico adecuado y la intervención psicológica y social permitirán mejorar la vida de los pacientes y sus familias. Se benefician de terapia ocupacional y con la implantación de técnicas específicas tanto en el ambiente escolar como en el familiar (Dyer-Friedman J y cols., 2002).

A pesar de ello, las alteraciones del comportamiento y los problemas de socialización y escolares están presentes en casi todos los afectados. Existen bastantes ensayos clínicos en animales pero pocos han sido aplicados a humanos y en menos aún se ha comprobado eficacia de manera concluyente. Estas investigaciones han tenido diferentes enfoques según sus objetivos, ya sea la restauración de la

función del gen FMR1 o el tratamiento de los síntomas asociados a esta enfermedad (Saldarriaga W y cols., 2014). Comentamos a continuación los enfoques más prometedores encontrados a través de una revisión de la literatura científica (figura 4).

Antagonistas de los receptores de mGluR5

El clorhidrato de piridina 2-metil-6-feniletinil (MPEP) es un antagonista potente y altamente selectivo de los receptores de mGluR5. MPEP es tóxico para los seres humanos, por lo que otros antagonistas del mGluR5, tales como fenobam y mavoglurant (AFQ056), han sido estudiados en SXF.

En modelos animales, se han realizado estudios con antagonistas mGluR5: MPEP, fenobam, AFQ056 (Mavoglurant; Novartis pharmaceuticals), y RO491756 (Basimglurant; HoffmanLaRoche pharmaceuticals) (Pop AS y cols., 2014). En animales se ha evidenciado una mejoría de la morfología de las espinas dendríticas, de la síntesis proteica, de la atrofia en el hipocampo, y parcialmente, del macroorquidismo. Sin embargo no se han obtenido efectos beneficiosos en ensayos con humanos y la investigación prácticamente se ha detenido en 2014.

En un ensayo de dosis única en 12 adultos con SXF, Fenobam se mostró como un fármaco seguro, sin efectos secundarios importantes. Se apreciaron mejoras en la hiperactividad y la ansiedad, y el 50% mostró al menos una mejora del 20% en la inhibición prepulso (Berry-Kravis E y cols., 2009). En un reciente estudio aleatorizado, doble ciego, comparado con placebo y cruzado de 30 participantes masculinos SXF entre 18-35 años, se intentó valorar si un inhibidor selectivo de un subtipo de receptor de mGluR5, AFQ056, mejoraba los síntomas conductuales de SXF. Los resultados no indican efectos significativos al valorar los datos del listado de conductas aberrantes (ABC-C; Aman y cols, 1995). Sorprendentemente 7 participantes con

metilación completa del promotor FMR1 y sin mRNA FMR1 detectable, presentaron mejoría significativa tras el tratamiento sobre los tratados con placebo ($p < 0,001$). 24 de los 30 participantes presentaron efectos adversos, en su mayoría leves. Los problemas iban desde dolor de cabeza a astenia de moderada a intensa (Jacquemont S y cols., 2011). Los resultados de la fase III del ensayo con AFQ056 no han demostrado la eficacia esperada por lo que la línea de desarrollo se ha cerrado para esta patología.

Reactivación Genética

Uno de los grandes intereses de estudio y diana farmacológica para el tratamiento de SXF es restaurar la actividad del gen FMR1, disminuyendo la metilación del ADN y alterando la acetilación de las histonas H3 y H4. El uso del fármaco 5-azadC (inhibidor de metiltransferasas), en conjunto con inhibidores de deacetilasas de histonas (como TSA, butirato y 4-fenilbutirato) han probado actuar sinérgicamente para este fin. Ambos fármacos se han utilizado únicamente *in vitro*, esto debido a que *in vivo* existe riesgo potencial de inducir apoptosis celular (Bagni C y cols., 2012).

Memantina

Otro estudio experimental realizado en afectados por el síndrome fue examinar la eficacia del tratamiento crónico con memantina en la mejora del funcionamiento cognitivo y el comportamiento. Esta sustancia actúa como antagonista de los receptores inotrópicos de glutamato (NMDA). Las pruebas realizadas en este estudio no muestran mejoras significativas en el comportamiento y la memoria de estos pacientes (Erickson CA y cols., 2009).

Litio

El litio también es un excelente estabilizador del ánimo en SXF. Se realizó un ensayo piloto para evaluar la seguridad y eficacia del litio en pacientes con SXF. Se sabe que el litio participa en la regulación de la traducción del mGluR activado y logra revertir en ratones la sintomatología. Los resultados indicaron que el litio es bien tolerado y proporciona beneficios funcionales en SXF, posiblemente modificando el defecto neural subyacente (Berry-Kravis E y cols., 2008).

Minociclina

Es un antibiótico usado para control del acné en adolescentes. Su uso en el SXF se asocia a su capacidad para bajar los niveles de MMP9 que están elevados en estos pacientes (Dziembowska M y cols., 2013). Un ensayo clínico controlado demostró la eficacia de la minociclina (dosis de 25 a 100 mg por día) en la mejora del comportamiento, el ánimo y la ansiedad de los niños entre 3.5 a 16 años (Leigh MJ y cols., 2013)

Los mejores efectos se observaron al aplicarlo a individuos más jóvenes. Los efectos secundarios del tratamiento son conocidos y no muy graves, excepto en relación con elevación de anticuerpos antinucleares (ANA).

Lovastatina

Es un inhibidor de la HMG-coA reductasa que se usa para la hipercolesterolemia. Su efecto parece asociarse a la corrección de la excesiva actividad del gen RAS en el ratón Fmr1-KO, así como actuar de antagonista de los receptores de mGluR5 y la actividad extracelular excesiva de otras proteínas en las neuronas hipocámpales del ratón Fmr1-KO. Estos resultados están estimulando los ensayos en humanos, hay un ensayo en Canadá que parece tener resultados positivos a través de esta vía terapéutica (Osterweil EK y cols., 2013).

Sertralina

El uso de la sertralina en SXF es un tema de investigación muy actual. Algunos artículos han descrito su efecto positivo sobre el desarrollo del lenguaje en niños de 2 a 6 años con SXF. (Indah Winarni T y cols., 2015). No obstante, en un 20% de los casos los ISRS pueden empeorar la agresividad de los pacientes debido a hiperactivación, especialmente si la dosis es alta. De manera que si se desarrolla agresividad en estos pacientes secundario al uso de ISRS, la dosis debe ser disminuida o discontinuada y reemplazado por un estabilizador del ánimo como aripiprazol o risperidona.

Acamprosato

Es un agonista GABA_A aprobado por la FDA para el control de la abstinencia en adultos con dependencia alcohólica. Parece también tener efecto antagonista sobre los receptores m GluR5 (Kiefer F y cols., 2010). En pequeños ensayos se comprobó una inesperada respuesta en el lenguaje. En niños se ha ensayado en 12 pacientes con SXF (6-17 años) 9/12 mostraron una importante mejoría en los resultados de CGI-1 y en escalas que valoraron la hiperactividad. (Erickson CA y cols., 2013)

También mostraron la elevación de biomarcadores cerebrales que están bajos en SXF (factor neurotrópico cerebral) pero no hubo correlación entre esta elevación y mejoría de las evaluaciones (Erickson CA y cols., 2013). Actualmente se está llevando a cabo un ensayo multicéntrico controlado con este fármaco.

Cannabinoides

Mediante la administración de rimonabant, un antagonista/agonista inverso del receptor cannabinoide CB1 en ratones Fmr1-KO, se modularon fenotipos conductuales característicos como el déficit cognitivo, la sensibilidad reducida al dolor o, a nivel neuroanatómico,

la anomalía en las espinas dendríticas (Busquets-García A y cols., 2013).

Omega 3 y otros compuestos dietéticos

En ratones Fmr1-KO se han probado antioxidantes como la vitamina E, N acetil cisteína (NAC) o la melatonina. También hay ensayos con ácidos grasos de cadena larga (PUFAs u omega 3). En algunos casos podrían mejorar algunos de las anomalías fenotípicas. La dieta enriquecida con PUFA en los ratones Fmr1-KO llevo a la mejora de la relación con las hembras, también en el autocuidado, cambios en niveles de citoquinas y la normalización del déficit de proteínas como el factor neurotrófico derivado del cerebro o FNDC que se aprecia en el giro dentado de los ratones con Fmr1-KO, en comparación con los controles. Estas medicaciones tienen la ventaja de que son fáciles de recomendar, al ser bastante inocuas en cuanto a efectos adversos. Aunque algunos de los estudios no están completos y no hay evidencias en humanos (Pietropaolo S y cols., 2014).

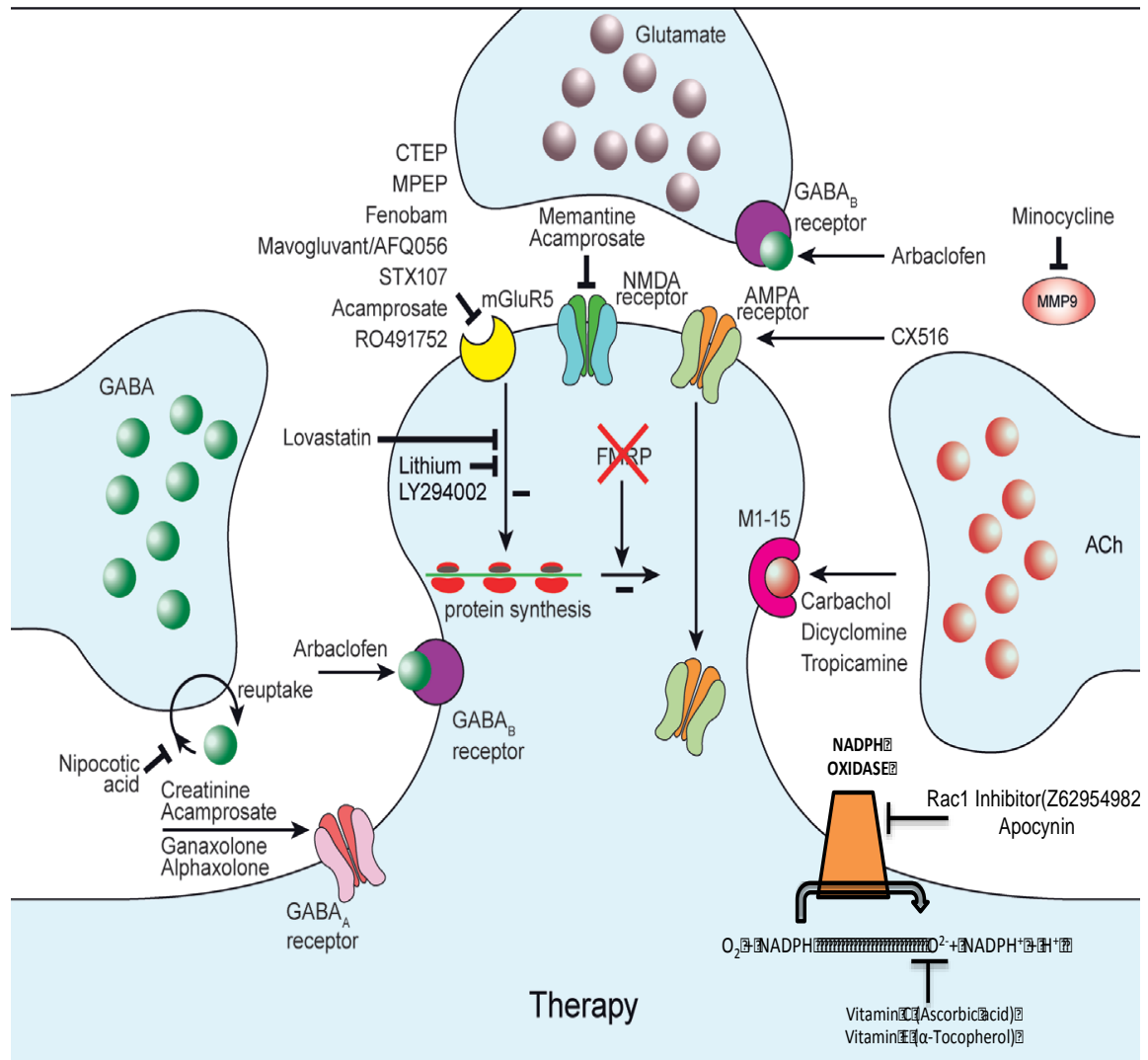


Figura 4: Diferentes dianas terapéuticas propuestas para SxF.

5- NUEVA DIANA TERAPÉUTICA: NORMALIZAR EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO TRATAMIENTO EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

5.1 Concepto de estrés oxidativo

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones asociado a otro de captación que llamamos reducción. El metabolismo celular conlleva la oxidación y reducción de numerosas moléculas presentes en las células. Esta oxidación es fundamental para la vida pues participa en los procesos de obtención de la energía celular. También tiene un papel en otros procesos fisiológicos en el ser humano, como la regulación metabólica, la activación e inactivación de biomoléculas, la transducción de señales celulares, la obtención de energía, etc.

Durante estos procesos se generan moléculas con electrones desapareados, denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) o radicales libres, que son especies químicas con una alta reactividad y poder oxidante. En ocasiones se produce un desequilibrio a favor de los procesos de oxidación; este desequilibrio ocurre por un excesiva presencia de especies prooxidantes, por la disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes o por ambas causas. Estas sustancias (ROS) son capaces de generar daño celular, y han sido asociadas a procesos fisiológicos como el envejecimiento, y también a diferentes patologías como aterosclerosis, cáncer, enfermedades inflamatorias, neuro degenerativas, y otras patologías. El metabolismo aeróbico conlleva hasta un 10% de reducción ineficiente del oxígeno, lo que implica que hasta en sujetos sanos haya un riesgo de exposición a la acción perniciosa de estos elementos.

5.2 Estrés oxidativo en el sistema nervioso central

El SNC es muy sensible al estrés oxidativo debido a su anatomía específica y fisiología característica. A pesar de representar solo el 2 % del peso corporal, consume una quinta parte del oxígeno total y es rico en ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs), que son particularmente susceptibles al daño por ROS (Halliwell B, 2006). Radicales libres relacionados con el oxígeno y el nitrógeno (ROS y RONS) están involucrados en la regulación redox de varias funciones de las proteínas a nivel cerebral, tales como transportadores de glutamato y receptores de neurotransmisores. Si su regulación no está bien controlada a largo plazo da lugar a procesos de excitotoxicidad que puede dañar indiscriminadamente la integridad estructural y funcional del cerebro.

Sabemos que el estrés metabólico agudo aumenta la producción de glucocorticoides y la activación del eje adrenal. Esta actividad a nivel de hipocampo y de otras estructuras cerebrales puede modificar la creación de recuerdos, la respuesta adecuada a un evento y la adaptación. En el estrés crónico se generan niveles elevados de glucocorticoides de manera mantenida y exceso de proteínas excitatorias. Si esta situación se prolonga en el tiempo llega a alterar la función y la estructura hipocampal, especialmente por el efecto sobre los receptores de glucocorticoides y el glutamato, que deprimen funciones fisiológicas como la potenciación sináptica a largo plazo y su interacción con otras áreas cerebrales. Estas acciones son vitales en el proceso de consolidar y evocar un evento. Dicho de otra manera, el estrés crónico altera el eje HPA porque aumenta su funcionamiento basal. Esta activación podría implicar la participación de ROS y aumento de estrés oxidativo (McEwen BS y cols., 1997; El Bekay R y cols. 2007).

Es bien sabido que la regulación redox está involucrada en muchos mecanismos celulares importantes en las neuronas, astrocitos y microglía. Promueve la activación de la proteinkinasa que activa la mitogénesis (MAPK), la liberación de Ca^{2+} y la puesta en marcha de procesos de apoptosis (Marshall CJ, 1995; Rosen LB y cols., 1994). ROS producidos por proteínas mitocondriales o de membrana (tales como NADPH oxidasa activada por Rac1) tienen un papel en la plasticidad fisiológica y pueden ser necesarios para las funciones cognitivas normales (Kishida KT y cols, 2007).

El contenido en elementos antioxidantes a nivel cerebral es más bajo que en otros órganos. Un antioxidante endógeno producido en la glándula pineal, la melatonina (N acetyl-5-methoxytryptamine), es un potente agente contra las ROS, pero su concentración disminuye marcadamente con la edad, lo cual podría ser de especial interés en el envejecimiento del SNC (Reiter RJ y cols., 1998).

Otro mecanismo mediante el cual las células se protegen de la oxidación es la activación del sistema glutatión (GSH). El glutatión se sintetiza a partir de aminoácidos L-cisteína, L -glutámico y glicina. El glutatión desempeña un papel crítico a nivel cerebral teniendo múltiples funciones:

- Es el mayor antioxidante endógeno. Participa directamente en la neutralización de radicales libres y otros tóxicos. Además participa en el mantenimiento de los antioxidantes exógenos, como las vitaminas C y E en sus formas reducidas (activas).
- Participa como cofactor de múltiples reacciones en el sistema inmune, así como neuromodulador al influir en el glutamato extracelular y con ello en la sobreactivación de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Janaky R y cols., 1999).
- Es una forma de almacenamiento de cisteína. El componente sulfhidrilo de la cisteína es donador de electrones y responsable de la actividad biológica del glutatión.

La cisteína es poco abundante en los alimentos por lo que su aporte es limitante para la síntesis de glutatión dentro de las neuronas. La mayor captación neuronal de cisteína está mediada por un sistema de transportadores de aminoácidos dependiente de sodio, conocido como portador de aminoácido excitador 1 (EAAT). El estado redox influye notablemente en la función de este transportador. El sistema glutatión (GSH) también sirve como depósito endógeno de óxido nítrico para formar glutatión S-nitroso (GSNO). GSNO puede liberar NO en determinadas condiciones con efecto tampón de reacciones redox. Además tiene un efecto protector en el cerebro en condiciones de estrés oxidativo (Rauhala P y cols., 1998). Colabora en la proliferación celular y la diferenciación neuronal (Poot M y cols., 1995).

El estrés oxidativo *per se* puede activar los genes que codifican las enzimas de factores de defensa o de transcripción antioxidantes (Factor nuclear kappa B, proteína activadora 1 y factor nuclear de células T activadas) y muchas otras proteínas estructurales. El aumento de Ca^{2+} en las neuronas puede activar otras enzimas, incluyendo la proteína quinasa C (PKC), la fosfatasa, fosfolipasa, la óxido nítrico sintasa neuronal, y la xantina oxidasa (Rosen LB y cols., 1997; Kishida KT y cols, 2007).

La normalización de estrés oxidativo puede representar una nueva diana experimental en el tratamiento de trastornos causados por la producción excesiva de radicales libres. El estrés oxidativo como factor patogénico se ha encontrado en múltiples trastornos neurológicos, incluyendo epilepsia, enfermedad de Parkinson, síndrome de Down, síndrome de Rett, autismo y la enfermedad de Alzheimer (Sultana R y cols., 2006). En ensayos clínicos se ha demostrado que el daño neuronal debido a estrés oxidativo y/o estados hiperadrenérgicos se puede prevenir mediante el tratamiento con compuestos que captan radicales libres o prevengan su producción. Esta terapia neuro-protectora impide daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas

(Sano M y cols 1997; Di Matteo V y cols., 2003). En otros procesos como el déficit de atención con hiperactividad (TDHA) o el trastorno del espectro autista (TEA) se han evidenciado déficits de ciertos nutrientes que tienen una función antioxidante. Múltiples tratamientos con dietas ricas en minerales, vitaminas, ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6, bioflavonoides y fosfatidilserina se han postulado como beneficiosos para estos pacientes. Aunque no existen muchos ensayos clínicos correctamente sistematizados que permitan hacer recomendaciones específicas en estos casos.

5.3 Radicales libres y sistemas de protección

Algunas fuentes endógenas de Radicales Libres del oxígeno (ROS) son la cadena respiratoria, enzimas antioxidantes y las células fagocíticas (como los neutrófilos) (Figura 5). Además algunos alimentos, la contaminación ambiental, la luz ultravioleta y algunas drogas pueden actuar como fuentes exógenas de ROS. La mitocondria es la fuente intracelular más importante de formación de ROS. Estas especies reactivas son consideradas generalmente citotóxicos, porque pueden causar daño oxidativo a los distintos componentes celulares (lípidos, proteínas, ADN). Sin embargo, a bajas concentraciones los ROS pueden funcionar como mediadores fisiológicos de las respuestas celulares (Forman y cols., 2002), actuando como segundos mensajeros naturales en algunas vías de señalización.

Las células poseen mecanismos intrínsecos para controlar que los niveles de especies reactivas de oxígeno se encuentren en homeostasis o equilibrio. Estos mecanismos de control son la presencia de pequeñas moléculas antioxidantes o enzimas que eliminan a los ROS. Los sistemas antioxidantes del organismo se dividen en sistemas enzimáticos, constituidos por enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa. Y sistemas no-

enzimáticos, constituidos principalmente por la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A, carotenoides (β -caroteno y licopeno), flavonoides, metales de transición (Se, Zn, Mn, Cu, Fe), glucosa, urato, glutatión reducido, bilirrubina y proteínas como albúmina, ceruloplasmina, ferritina y lactoferrina.

$2 O_2^- + 2 H^+ \square$	$H_2O_2 + O_2$	SUPERÓXIDO DISMUTASA
$H_2O_2 \square$	$2 H_2O + O_2$	CATALASA
$H_2O_2 + 2GSH \square$	$GS-SG + 2H_2O$	GLUTATIÓN PEROXIDASA
$GSSG + NADPH + H^+ \square$	$2GSH + NADP^+$	GLUTATIÓN REDUCTASA

Tabla 2: Mecanismos de defensa antioxidante endógena.

La enzima SOD del complejo superóxido dismutasa cataliza el paso del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, y la glutatión peroxidasa rompe el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno durante la conversión del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) (Reiter RJ y cols., 1998). La catalasa es capaz de romper también el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. Contienen un grupo ferrohemo. Generalmente están localizadas en los peroxisomas, aunque también se pueden encontrar en el citoplasma y mitocondrias. La actividad de las catalasas es mayor cuanto más cantidad de peróxido de hidrógeno existe en las células (Gandhi S y Abramov AY, 2012). El glutatión se genera a partir de los aminoácidos glutamato, glicina y cisteína, siendo un antioxidante y agente reductor que reacciona directamente con los radicales libres. El glutatión reducido (GSH) es el principal antioxidante intracelular y la transformación del GSSG a GSH se realiza a través de la enzima glutatión reductasa, dependiente de la co-enzima nicotín adenín dinucleótido fosfato, forma reducida

(NADPH).(Tabla 2) Cuando existe un desequilibrio entre los ROS y los sistemas de defensa antioxidantes, formándose un exceso de radicales libres, se alcanza un estado de estrés oxidativo, que es característico en algunas patologías, como el SXF (El Bekay R y cols., 2007). Los pacientes afectados por el síndrome muestran un aumento de la actividad adrenocortical y esto altera el eje HPA (Hessl D y cols., 2002). Un exceso de hormonas adrenales está involucrado en la inducción del estrés oxidativo en el cerebro.

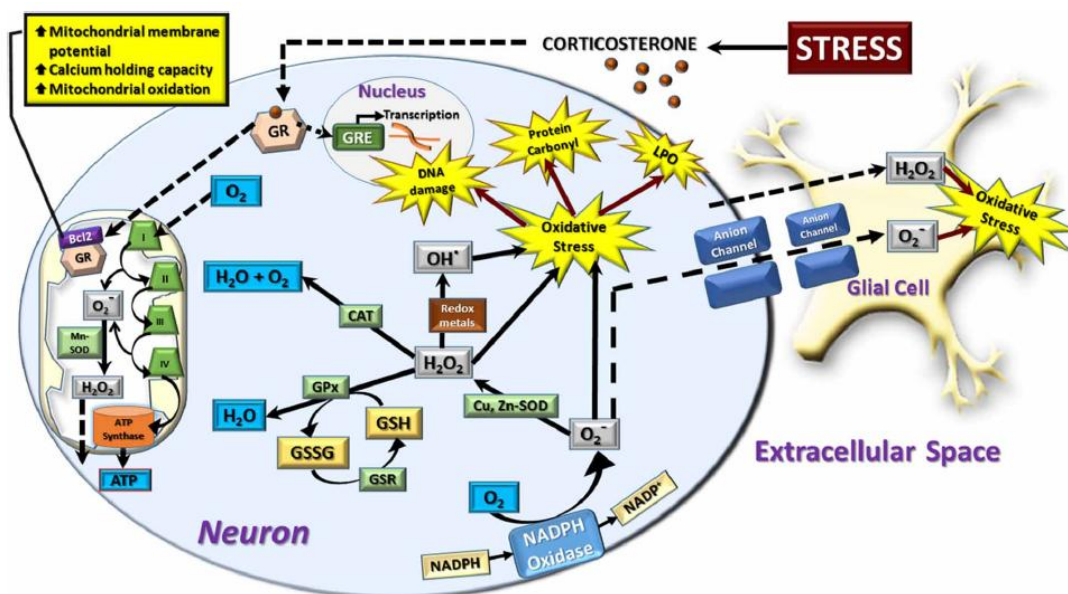


Figura 5. Resumen de la producción de ROS en las neuronas. Las fuentes de ROS son muy diversas en las neuronas y su sobreproducción puede tener un efecto negativo sobre las células, siendo sobre esta vía sobre lo que vamos a actuar para regular la sintomatología.

5.4 Estrés oxidativo en sxf

En el modelo de ratón Fmr1-KO se han encontrado alteraciones en los niveles de expresión de proteínas que participan en el sistema redox de las células nerviosas, como la superóxido dismutasa SOD, la transferasa del glutatión, así como la esteroil coenzima A desaturasa (Miyashiro y cols., 2003). Estos cambios podrían indicar un mecanismo Redox alterado a nivel de gasto del glutatión. El consumo de

antioxidantes es más alto en estos ratones Fmr1-KO, lo que junto a los altos niveles de radicales libres y proteínas oxidadas indicaría un estado de mayor estrés oxidativo. En humanos se observa que los pacientes afectados por el síndrome muestran un aumento de la actividad adrenocortical y esto altera el eje HPA (de Diego Otero Y y cols, 2000; Hessler D y cols., 2002, Hessler D y cols. 2006). El exceso de activación del eje HPA y el aumento de hormonas adrenales está involucrado en la inducción de estrés cerebral, resultando en oxidación de moléculas y gasto de antioxidante tales como el glutatión (Herman JP y Cullinan WE, 1997). El desequilibrio entre la formación y neutralización de ROS produce una desregulación en la fisiología celular, y por tanto, aumento del estrés oxidativo, que probablemente participa en la patogénesis y/o fisiopatología de la enfermedad.

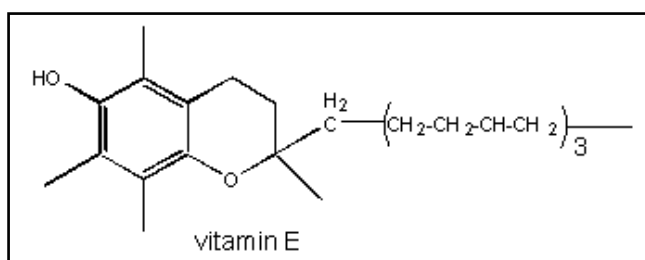
Se han evidenciado anomalías en la secreción de glucocorticoides y catecolaminas en personas con SXF y en el modelo de ratón Fmr1-KO (Markham JA y cols., 2006). Los datos indican una activación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y altos niveles de producción de radicales libres en el cerebro de ratón Fmr1-KO (el Bekay R y cols., 2007). El nivel de glutatión (GSH) también se encuentra reducido en el cerebro del ratón. La disregulación redox a nivel del SNC altera comportamientos relacionados con la emoción, pero deja las habilidades espaciales intactas. Por lo tanto, un déficit de GSH puede afectar a la integridad y la sincronía neuronal en una región y en un periodo de tiempo de una forma específica, dando lugar a fenotipos conductuales relacionados con los trastornos psiquiátricos (Steullet P y cols., 2010). Estos ratones Fmr1-KO presentan una respuesta conductual anómala, mostrando elevados niveles de ansiedad ante eventos no muy estresantes (Eadie BD y cols., 2009; McNaughton CH y cols., 2008). De hecho en estos animales se ha evidenciado una elevación prolongada en los niveles de corticoides tras la exposición a estrés (Lauterborn JC, 2004; Markham JA et al., 2006). Este estrés mantenido puede alterar la función cognitiva y el

aprendizaje en los modelos animales comprobándose alteraciones en la plasticidad sináptica a nivel del hipocampo, que es especialmente vulnerable al efecto del estrés (Kim JJ y Diamond DM , 2002; Ghilan M y cols., 2015). En este sentido se han llevado a cabo estudios preclínicos usando antioxidantes como α -tocoferol o melatonina. La administración crónica de antioxidantes hacen que se reviertan ciertas características fenotípicas del ratón con SXF (De Diego-Otero Y y cols., 2009; Romero-Zerbo y cols, 2009).

5.5 Compuestos reguladores del estrés oxidativo con posible uso en ensayos clínicos

Vitamina E (Tocoferol)

La Vitamina E (α -Tocoferol) es un antioxidante liposoluble no enzimático, que puede funcionar como un indicador del estado



oxidativo celular (Kontush y cols., 2004). Limita la propagación de la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos. Se dispone en la

parte lipídica de las membranas biológicas y protege los fosfolípidos de las mismas del ataque de los radicales libres. Su acción consiste en secuestrar los radicales libres reduciéndolos a metabolitos menos activos. Es el antioxidante lipofílico principal del cerebro, donde los niveles de lípidos son elevados. También muestra una protección significativa contra la citotoxicidad inducida por la disminución del glutatión intracelular (Osakada F y cols., 2003). Forma parte de un conjunto de factores del sistema de defensa antioxidante celular. Este sistema incluye enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa, etc y otros factores no enzimáticos como el ácido úrico o el glutatión. Su uso en el tratamiento de enfermedades

relacionadas con el estrés oxidativo, tales como la enfermedad de Alzheimer, o la enfermedad de Parkinson (Sano M y cols., 1997; Fariss MW y cols., 2003) ha mostrado que es capaz de retrasar el deterioro mental asociado. En relación con el Alzheimer precoz observable en SXF, parece reducir el depósito amiloide en los modelos de ratón Fmr1-KO (Sung y cols., 2004). Los niveles de vitamina E en líquido cefalorraquídeo están disminuidos en pacientes que sufren enfermedad de Alzheimer y estos niveles se ven incrementados en pacientes suplementados con vitamina E.

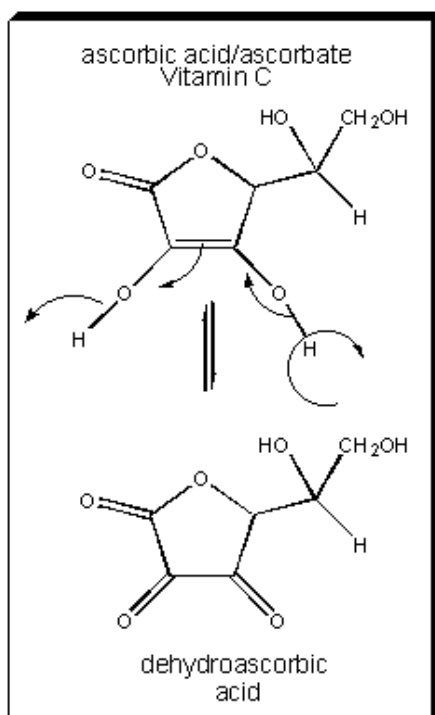
La vitamina E está implicada en la función inmunológica, la transmisión intracelular de señales, la regulación de la expresión de los genes y otros procesos metabólicos. Así, el α -tocoferol inhibe la actividad de la proteína quinasa C, una enzima que modula la proliferación celular y la diferenciación en las células lisas musculares. También está presente en las células epiteliales que tapizan la superficie interna de los vasos sanguíneos lo que reduce la adhesión de algunos de los componentes de la sangre. Adicionalmente, aumenta la expresión de dos enzimas que inhiben la síntesis del ácido araquidónico, lo que se traduce en un aumento de la liberación de prostaciclina del endotelio, con el subsiguiente efecto antiagregante plaquetario y vasodilatador (Bradford A y cols., 2003).

Se ha utilizado con seguridad en los niños. Existen datos clínicos disponibles sobre su uso seguro en forma de acetato de α -tocoferol. Su uso en niños está bien documentado en patologías como abetalipoproteinemia (Taketomo CK y cols., 2007), fibrosis quística (Feranchak AP y cols., 1999; Winklhofer-Roob BM y cols 1996), β -talasemia, anemia de células falciformes (Wilfond BS y cols., 1994; Brigelius-Flohé R y cols., 2002), errores innatos del metabolismo (Moyano D y cols, 1997), la epidermólisis bullosa (Shirakata Y y cols., 1993), Déficit de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Eldamhoughy S y cols., 1988) y glomeruloesclerosis focal y segmentaria (Tahzib M y

cols.,1999). En muchos de estos estudios no se recogen de manera sistemática regímenes de dosificación ni pautas estandarizadas de tratamiento a largo plazo. Por ejemplo en los estudios sobre fibrosis quística en niños las dosis han diferido entre los estudios: 5,5 a 47,4 UI/kg /d de 5 a 10 mg/kg/d y de 50 a 100 UI/d (Lavine JE y cols., 2000; Vajro P y cols., 2004).

Vitamina C (Ácido Ascórbico)

La vitamina C (vit C) es una vitamina soluble en agua que contribuye como donador de electrones en importantes reacciones biológicas en el organismo. La forma activa de la vit C es el ácido L-ascórbico (Dhariwal KR et al., 1991). Esta vitamina precisa de su aporte en dieta.



Existen transportadores específicos para su entrada en la célula mediante intercambio con sodio. Tiene relación con multitud de procesos metabólicos a nivel del sistema nervioso central (SNC). Muchos experimentos han apoyado el papel crucial de la vit C en el desarrollo cerebral. Como potente antioxidante y eliminador de ROS, así como un importante factor en el reciclaje de los antioxidantes del cerebro.

El ácido ascórbico ha sido utilizado para atenuar la enfermedad de Huntington (Rebec, G.V et al., 2003), como posible tratamiento en la enfermedad de Alzheimer en asociación con vitamina E (Heo JH y cols., 2013). Junto a estas dos enfermedades, la vit C se ha utilizado para mejorar el estado de demencia de pacientes adultos (Gray SL y cols., 2003).

Una dosis oral de 2000 mg/m²/día de ácido ascórbico puede modular la generación de ROS y aumentar la apoptosis de los neutrófilos, lo que podría impedir procesos inflamatorios mediados por neutrófilos. En la literatura se recogen artículos sobre tratamientos de prueba con altas dosis de ácido ascórbico (30mg/kg/día) vía oral durante periodos de tiempo prolongados (hasta 12 meses) que parecen ser seguros y bien tolerado en niños de 2 a 16 años (Burns J y cols., 2009). Su uso en combinación con el tocoferol se debe a que además de su acción antioxidante favorece la regeneración de la vitamina E oxidada (Chan M y cols. 1993).

HIPOTESIS EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS

HIPOTESIS EXPERIMENTAL

Como hemos revisado en el marco teórico, los pacientes con SXF muestran alteraciones en la respuesta del eje HPA que podrían estar directamente relacionados con manifestaciones patológicas como hiperactividad y ansiedad, así como con los problemas de aprendizaje. Estas alteraciones se podrían objetivar con biomarcadores en muestras sanguíneas. Sabemos que la carencia de la proteína FMRP produce estrés oxidativo y podría ser responsable del deterioro cognitivo y comportamental de los pacientes. La mejoría del estrés oxidativo mediante la administración de productos antioxidantes puede favorecer mejores resultados en valoraciones neuropsicológicas de nuestros pacientes. Esto supone una mejora de la calidad de vida de los niños con SXF y sus familias.

Las conclusiones obtenidas en trabajos preclínicos realizados con el modelo animal de Fmr1-KO han permitido evidenciar interesantes hallazgos que podrían ser aplicables a la práctica clínica diaria con nuestros pacientes. El estudio de la base metabólica y hormonal que subyace al defecto genético puede ayudarnos también a explicar mejor los mecanismos etiopatogénicos de la clínica en estos pacientes (problemas comportamentales, mala tolerancia al estrés, trastorno del neurodesarrollo) y que se observan también en otras patologías.

Este trabajo presenta algunos determinantes particulares y diferenciales respecto a los estudios anteriormente expuestos:

- El hecho de realizar estudios comparativos entre individuos afectos y sus hermanos sanos, añade interés al haberse realizado pocas veces antes en la literatura.
- La búsqueda de biomarcadores en relación con el estrés oxidativo que sean diferenciadores en nuestros participantes con respecto a la población general puede servir para comprobar la eficiencia de

las posibles terapias. No solo tendremos entonces resultados clínicos y de los test neuropsicológicos para avalar la eficacia, sino también valores objetivos en sangre y no sujetos a interpretación individual o sesgos metodológicos.

- El ensayo de nuevas dianas terapéuticas, y el uso de sustancias accesibles y seguras, como las vitaminas, es un valor añadido.

Los resultados previos obtenidos servirán de base para la segunda parte de este trabajo en la que queremos evaluar la posibilidad de que la administración de productos antioxidantes pueda favorecer una mejoría en el estado neurológico de niños con SXF, como ya se ha evidenciado en modelos animales.

OBJETIVOS

El objetivo de la primera parte del proyecto (PARTE A) es **valorar el nivel de estrés oxidativo evidenciado en individuos afectados de SXF en comparación con sus hermanos sanos**. En estos pacientes en condiciones basales, los niveles de sustancias prooxidantes deben estar más elevados y también se debería apreciar menor disponibilidad de sustancias antioxidantes. Esta hipótesis, junto con los resultados obtenidos por otros autores que evidencian que este estado de estrés oxidativo excesivo puede participar de la etiopatogenia del fenotipo conductual de los pacientes con SXF, nos servirá para desarrollar la segunda parte (PARTE B) que supone una aplicación práctica de estas evidencias **y un abordaje terapéutico mediante la realización de un ensayo experimental con participantes afectados de SXF**. Por lo tanto los objetivos de esta tesis serán:

- Desarrollar un estudio transversal comparativo de biomarcadores sanguíneos en un grupo de participantes con SXF y un grupo control de hermanos sanos en situación basal.

- Analizar la relación existente entre estrés oxidativo y diferentes parámetros clínicos y analíticos evaluados en estos participantes.
- Valorar la relación de los resultados obtenidos en nuestros participantes en comparación con sus hermanos sanos.
- Implementar un ensayo de tratamiento piloto con ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E) en un grupo de 30 participantes con SXF durante un periodo de 12 semanas. Durante el ensayo, estudiaremos parámetros bioquímicos en relación al estrés oxidativo y realizaremos un estudio cognitivo y del comportamiento tras 12 semanas de tratamiento.
- Evaluar la seguridad y ausencia de efectos adversos en nuestra población diana durante las 12 semanas de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

PARTE A: Patrón bioquímico en individuos SXF comparado con sus hermanos sanos

1. Diseño del estudio:

Estudio analítico de casos-contróles, prospectivo, observacional.

1.1 Ámbito de estudio:

Análisis sanguíneo de las muestras de participantes con SXF y controles.

1.2 Población de estudio:

Los participantes fueron 18 individuos con SXF y 15 hermanos sanos. En total 33 participantes que accedieron a la extracción de la muestra sanguínea sobre la que se ha realizado el trabajo.

Los participantes SXF y los controles sanos se reclutaron a través de la asociación de pacientes SXF española. La intención inicial fue conseguir 20 individuos con SXF y 20 controles. 10 adultos y 10 preadolescentes de cada grupo. Para participar en este trabajo los interesados debían tener entre 3-30 años de edad. Los requisitos asociados fueron en el caso del grupo SXF aportar el documento con el diagnóstico molecular de SXF. El grupo control se seleccionó entre los hermanos sanos de los individuos incluidos, que también habían sido valorados genéticamente con negatividad para la prueba diagnóstica de SXF.

Se comprobó que los participantes, además de cumplir los criterios de inclusión y exclusión (referidos más adelante en el texto), eran colaboradores para la extracción de sangre.

El Comité Ético de Investigación del Hospital Carlos Haya (Málaga) aprobó el estudio. De acuerdo con sus recomendaciones, los participantes recibieron información detallada por escrito y explicación

verbal sobre el estudio y se obtuvo un consentimiento informado de los padres de todos los participantes SXFs y controles. Tras recibir la información cada familia tuvo 2 semanas para cumplimentar el documento de consentimiento. Además se les aseguro que recibirían noticias de cualquier información sobre el proyecto que solicitaran o de cualquier resultado relevante del análisis de la muestra sanguínea.

2. Recogida de datos y Procedimientos

La forma de solicitar su colaboración fue mediante una carta a las familias que pertenecen a la asociación SXF en España. Los análisis sanguíneos se realizaron en muestras obtenidas de los participantes analizados por un laboratorio externo (L. Echevarne Barcelona). Para el análisis estadístico de los resultados se dividieron en 2 grupos: participantes X frágil y sus hermanos como controles

Cada uno de esos dos grupos se dividieron en otros 2 subgrupos, separados por edad en pre púberes (menores de 13 años) y post púberes (mayores de esta edad), siguiendo en este caso la clasificación propuesta por Hagerman en 2002

3. Variables e indicadores:

- Demográficas (variables cualitativas): sexo, edad.
- Variables clínicas y determinaciones analíticas:

Clínicas:

- resultados genéticos moleculares para SXF
- medicaciones concomitantes
- trastorno conductual: hiperactividad, fenotipo autista

Analíticas (variables cuantitativas): intentamos evaluar la mayor o menor presencia de estado oxidativo en nuestros participantes SXFs.

Así se evalúan tanto algunos parámetros propios de estrés, como la presencia en sangre de sustancias antioxidantes.

- hemograma
- bioquímica:
 - Glucosa
 - Colesterol
 - Transaminasas
 - Ac úrico
 - Trsferrina
 - Ceruloplasmina/ cobre
 - Zinc
 - Magnesio
 - Selenio
- proteínas totales / seroalbúmina
- inmunoglobulinas
- AA en suero
- hormonas
 - Tiroideas
 - DHEA
 - Acth/cortisol
 - H crecimiento (HG)/IGF1
 - H sexuales (LH, FSH)
 - Serotonina
 - Adrenalina / noradrenalina
- Antioxidantes y vitaminas:
 - Vitamina A
 - Vitamina E
 - Vitamina C

4. Análisis de las muestras en laboratorio

Las muestras de sangre para análisis bioquímicos y hormonales se obtuvieron por punción venosa entre las 7: 30 y 11: 00 am, después de un periodo de 12 horas de ayuno. El envío se realizó con el plasma o suero separado, congelado a -80° C.

Todos los procedimientos realizados sobre la sangre y el análisis final de las muestras se contrataron con un servicio externo (laboratorio Echevarne Barcelona, España). Se realizaron todos los analitos de uso común en análisis sanguíneos. También se midieron los niveles de hormonas en muestras recién descongeladas. Se realizó también control de las hormonas suprarrenales por RIA. Se ha analizado la hormona corticotropa (ACTH). Y por cromatografía de alta resolución para catecolaminas: adrenalina (A), noradrenalina (NA)

Se realizó análisis (enzimoinmunoanálisis) de las principales hormonas sexuales, por ejemplo, la hormona luteinizante (LH); hormona estimulante del folículo (FSH).

Las muestras de sangre se centrifugaron durante 15 min a 2.500 rpm. La glucosa se midió inmediatamente en tubo de sangre con EDTA - plasma con uso de la reflexión fotometría (Reflotron Sprint, Roche, Rotkreuz, Suiza).

Las concentraciones de HDL - colesterol y triglicéridos se midieron en suero fresco con un Hitachi 917 (Triglycerides GPO/PAP y colesterol-HDL plus directo, método de segunda generación sin desproteinización; Roche).

5. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando el programa informático SPSS 15 for WINDOWS (SPSS Inc, Chicago, IL), estimando la media

de los valores, la desviación estándar, el error estándar de la media, así como las diferencias estadísticas entre los grupos de participantes con SXF y hermanos sanos. Todo esto a través de los instrumentos estadísticos para muestras no relacionadas que cumplen normalidad: t de Student (para analizar dos grupos no relacionados) y el análisis de la varianza ANOVA (genotipo, tratamiento y ANOVA de medidas repetidas) seguido por el test *post hoc* de Bonferroni. Se estableció como diferencia significativa cuando * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$

Las características demográficas que podían representar sesgos en ambos grupos se analizaron con t de Student para las variables continuas y pruebas de Chi-cuadrado para las variables categóricas.

PARTE B: ENSAYO CLINICO: TRATAMIENTO CON VITAMINAS ANTIOXIDANTES PARA EL SÍNDROME X FRAGIL

1. Diseño del estudio

1.1. Tipo de estudio

Un ensayo clínico piloto de fase II aleatorizado, con un procedimiento de control a doble ciego y comparado con placebo.

1.2. Ámbito de estudio

Participantes de toda España afectados por de SXF. Para su valoración el equipo de investigación se trasladó a varias ciudades (Sevilla, Madrid, Málaga) con el fin de realizar las entrevistas y la recogida de datos inicial, así como para realizar las pruebas psicométricas y cuestionarios de evaluación. Posteriormente se realizaron las extracciones de sangre a los participantes SXF en su ciudad a través de los centros de análisis de la empresa externa contratada por el proyecto para tal fin.

1.3 Población de estudio

El estudio incluye participantes con SXF con edades comprendidas entre los 6 hasta los 18 años atendidos en el Hospital Regional Universitario de Málaga, así como pacientes atendidos en otros Hospitales de Andalucía que colaboraron derivando pacientes para el ensayo. Los participantes reclutados fueron niños y adolescentes varones diagnosticado SXF, de acuerdo con una prueba de biología molecular estandarizada, que cumplieron con todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión.

Selección de participantes. Consentimiento informado

Para la selección de participantes nos pusimos en contacto con las asociaciones del SXF a nivel nacional. A cada participante cuyos padres expresaron interés en el ensayo se le envió por correo información

detallada del estudio. A todas las familias que querían participar se le realizó una entrevista de selección en la que se les informó verbalmente de todos los detalles del estudio, así como de cada parte del documento de consentimiento y del protocolo del estudio. Los padres o tutores pudieron consultar todas sus dudas durante la entrevista antes de decidir la participación de sus hijos, que se confirmó firmando el consentimiento informado correspondiente.

A las familias participantes se les facilitó una copia firmada del documento de consentimiento que debían conservar y otra copia se quedó en el registro del ensayo custodiado en el Hospital, procedimiento establecido para dar el consentimiento para la participación de los niños en el ensayo. Una vez que este formulario estaba firmado se le adjuntaban informes previos así como también una copia del informe genético. Estos documentos que se entregaban al equipo investigador cuando el participante asistía al hospital para la evaluación inicial (T0).

Criterios de inclusión

- Participantes varones de 6-18 años. Este es el rango de edad en el que los síntomas que queríamos evaluar están más exacerbados. Antes de los 6 años de edad es difícil un diagnóstico certero de hiperactividad. Después de los 18 años los síntomas conductuales tienden a estabilizarse.
- Firma del consentimiento informado debidamente cumplimentado por los padres o tutores, o un consentimiento razonado y explicado para participantes mayores de 12 años con autonomía.
- Diagnóstico previo certero de SXF por criterios de biología molecular, con más de 200 repeticiones del triplete CGG y con hipermetilación de la región del promotor de gen FMR1.
- Hiperactividad y síntomas conductuales que puedan ser evaluados.

Criterios de exclusión

- Condiciones neurológicas severas no clínicamente controladas.
- Trastornos neurológicos no relacionados.
- Alergia a alguno de los componentes de la fórmula (o excipiente utilizado).

1.4 Aleatorización

Una vez seleccionado los casos que firmaron el consentimiento, y tras comprobar que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión, se separaron los 30 participantes en 2 grupos: los que recibieron tratamiento activo y los que recibieron placebo durante un periodo de 12 semanas.

Se utilizaron dos criterios de aleatorización para la estratificación: edad y medicación psicofarmacológica concomitante.

A fin de mantener el doble ciego, los participantes se asignaron de manera aleatoria a uno de los 2 grupos de estudio sin que las familias ni los médicos o personal investigador responsables supiesen a qué grupo de intervención pertenecía el participante.

Los participantes que cumplían estos criterios se distribuyeron al azar a uno de los 2 grupos por parte del Servicio de Farmacia del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, respetando la asignación de manera ciega a grupo control o tratamiento durante todo el ensayo.

La asignación se realizó inmediatamente después de la inclusión del participante candidato. A través de un programa informático se aseguró la confidencialidad sobre qué participante fue asignado a cada grupo. El código de aleatorización se mantuvo oculto por el Servicio de Farmacia del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Allí se fabricó también la medicación correspondiente a cada participante, codificada, y sin ningún detalle que permitiera conocer si se asignaba a placebo o tratamiento. Se realizó una distribución aleatoria por bloques y

estratificación para evitar factores de confusión (edad, medicación concomitante) así se intentó evitar sesgos. Este proceso solo se realizó una vez que los participantes habían firmado el consentimiento y se confirmaba que cumplían todas las características de selección exigidas.

2. Metodología del protocolo del ensayo

En el momento inicial a todos los participantes se les realizó una entrevista personal. Se recogieron para el estudio los datos clínicos, demográficos, antecedentes de interés y características fenotípicas de los participantes. Entre los antecedentes se recogen datos de filiación, incidencias del embarazo y el parto. También características físicas y antropométricas, comorbilidad con otras patologías y datos médicos relevantes, antecedentes familiares, árbol genealógico y situación médica de los progenitores.

Se realizaron encuestas para valorar el impacto del tratamiento en casa y en ambiente académico, así como la mejora o no de la calidad de vida del participante y de la familia. Se mantuvo contacto telefónico mensual con las familias recogiendo posibles incidencias con el tratamiento. Se evaluaron mediante entrevista los posibles eventos adversos y se ofreció la opción de notificar por teléfono de forma urgente cualquier incidencia atribuible al uso de la combinación de antioxidantes.

La variable principal del estudio fue la valoración del nivel de inatención e hiperactividad para lo que se aplicaron las diferentes versiones largas del cuestionario de Conners revisado, para padres (CPRS-R) y maestros (CTRS-R) (Conners CK, 1997).

Para describir los cambios conductuales se empleó el inventario de comportamiento en el desarrollo (DBC-P24) y para analizar los cambios cognitivos la Escala de Inteligencia de Wechsler revisado para

Niños. Así como la versión adaptada al español del índice general de bienestar psicológico (PGWBI-R), para describir posibles los cambios en los familiares (Badia y col., 1996).

Para describir los cambios metabólicos se realizaron análisis de sangre y orina de 24 horas en el momento basal (T0) y tras 12 semanas de inclusión en el ensayo (T1) La duración mínima del tratamiento y seguimiento de estos participantes fue de 6 meses. Se ha evaluado la presencia y gravedad de los síntomas conductuales, así como la tolerancia al tratamiento. Y los posibles efectos adversos a largo plazo.

2.1 Evaluaciones

Tras la inclusión de los participantes, se recogieron los resultados de las pruebas neuropsicológicas y de los test cumplimentados por los padres y profesores en el ámbito escolar. Durante el seguimiento se repitió toda la batería de pruebas recogiendo los cambios significativos (en T0, T1). También se repitieron los análisis de sangre y orina, y se realizó la evaluación del bienestar psicológico de la familia.

2.2 Abandono de participantes/ cese del estudio

Los participantes pudieron abandonar el estudio en cualquier momento, por cualquier razón y sin ningún perjuicio para ellos. Los profesionales colaboradores, previa consulta con el coordinador del estudio, también tenían la libertad de interrumpir el programa de tratamiento si el hecho de continuar, en su opinión, podía ser perjudicial para la salud o el bienestar del participante. Si un participante abandona el estudio o es retirado por problemas con el tratamiento o rechazo del mismo, se realizó el seguimiento y las evaluaciones hasta los 90 días. Ante posibles retiradas de tratamiento por problemas con la medicación, se decidió continuar el seguimiento hasta la resolución del problema concomitante, o hasta que en opinión de los profesionales médicos responsables del estudio fuera poco

probable que se presentaran cambios en el estado de salud del participante. El seguimiento telefónico a los 15, 30, 60, 90 días fue completado por todos los participantes que recibieron la medicación (incluido placebo).

Se suspendería el estudio en caso de que se reportaran eventos adversos severos en relación directa o con sospecha de relación con la administración de la medicación. La responsabilidad final de suspender el estudio correspondía al promotor del estudio. Informando al comité de ética y la Asociación Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) de cualquier incidencia clínica relevante. Las autoridades de salud debían ser informadas de las decisiones que pudieran haber llevado a interrumpir, abandonar o continuar el estudio.

2.3 Criterios éticos: normativa aplicada

El estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki, específicamente según las ordenanzas del Comité de la Agencia Europea del Medicamento (EMA / CPMP) sobre el uso de placebo en los ensayos clínicos y de acuerdo con la guía para la buena práctica clínica, (CPMP / ICH / 135 / 95, 17 de julio de 1996), así como respetando la normativa local.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de ensayos clínicos regional, el Comité de ética del Hospital Regional de Málaga y la AEMPS. El estudio se inició tras el visto bueno y la aprobación formal de las autoridades sanitarias españolas y de los comités ya referidos.

De acuerdo con la ley española en relación con ensayos clínicos, el ensayo ha contado con un seguro de responsabilidad civil para cubrir cualquier problema derivado del uso de la medicación durante el estudio. También se informó de la participación de los menores de edad en el ensayo a la Fiscalía del menor correspondiente de la ciudad

de residencia de cada participante, siguiendo las exigencias de la legislación vigente en España.

2.4 Detalles del tratamiento

Dosificación y administración de medicación

La medicación se administró vía oral, bajo supervisión de los padres o tutores, en los domicilios de los participantes. Se suministró a las familias acetato de tocoferol 10 mg/kg/día, en dos dosis diarias, y ácido ascórbico 10 mg/kg/día, también en dos dosis diarias, o placebo.

La preparación y el etiquetaje del tratamiento

La medicación usada en el ensayo fue preparada, etiquetada, almacenada y dispensada por el Servicio de farmacia en el Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España). Los principios activos se obtuvieron por vía comercial. El placebo usado fue sílice coloidal comercial encapsulada por el servicio de farmacia y emulaba el volumen y apariencia del tratamiento. Conteniendo los mismos excipientes que la medicación experimental. El coordinador de estudio supervisó todos los procedimientos aplicados. El doble ciego y la ordenación aleatoria de participantes en los dos grupos se realizaron por el servicio de farmacia antes de la distribución de la medicación del ensayo.

Otras medicaciones autorizadas

Los participantes siguieron tomando su medicación habitual para controlar síntomas o patologías comorbidas asociadas, así como cualquier medicación prescrita para cualquier otra enfermedad

simultánea antes de su entrada en el estudio. Además, siguieron recibiendo cualquier terapia preexistente psicológica o educativa.

2.5. Métodos específicos de evaluación

Evaluación de efectividad a nivel conductual

La evaluación clínica de los participantes se llevó a cabo a través de la batería de pruebas antes comentada. Se seleccionaron para valoración de nivel de inatención e hiperactividad las escalas CRS-R (Conners' Rating Scales-Revises, Conners CK 1997), en su versión para padres: CPRS-R y para profesores: CTRS-R. Ambas pruebas son unos instrumentos de aplicación individual o colectiva cuyo objetivo es realizar una evaluación conductual, de manera objetiva y estandarizada, de niños con problemas de atención e hiperactividad. Estas escalas evalúan factores como: Negativismo, problemas cognitivos/desatención, hiperactividad, vergüenza/ansiedad, perfeccionismo, problemas sociales, psicósomáticos. Permite calcular un índice global del cuestionario de Conners, así como un índice por subescalas: índice TDHA y subescala DSM-IV según perfil inatento o hiperactivo.

La puntuación del cuestionario de Conners se obtuvo mediante el cuestionario estructurado con dos informadores (padres o tutores y profesores) quienes evaluaron el comportamiento del niño al inicio y a las 12 semanas de tratamiento. El Conners es un cuestionario traducido y validado en español y adaptado a las condiciones específicas de nuestro país (Farré- Riba y cols, 1997). Recoge unas puntuaciones en relación con las respuesta de estos observadores al cuestionario con una puntuación entre 0 a 100 puntos. Una puntuación de 55 o más en CPRS-R y CTRS-R en T0 asociado a la hiperactividad fue considerada punto de corte para la inclusión de participantes en el estudio (Tabla 3)

T-score	%	Significación
70 ->	98	Claramente atípico (problema significativo)
66-70	95-98	Moderadamente atípico (problema significativo)
61-66	86-94	Levemente Atípico (posiblemente problema significativo)
56-60	74-85	Ligeramente atípico (pone en alerta)
45-55	27-73	Media (no debe poner en alerta)
40-44	16-26	no alerta, valores bajos indican normalidad
35-39	6-15	no alerta, valores bajos indican normalidad
<30	<2	no alerta, valores bajos indican normalidad

Tabla 3: Valoración de resultados del cuestionario de Conners (Conner CK, 1997) donde se recoge: la puntuación global de Conners, el porcentaje de población y la significación clínica del resultado

La escala de Inteligencia de Wechsler para niños revisada (WISC-R) (1974; TEA 1993) mide inteligencia global. Constituida por 12 subtest, 6 en la escala verbal y 6 en la escala manipulativa. Todas ellos se analizaron al inicio y a las 12 semanas de tratamiento

El test DBC-P24 (Taffe JR, 2007) es una forma corta de la prueba original de 24 ítems que se completa por padres y cuidadores. Intenta valorar una medida aproximada global del estado cognitivo y conductual de los participantes en el ensayo. Tiene un buen perfil de sensibilidad y especificidad en relación a test más largos. Cada descripción conductual es anotada con 0, 1 o 2 puntos, donde 0 = "según su criterio no es cierto", 1 = "a veces es cierto" y 2 = "muy cierto". La suma proporciona un valor total que se corresponderá con un nivel de afectación conductual.

La versión española de test PGWBI-R (Psychological General Well-Being Index revised) (Badia X y cols. 1996) ha sido cumplimentada con las respuestas de los padres al principio y a las 12 semanas del estudio para evaluar las repercusiones psicológicas del tratamiento

sobre la vida de la familia. Esta escala consta de un total de 22 ítems que evalúan seis estados intrapersonales: ansiedad, vitalidad, autocontrol, humor deprimido, salud general y estado psicofísico. Puede ser utilizado en forma autoadministrada o heteroadministrada, especialmente en el caso de personas con retraso mental leve, psicosis, analfabetismo, etc. En caso de hetero-administración, el entrevistador ha de tener siempre presente que es el estado real, no el que el entrevistador piense que el examinado debería reflejar, el que debe determinarse. El tiempo de administración es corto, oscilando entre 8 y 15 minutos (González y cols, 1996). En cuanto a la versión castellana del PGWB, encontramos propuestas diferentes. Según Gonzalez y cols (1996), cada ítem puntúa de 1 a 5 puntos en función de la intensidad o frecuencia con que el sujeto experimenta cada uno de los estados afectivos durante las tres últimas semanas. De esta forma, la puntuación total oscila pues, entre 22 y 110 puntos; con una lectura global ascendente, en la que, a mejor puntuación obtenida, mayor bienestar psicológico y viceversa. Con los datos que recoge refleja sentimientos subjetivos y el bienestar psicológico (o malestar) durante la semana anterior.

Evaluación de muestras sanguíneas

Con respecto al análisis del estado metabólico y del estrés oxidativo. Se obtuvieron muestras de sangre y orina que se evaluaron en T0 y T1 para anotar los cambios metabólicos que pudieran estar relacionados con la eficacia del tratamiento. Se valoraron cambios cualitativos del metabolismo y niveles de antioxidantes. Esto último para comprobar la absorción de la medicación administrada en el caso de los pacientes que tomaban la combinación de antioxidantes.

Se midieron los siguientes parámetros analíticos antes y después del tratamiento:

1. En sangre:

- a. Hemoglobina, hematocrito, número de hematíes, leucocitos, plaquetas
- b. Bioquímica: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, sodio, potasio, calcio, fosforo, cloro, proteínas totales, albumina, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad, bilirrubina total, transaminasas, fosfatasa alcalina, cAMP, ácido glutámico y pirúvico.
- c. Eje hipotalámico: adrenalina, noradrenalina, dopamina, cortisol, hormona corticotropa.
- d. Hormonas sexuales, hormonal del crecimiento, hormonas tiroideas
- e. Neurotransmisores (serotonina, γ -aminobutirico)
- f. Antioxidantes exógenos: vitamina A,C y E
- g. Antioxidantes endógenos: ceruloplasmina, albumina, transferrina.
- h. Metales: selenio, zinc, cobre, y magnesio
- i. Aminoácidos en suero

2-En Orina: densidad urinaria, PH, proteínas, glucosa, cuerpos cetógenos, bilirrubina, nitritos, urobilinógeno, leucocitos, sedimento, sodio, cloro y potasio. En muestra de orina de 24 horas conservada se analizaron los parámetros relacionados con el metabolismo de las catecolaminas

Parámetros médicos evaluados en los participantes:

1. Valoración cardiológica: síntomas o signos de cardiopatía, auscultación de soplos, valoración de prolapso de la válvula mitral
2. Síntomas neurológicos: historia de epilepsia, signos o síntomas de déficits o focalidad neurológica, hipotonía, retraso del desarrollo

psicomotor, problemas para control motor fino y grueso, estereotipias, contención de esfínteres.

3. Locomotor: Hiperlaxitud, escoliosis, alteraciones osteoarticulares.

4. Rasgos morfológicos: macroorquidismo, manchas o hiperpigmentación cutánea, otitis de repetición con o sin hipoacusia, problemas visuales como estrabismo y macrocefalia, facies dismórficas.

Recogida de efectos adversos:

Cualquier acontecimiento adverso relatado espontáneamente por el sujeto u observado por el investigador o el equipo de investigación ha sido registrado a través de un documento creado para estas situaciones. El investigador clasificó la intensidad de dichos eventos adversos conforme a la escala siguiente:

1. Suave: alguna incomodidad, pero no llega a interrumpir actividad normal diaria.
2. Moderado: incomodidad suficiente para reducir o afectar notablemente la actividad normal diaria.
3. Severo: causa incapacidad para trabajar o realizar actividades normales diarias.

También se recogió la periodicidad del acontecimiento conforme a la escala siguiente:

1. Evento único: solamente un acontecimiento de duración limitada
2. Intermitente: varios episodios de un acontecimiento, cada uno de duración limitada
3. Persistente, ilimitado: un acontecimiento que ha persistido en el tiempo y es de duración indefinida.

Para cada acontecimiento adverso, se valoró, en opinión del investigador, la relación con la toma de la medicación (definitivo,

probable, posible, improbable, ninguno). Se consideró como un evento adverso severo aquel que provocara una hospitalización prolongada, o problemas graves de salud. O aquellos que tuvieran un desenlace fatal, potencialmente fatal o incapacitante.

También se recogió cualquier medida tomada a raíz de esos eventos. Los eventos adversos severos y las reacciones adversas inesperadas asociadas a la medicación, se debían notificar por los investigadores al coordinador del estudio inmediatamente, dentro de las primeras 24 horas tras el evento.

Cualquier episodio adverso que se recogió fue observado y controlado por los investigadores hasta la resolución o estabilización del cuadro. Según las circunstancias, llegado el caso, se solicitó la colaboración de los médicos de referencia del participante o de un especialista que pudiera valorar de manera profesional el cuadro.

3. Procedimientos y control del ensayo

3.1 Selección de participantes

Todos los participantes diagnosticados de SXF podían ser incluidos en un grupo inicial de “potenciales sujetos participantes”. Los padres y tutores fueron debidamente informados verbalmente y con documentación por escrito del propósito del estudio y se contestó cualquier duda que pudieran objetar. Tras esto se realizó firma del consentimiento informado. Hay que destacar que los participantes saben que tienen el derecho incondicional de retirarse del estudio en cualquier momento sin ningún perjuicio para su atención médico sanitaria posterior.

3.2 Periodos de estudio

Primera visita (T0): En esta primera visita los padres o tutores aportan la documentación para entrar en la fase activa del estudio

Una neuropsicóloga experimentada realizó los test neuropsicológicos a los participantes (WISC-R, DBC-24) y se recogieron los datos del CPRS-R y CTRS-R que valoran los síntomas de hiperactividad e inatención de los participantes. La puntuación en estos test debe ser mayor de 55 como prerrequisito para que los participantes se incluyeran en el estudio. También se valoró la calidad de vida de los participantes y sus familiares mediante el PGWBI.

Además se recogieron datos de filiación, antecedentes familiares, médicos y psicológicos de los participantes y sus padres. Se incluyó también interrogatorio sobre el árbol genealógico familiar. Se realizó una exploración física y neurológica exhaustiva, así como recogida de datos antropométricos de los participantes.

Desde su domicilio se recogieron, en el centro de análisis concertado, las analíticas sanguíneas y las muestras de orina.

Tras todos los procedimientos y para iniciar la fase de ensayo, el participante recibió medicación para las 12 semanas de tratamiento que tomó en su domicilio supervisado por sus padres o tutores.

Segunda visita (tras 12 semanas/T1): se realizaron de nuevo los test neuropsicológicos por la misma persona que los realizó en la visita T0. También se repitieron la valoración del comportamiento, como el cuestionario sobre la calidad de vida. Desde su domicilio de nuevo se recogió, en el centro de análisis concertado, las segundas analíticas sanguíneas y las muestras de orina.

4. Análisis de los datos

4.1 Cálculo del poder estadístico, el establecimiento del tamaño y seguridad de la muestra

El tamaño de la muestra se estableció por medio de un esquema piloto basado en un ensayo de eficacia de fase II con 30 participantes monitorizados durante un periodo de tiempo de 12 semanas. Se

estableció un nivel de significación estadístico de 0.05 y una potencia estadística de 0.8 en los casos más desfavorables.

Teniendo en cuenta la prevalencia del SXF, eran necesarios 13 participantes por grupo de aleatorización (26 en total) para un mínimo poder estadístico de la muestra. Se decidió incluir a 30 participantes (15 por grupo) para evitar problemas por posibles pérdidas de sujetos durante el seguimiento que podían ocasionar menor calidad de los resultados.

4.2. Estadísticos aplicados

Se dibujó un diagrama de flujo para mostrar la secuencia desde los participantes inicialmente seleccionados hasta los excluidos del estudio (rechazos, abandonos, perdidos durante el seguimiento, etc) de acuerdo con los criterios de la guía CONSORT.

Se realizó un análisis estadístico descriptivo usando estadísticos de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas y distribuciones de frecuencia para las variables categóricas. Se realizaron estos análisis por separado para el grupo experimental y el control. Las variables de partida se compararon usando estas técnicas. Se realizó una comparación de las diferencias en los resultados de las pruebas neuropsicológicas entre el grupo experimental y control comparando el inicio y el final del tratamiento a las 12 semanas usando un ANOVA de medidas repetidas. Se analizaron los diferentes parámetros medidos en los test CPRS-R, CTRS-R, DBC-P24 y PGWBI, para ello se usaron pruebas paramétricas o no paramétricas en el caso de que los resultados no se ajustasen a una distribución normal.

RESULTADOS

PARTE A: PATRÓN BIOQUÍMICO EN INDIVIDUOS SXF COMPARADO CON SUS HERMANOS SANOS

1. Características de la población de estudio

Finalmente se reclutaron 33 participantes. 18 eran niños con SXF y 15 controles sanos, hermanos de los participantes. Todos los participantes son varones. La media de edad de los individuos afectados de SXF fue de 14.88 +/- 2.64 años y la de los controles 13.35 +/- 1.97. Para algunos de los datos analizados se dividió la población entre pre y post adolescentes con un punto de corte en 13 años.

Se evaluaron valores descriptivos de la muestra: características clínicas y medicación. Entre los fármacos empleados los más usados fueron (Tabla 4):

Antipsicóticos: risperidona y aripiprazol. 5 participantes. Más usados en pacientes postadolescentes en los que priman los trastornos del comportamiento.

Ansiolíticos: benzodiacepinas, 3 participantes.

Estimulantes: metilfenidato en 6 participantes. Más frecuentes entre los preadolescentes en los que, como se recoge en nuestra serie, son más importantes los trastornos en relación con actitud hiperactiva e inatención y en los que es habitual el uso de este tipo de medicación.

Se han analizado tanto los datos de todos los participantes, como los resultados apareados de la sangre de los participantes SXF con los de la sangre que aportaron sus hermanos sanos como controles.

	EDAD (años)	HIPERACTIVIDAD (número de pacientes SXF)		FENOTIPO AUTISTA (número pacientes)		MEDICACIÓN (número de pacientes)			
		SI	NO	SI	NO	NO	anti psicóticos	estimulante	ansiolítico
SXF (n=18)	14.88 ± 2.64	6	12	9	9	4	5	6	3
Control (n=15)	13.35 ± 1.97	0	15	0	15	15	0	0	0
SXF preadolescentes (n=10)	7.4 ± 1.6	6	4	6	4	4	1	5	0
Control- preadolescentes (n=8)	6.25 ± 2.35	0	8	0	8	8	0	0	0
SXF postadolescentes (n=8)	21.85 ± 2.36	0	8	3	5	0	4	1	3
Control- postadolescentes (n=7)	21.80 ± 3.08	0	7	0	7	7	0	0	0

Tabla 4. Descripción de la muestra en todos los participantes SXFs. Se recoge edad, fenotipo conductual y consumo de fármacos en el momento del estudio.

2. Características analíticas

HEMOGRAMA

Se observó en el grupo de participantes con SXF un descenso de la hemoglobina corpuscular media y del volumen corpuscular medio. Contrario a lo que, basándose en la posible relación del SXF con alteraciones en el metabolismo del folato, había sido descrito antes en un pequeño grupo de pacientes (Langenbeck U y col., 1984), pero que no había podido ser reproducido en animales de experimentación (Reyniers E. y cols., 1996). En nuestra población este parámetro se

encuentra disminuido sólo en los participantes SXFs mayores de 13 años (Figura 6 y 7) donde la diferencia de volumen y hemoglobina corpuscular media es estadísticamente significativa ($p < 0.05$), aunque en todos los casos estudiados los valores están dentro del rango de normalidad establecidos en estudios bioquímicos de la población general (Tabla 5). No se aprecian diferencias significativas en otros parámetros del hemograma.

ESTADISTICO	GRUPO Y EDAD	HBCORP. MEDIA	VOL. CORP. MEDIO
	SXF <13años		
Media		26,23	79,85
SEM		0,49	1,16
	Control <13años		
media		25,80	78,81
SEM		1,31	3,13
<i>T test (p<0.05 significativo)</i>		<i>0,70</i>	<i>0,69</i>
	SXf > 13 años		
Media		28,08	83,85
SEM		0,51	1,13
	Control >13 años		
media		30,01	89,14
SEM		0,51	1,26
<i>T test (p<0.05 significativo)</i>		<i>0,035</i>	<i>0,014</i>

Tabla 5. Valores de hemoglobina corpuscular media y volumen corpuscular medio. Según grupo de edad. Valores de la media y la desviación estándar de la media

Figura 6. Hemoglobina corpuscular media en los diferentes grupos.

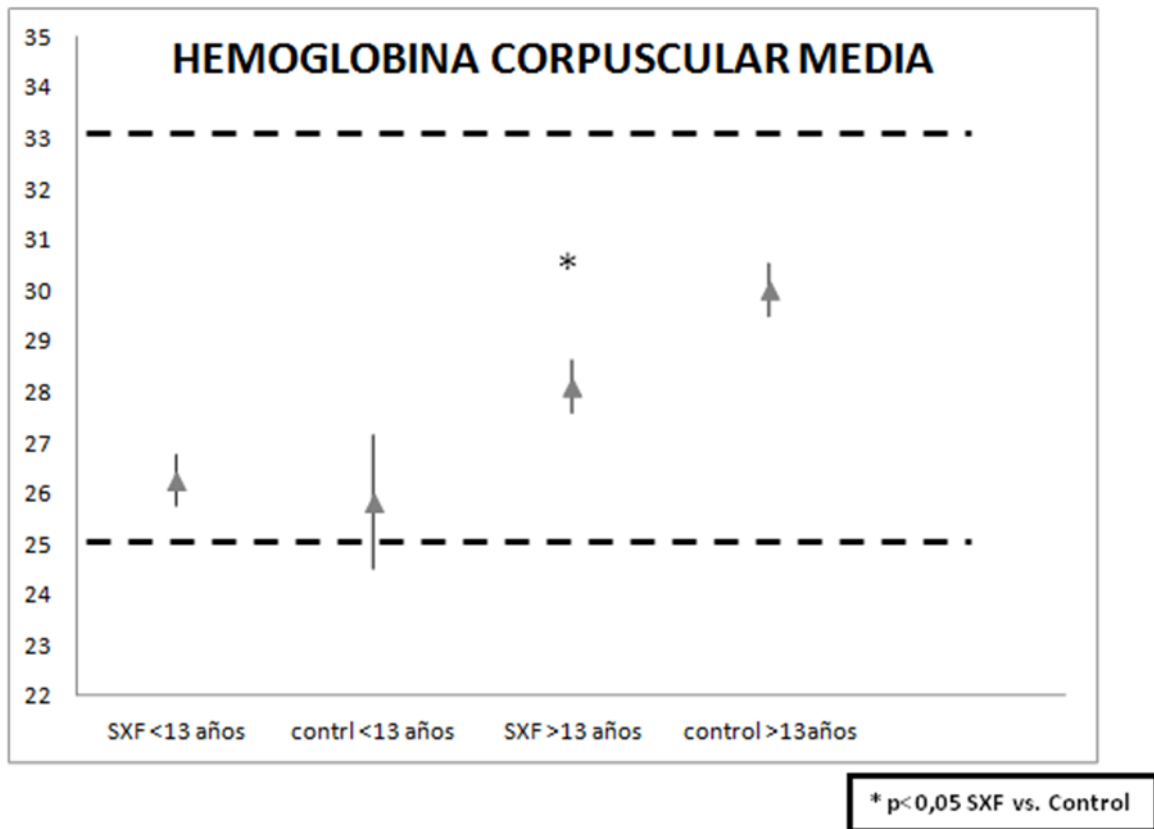
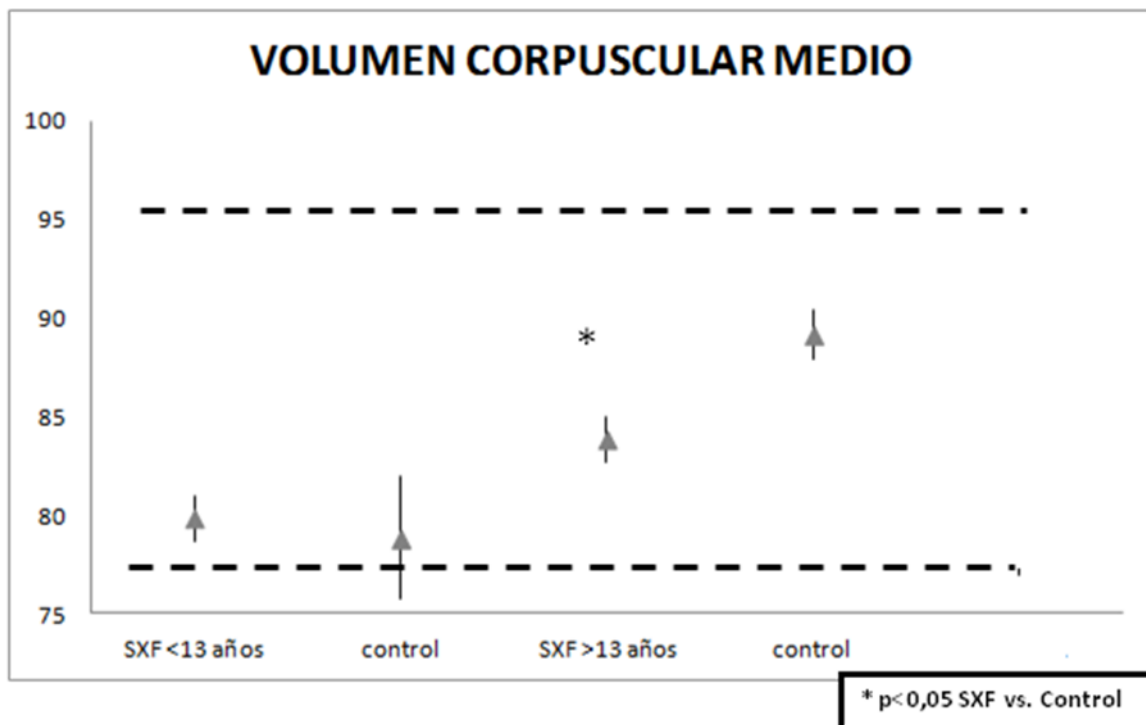


Figura 7. Volumen corpuscular medio en los diferentes grupos. La línea rayada indica los valores normales en sangre en la población general



BIOQUIMICA

No se aprecian diferencias significativas en los niveles de glucemia, colesterol, triglicéridos, perfil renal o hepático analizados en los grupos comparados, ni en relación a la población general.

PROTEINAS DE ALTO PESO MOLECULAR

La **ceruloplasmina** es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre. Su concentración es abundante en plasma; se considera un reactante de fase aguda y su función fisiológica no se encuentra fehacientemente establecida. Fundamentalmente se sintetiza en los hepatocitos. La **trasferrina** es la proteína transportadora específica del hierro en el plasma. Es sintetizada en el sistema retículo endotelial pero principalmente en el hígado. Ambas se consideran proteínas relacionadas con la función antioxidante.

En relación con la ceruloplasmina sus niveles fueron más elevados en nuestra muestra en los participantes con SXF que en sus hermanos sanos. Este hallazgo es estadísticamente significativo en los participantes SXF mayores de 13 años (figura 8). Con respecto a la transferrina también se encontraron diferencias en ambos grupos y dependiendo de la edad de los participantes. En el rango de edad de nuestros participantes los valores normales serían: 4-9 años: 200-380 mg/dl; 10-19 años: 220-440 mg/dl. En nuestros participantes con SXF estos marcadores están en niveles dentro del rango de normalidad pero por debajo de sus hermanos sanos sobre todo en menores de 13 años (figura 9). También se controlaron otras moléculas relacionadas con la regulación de la óxido reducción y con las reacciones al estrés como son el **AMP cíclico** (figura 10), que ya se había descrito reducido en pacientes con SXF (Berry-Kravis E. y cols. 1995), dato que

corroboramos en las mediciones de nuestra población, y la **serotonina** que se había detectado alterada en relación a los comportamientos autísticos de estos pacientes (Jackson A. y cols., 1984) y que está elevada en las mediciones sanguíneas en nuestra población. Los datos analizados se representan en la tabla 6 y en figuras 8-11 mostrando los valores medios y el error estándar de la media.

	AMPc (nmol/l) Sangre Plasma (RIA)	Ceruloplasmina (mg/dl) suero (Nefelometria)	Transferrina (mg/dl) suero (Nefelometria)	Serotonina (ng/ml) Suero (EIA)
SXF (n=18)	31.81 ± 4.04	29.05 ± 1.22	268.29 ± 9.41	138.88 ± 14.81
Control (n=15)	45.47 ± 5.36 *	27.18 ± 2.30	277.11 ± 14.08	87.22 ± 13.38 *
SXF- preadolescente (n=10)	43.25 ± 5.37	30.89 ± 1.44	272.70 ± 9.22	129.50 ± 12.55
Control- preadolescente (n=8)	50.50 ± 13.61	32.00 ± 3.47	313.75 ± 14.81 *	57.00 ± 19.44 *
SXF- postadolescente (n=8)	20.65 ± 1.64	26.71 ± 0.77	257.71 ± 11.98	145.57 ± 20.59
Control-post adolescente (n=7)	31.96 ± 4.22 *	23.14 ± 1.04 *	249.80 ± 7.69	103.60 ± 18.67

* p<0,05 SXF vs. control

Tabla 6. Valores alterados con significación estadística de los metabolitos medidos en nuestra muestra

Figura 8. Representación gráfica de los valores de ceruloplasmina (mg/dl)

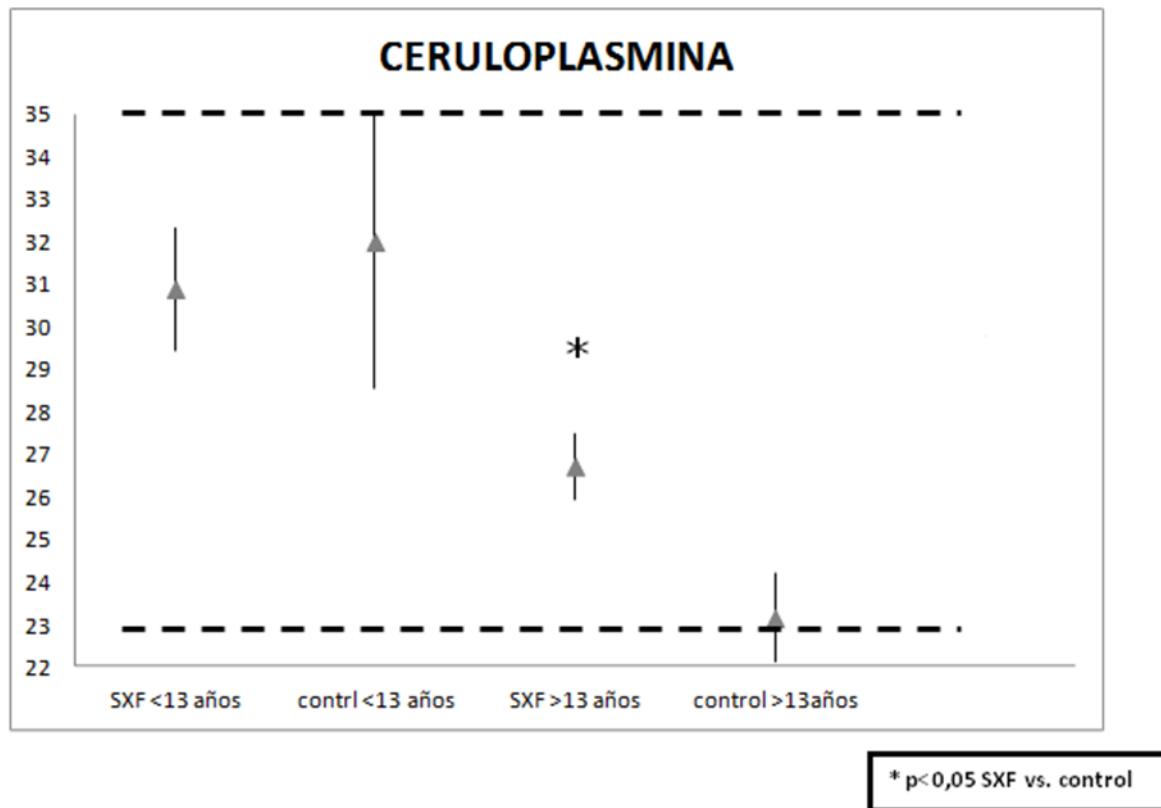


Figura 9. Representación gráfica de los valores de transferrina (mg/dl)

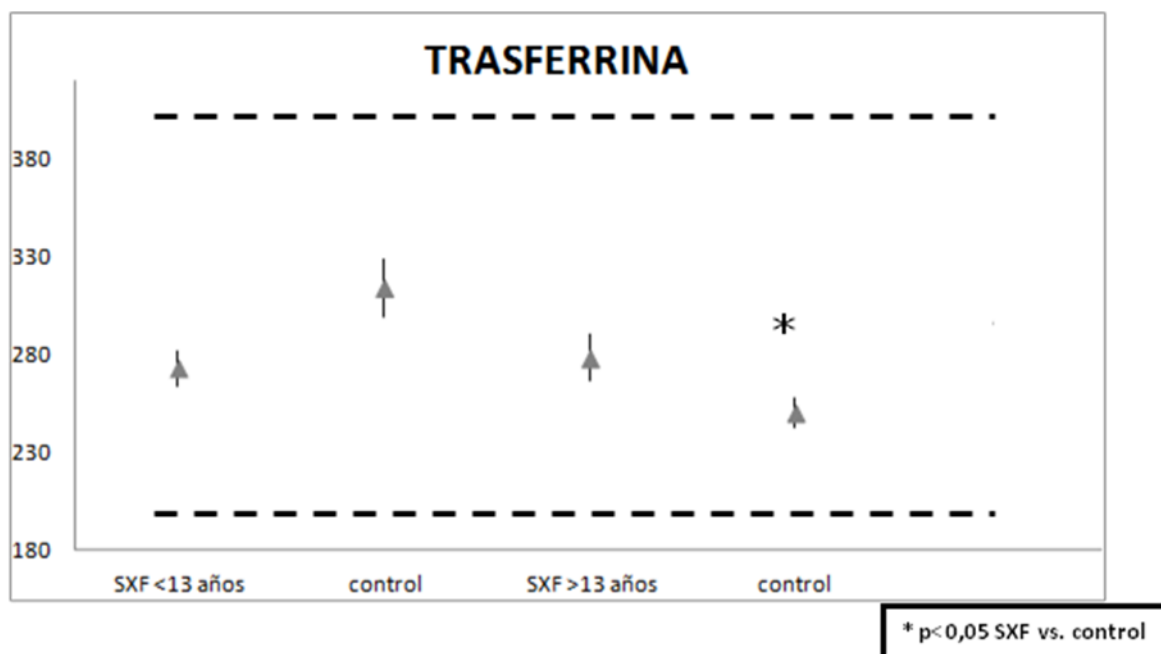


Figura 10: Representación gráfica de los valores de AMP cíclico (nmol/l)

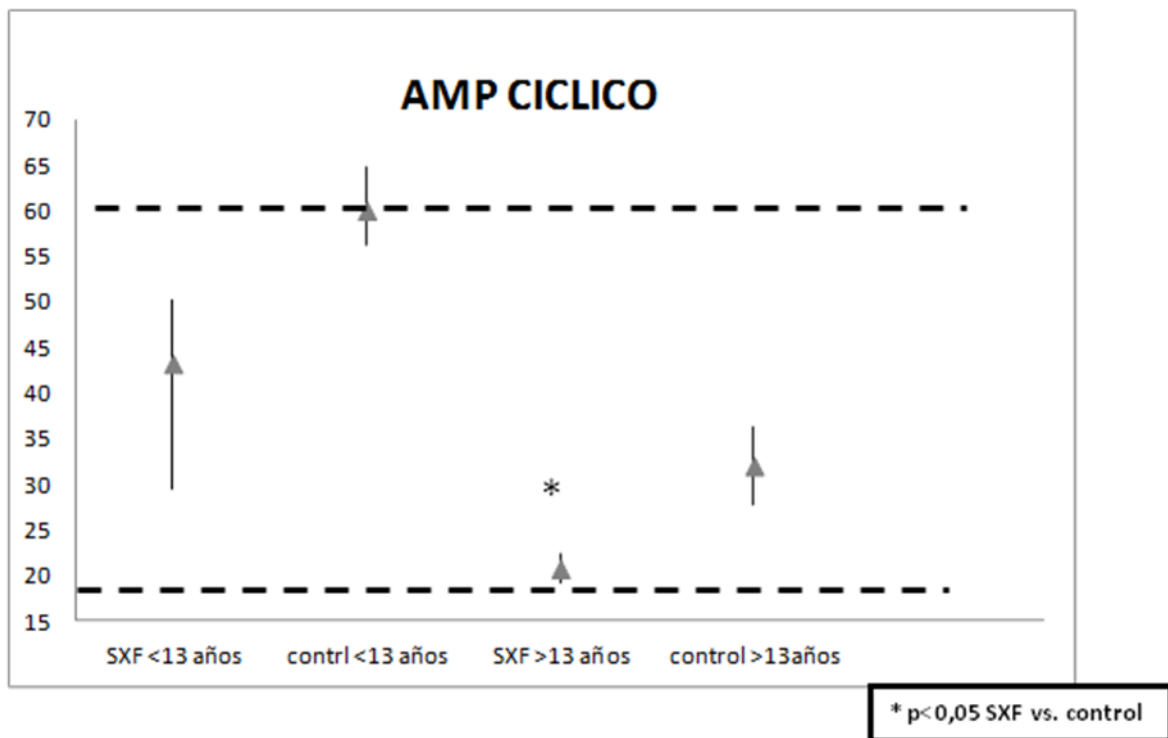
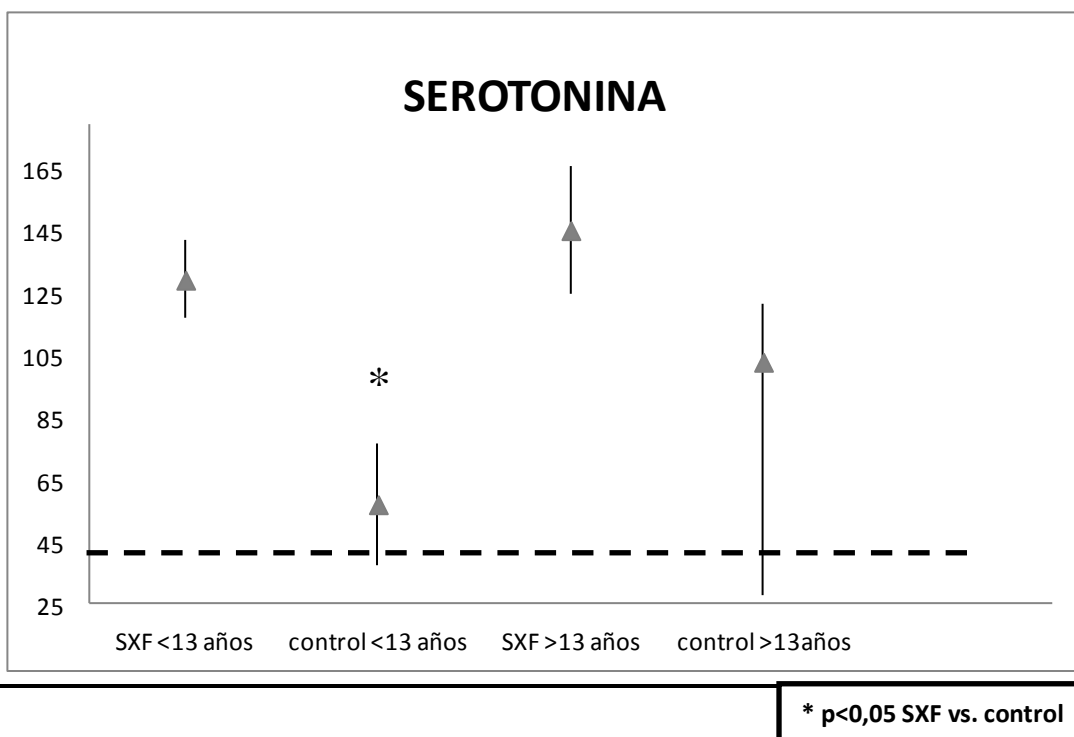


Figura 11: Representación gráfica de los valores de serotonina (ng/ml)



El AMP cíclico en general se encontró en mayor concentración en la sangre de los controles sanos y de manera significativa reducido desde el punto de vista estadístico en los participantes con SXF mayores de 13 años, en comparación con sus controles sanos. La serotonina se encontró en concentraciones mayores en la sangre de niños con SXF que en controles (figura 11). Son los menores de 13 años con SXF los que presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles sanos en relación con este neurotransmisor. En ambos casos, menores y mayores de 13 años, existen diferencias claras en los niveles de este neurotransmisor a nivel sanguíneo siendo mayores sus concentraciones en sangre de niños con SXF en nuestra muestra analizada.

NIVELES DE ANTIOXIDANTES EN SANGRE

Se ha buscado analizar en sangre posibles metabolitos relacionados con la acción antioxidante que pudieran estar disminuidos en las muestras de los participantes con SXF en relación con los controles.

En el grupo de antioxidantes de origen endógeno como hemos visto ya en la tabla 6 y en las figuras 8-11 se analizaron dentro del grupo de proteínas de alto peso molecular: transferrina, ceruloplasmina y albumina. Se encontraron diferencias destacables en las 2 primeras. También se han valorado otros metabolitos como AMP cíclico y serotonina. Entre los antioxidantes de origen exógeno y de bajo peso molecular se valoraron antioxidantes liposolubles como **vitamina E**, **vitamina A** e hidrosolubles como la **vitamina C**. Se han estudiados también minerales antioxidantes como Zinc y cobre. En la tabla 7 recogemos los datos referentes a vitaminas que fueron significativos. Los datos analizados se representan mostrando los valores medios y el error estándar de la media (figura 12-13).

Tabla 7. Valores de tocoferol (Vit E) y ácido ascórbico (Vit C) comparados y estratificados. Grupos preadolescentes y post adolescentes

	Tocoferol (mg/l) Suero (HPLC)	Ácido ascórbico (vit C) (mg/dl) Plasma (Espectrometría)
SXF (n=18)	9.25 ± 0.66	0.50 ± 0.11
Control (n=15)	9.44 ± 0.73	0.89 ± 0.15 *
SXF-preadolescente (n=10)	8.60 ± 0.63	0.69 ± 0.17
Control- preadolescente (n=8)	9.17 ± 0.80	0.50 ± 0.28
SXF-postadolescente (n=8)	10.20 ± 0.96	0.34 ± 0.08
Control- postadolescente (n=7)	9.66 ± 1.15	1.16 ± 0.28 **

* p<0,05 SXF vs. control

** p< 0,01 SXF vs. control

Figura 12. Representación gráfica de los niveles de ácido ascórbico (mg/dl) en sangre.

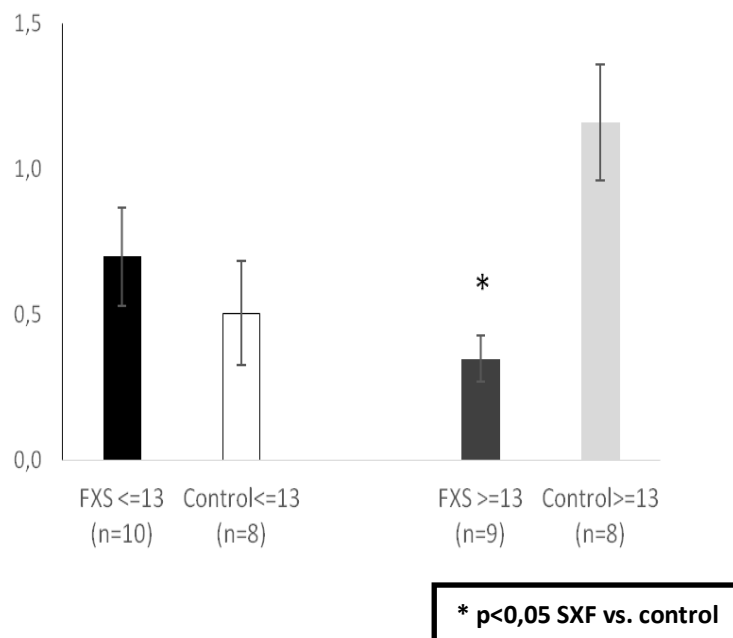
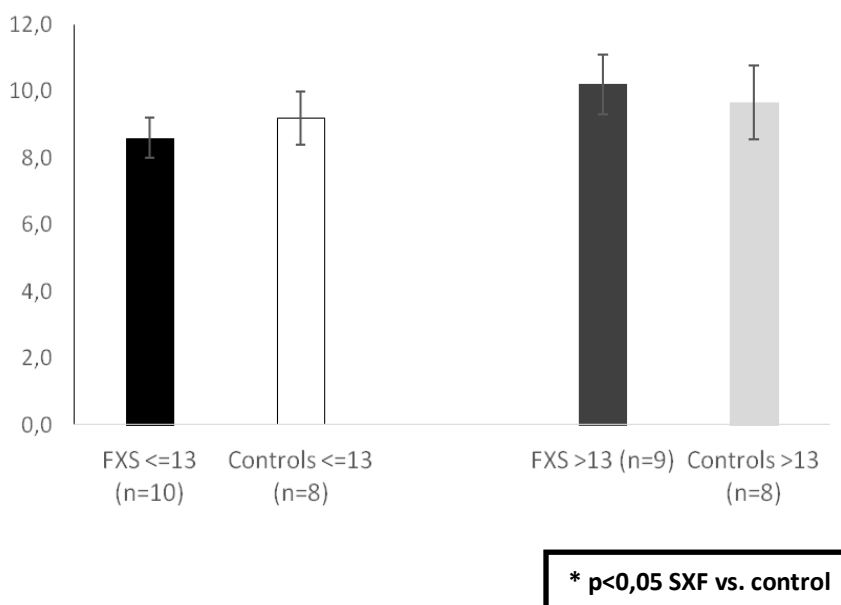


Figura 13. Representación gráfica de los niveles de tocoferol (mg /dl) en sangre.



HORMONAS RELACIONADAS CON ESTRES:

Ante la evidencia de que el estrés crónico es un elemento clave en la sintomatología de los pacientes SXF y, sabiendo que en la literatura se aprecian alteraciones en la función del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HPA) en pacientes sometidos a estrés (Hessl D. y cols., 2006; Roberts JE. y cols. 2009), hemos valorado algunos parámetros relacionados con la función del eje HPA y niveles de hormonas que se encuentran elevadas en pacientes con un alto nivel de estrés.

Se valoraron varios metabolitos con resultados discordantes entre el grupo control y el grupo de participantes con SXF, en los siguientes parámetros: **adrenalina, noradrenalina, Cortisol, ACTH y Hormona del crecimiento.**

Excepto la medición de la hormona del crecimiento que aparece reducida en participantes SXF preadolescentes y aumentada en postadolescentes, todos lo demás parámetros están aumentados en nuestra muestra de participantes con SXF preadolescentes, en relación con los controles sanos. Encontramos que la medición de adrenalina y ACTH también se encontró más elevada en pacientes SXF postadolescentes comparados con sus hermanos sanos. Las condiciones de extracción de la muestra fueron idénticas en todos los participantes, tanto en los afectos de SXF como en sus hermanos no afectos. Los datos analizados se representan en la tabla 8 que muestra los valores medios y el error estándar de la media.

Tabla 8. Niveles de hormonas relacionados con estrés valorados en nuestra muestra de sangre. Se valoran Adrenalina, noradrenalina, Cortisol, ACTH y H crecimiento. Representamos valores medios y SEM

	Adrenalina (ng/l) sangre (HPLC)	Noradrenalina (ng/l) sangre (HPLC)	Cortisol (mcg/dl) Suero (quimo luminiscencia)	ACTH (pg/ml) Plasma (RIA)	Hormona crecimiento (ng/ml) Suero (quimo luminiscencia)
SXF (n=18)	165.34 ± 40.81	650.41 ± 74.45	14.37 ± 1.79	50.34 ± 9.80	2.25 ± 0.82
Control (n=15)	71.06 ± 19.73 *	418.88 ± 50.65 *	12.02 ± 1.69	25.82 ± 1.02 *	2.40 ± 1.59
SXF preadolescente (n=10)	208.17 ± 55.72	808.10 ± 113.71	12.90 ± 0.93	44.79 ± 5.83	1.05 ± 0.36
Control- preadolescente (n=8)	46.30 ± 21.53 **	319.21 ± 56.37 *	8.58 ± 1.40 *	23.82 ± 1.94 *	3.86 ± 0.69 **
SXF postadolescente (n=8)	144.17 ± 21.41	521.32 ± 82.26	16.98 ± 3.14	53.47 ± 9.47	3.22 ± 0.75
Control- postadolescente (n=7)	90.88 ± 17.34*	602.40 ± 147.45	13.38 ± 1.62	30.04 ± 5.28 *	0.40 ± 0.25 **

* p<0,05 SXF vs. control

** p< 0,01 SXF vs. control

Figura 14. Niveles de adrenalina y noradrenalina indicando los valores estadísticamente significativos.

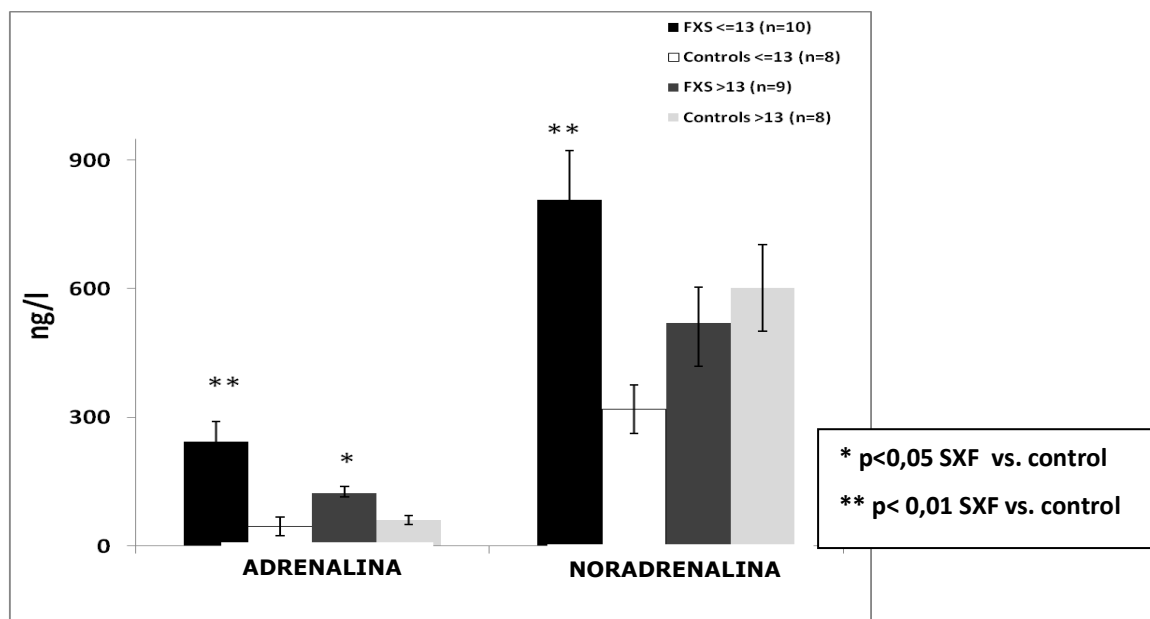
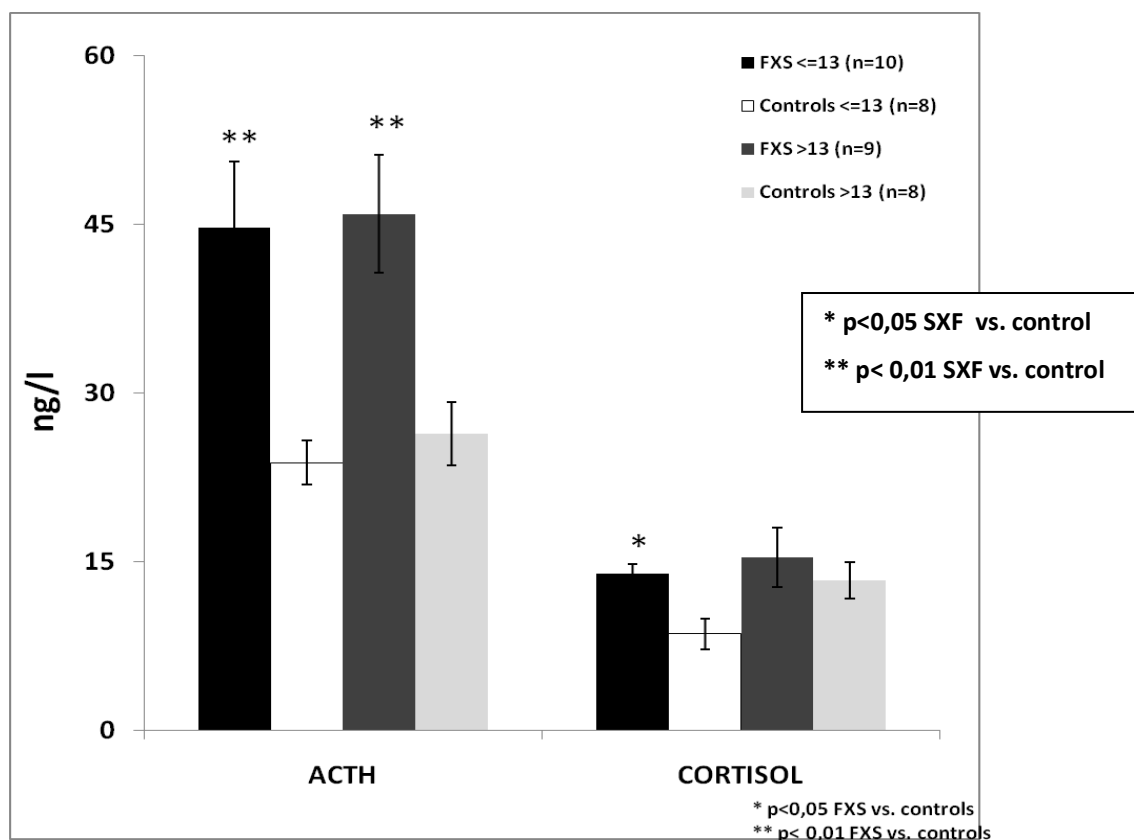


Figura 16. Niveles de cortisol y ACTH, indicando los resultados estadísticamente significativos



AMINOACIDOS (aa) EN SANGRE

Se evaluaron los resultados del análisis de aa en sangre comparando también nuestra muestra de pacientes-SXF con los controles hermanos-sanos. De todos los aminoácidos esenciales solo presentaron diferencias destacables cinco aa. Ácido aspártico, glicina, arginina, ornitina y lisina. En todos los casos las cantidades en sangre de estos AA eran mayores en controles que en SXF. Estas diferencias ocurrieron en todos los casos en participantes SXFs mayores de 13 años y fueron estadísticamente significativas con diferente grado de significación. Los datos analizados se representan en la tabla 9 que muestra los valores medios y el error estándar de la media, y representado en la figura 16.

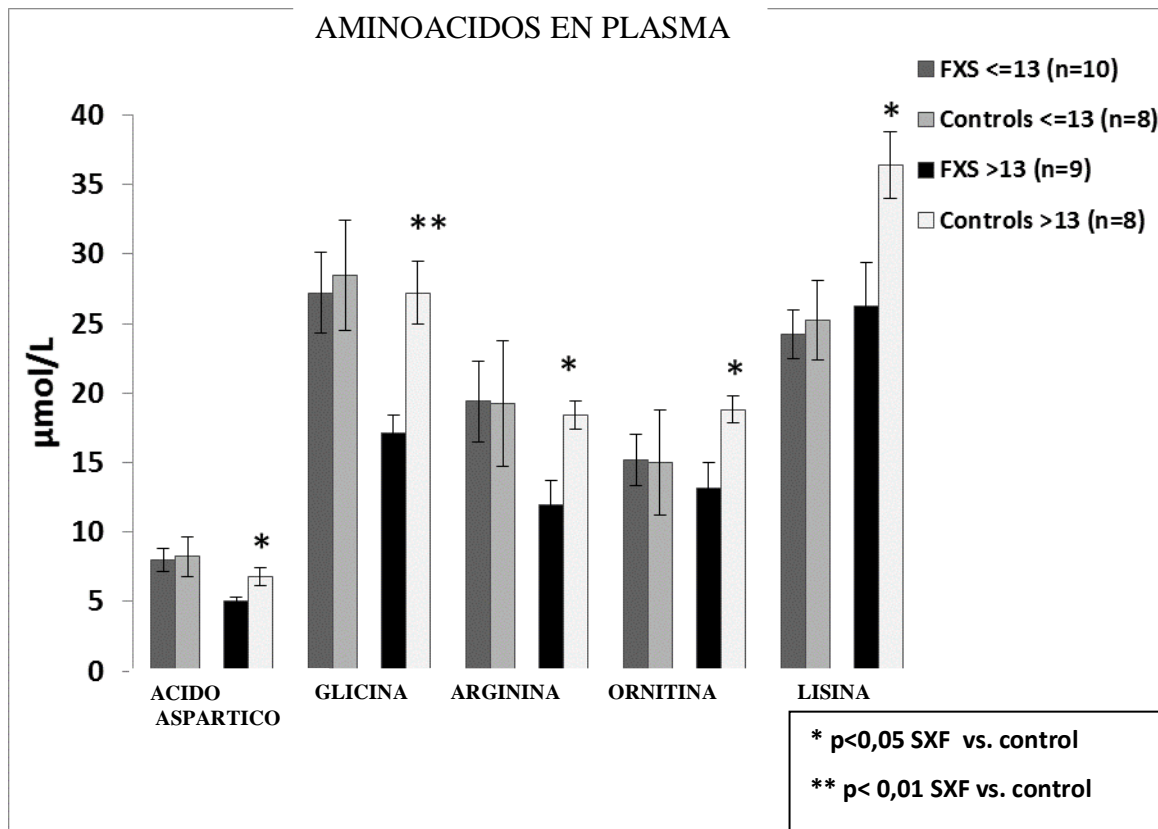
Tabla 9. Niveles plasmáticos de amino ácidos en suero en los que hay diferencia entre ambas muestras. Comparamos resultados de los participantes con SXF con los de participantes sanos.

	ACIDO ASPARTICO	GLICINA	ARGININA	ORNITINA	LISINA
SXF <=13 (n=10)	8,00 ± 0,85	27,20 ± 2.91	19,40 ± 2.91	15,20 ± 1.84	24,20 ± 1.74
Controles <=13 (n=8)	8,25 ± 1,43	28,50 ± 3.96	19,25 ± 4.49	15,00 ± 3.80	25,25 ± 2.86
P <=13 años	0,88	0,80	0,97	0,95	0,75
Controles >13 (n=8)	6,80 ± 0,34	27,20 ± 1.30	18,40 ± 1.71	18,8 ± 1.84	36,40 ± 3.10
SXF >13 (n=9)	5,0 * ± 0,66	17,14** ± 2.26	12,00* ± 1.02	13,14* ± 0.96	26,28* ± 2.37
P > 13 años	0,03	0,002	0,02	0,04	0,04

* p<0,05 SXF vs. control

** p<0,01 SXF vs. control

Figura 16. Niveles plasmáticos de amino ácidos en los que hay diferencia entre los grupos comparados.



PARTE B: ENSAYO CLINICO: TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES PARA EL SINDROME DE X FRAGIL

• CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACION

La segunda parte de nuestro estudio recoge los resultados del ensayo clínico autorizado para probar la eficacia de una combinación de antioxidantes (vitamina C y Vitamina E) en 30 participantes afectos de SXF. Se analizaron 2 grupos de participantes separados por edad. El grupo A (niños de 6 hasta 13 años) y el grupo B (mayores de 13 y hasta 18 años)

La media general de edad fue de 11.67 (+/- 4.2 años). Dentro del subgrupo que recibió tratamiento la media de edad fue de 12.13 (+/- 3.44 años) y dentro del subgrupo que recibió placebo 11.7 (+/- 4.86 años). No existían diferencias significativas de peso entre ambos grupos y todos los sujetos participantes eran varones.

En ambos grupos los valores de los test realizados al inicio del estudio son similares (Tabla 10) y tampoco existían comorbilidades evidentes que pudieran suponer diferencias significativas.

En nuestra muestra, el 80% de los controles y el 75% de los tratados mostraban un resultado del cuestionario de Connors dentro del rango de hiperactividad de acuerdo con los criterios de DSM-IV. En el grupo asignado a placebo el 45% de los participantes pertenece al rango grave de hiperactividad, mientras que en el grupo de tratamiento un porcentaje del 35% presenta hiperactividad grave, no estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa que pueda suponer sesgos. En el grupo tratado uno de los participantes asociaba epilepsia por lo que tomaba tratamiento antiepiléptico. Otras patologías también presentes en los participantes y que se especifican fueron: asma, trastorno obsesivo compulsivo y trastorno del espectro autista. La tabla 10 recoge los datos analizados en la población de estudio.

Tabla 10. Datos sociodemográficos de la muestra analizada, puntuación en la escala de Conners y condiciones medicas asociadas.

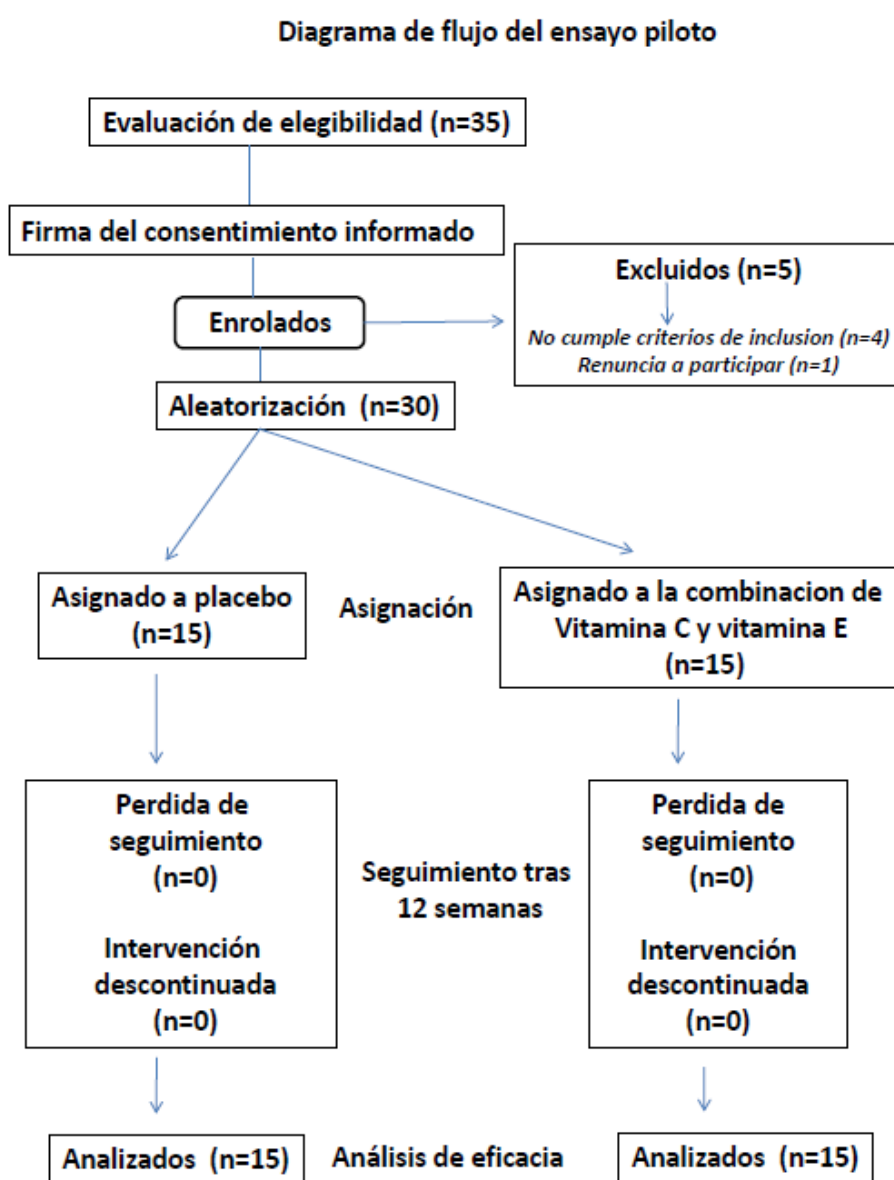
CARACTERISTICAS DE LOS PARTICIPANTES	TRATADOS (N =15)	PLACEBO (N =15)	TOTAL (N =30)
Edad (años) (M / SD)	12,1 (3,4)	11,7 (4,8)	11,6 (4,2)
Grupos de edad. N (%)			
6-13 años	8 (53,3)	8 (53,3)	16 (50)
>13-18 años	7 (46,6)	7 (46,6)	14 (50)
Sexo. n (%)			
Varón	15 (50)	15 (50)	30 (100)
Peso (M / SD)	53.2 (6.6)	50.9 (6.6)	52.1 (4.6)
Tratamiento psicofármacos. N (%)	9 (56.25)	7 (43.75)	16 (55)
Escala de Conners para padres (M / SD)			
• Hiperactividad/ impulsividad (DSMIV)	67.8 (12.1)	64.2 (12)	66 (12)
• Inatención (DSMIV)	63 (8.8)	62.2 (9.3)	61.3 (9)
Escala de Conners para profesores (M / SD)			
• Hiperactividad/ impulsividad (DSMIV)	62.8 (10.3)	64.7 (14.4)	63.7 (12.3)
• Inatención (DSMIV)	64.6 (6.7)	67.6 (8,1)	66.1 (7.5)
Condiciones asociadas. N (%)			
EPILEPSIA	1 (3,3)	0 (0)	1 (3,3)
ASMA	2 (6.6)	0 (0)	2 (6,6)
TEA	2 (6.6)	2 (6.6)	4 (13,2)
TOC	0 (0)	1 (3,3)	1 (3.3)

Nota: DSM-IV=manual diagnóstico estadístico de enfermedades mentales, 4th Edición; M=Media; SD=desviación estándar; n=número de participantes; %=porcentaje; TEA=trastorno del espectro autista; TOC: Trastorno obsesivo compulsivo.

• DISTRIBUCION DE GRUPOS DE ENSAYO Y ASIGNACIÓN AL AZAR

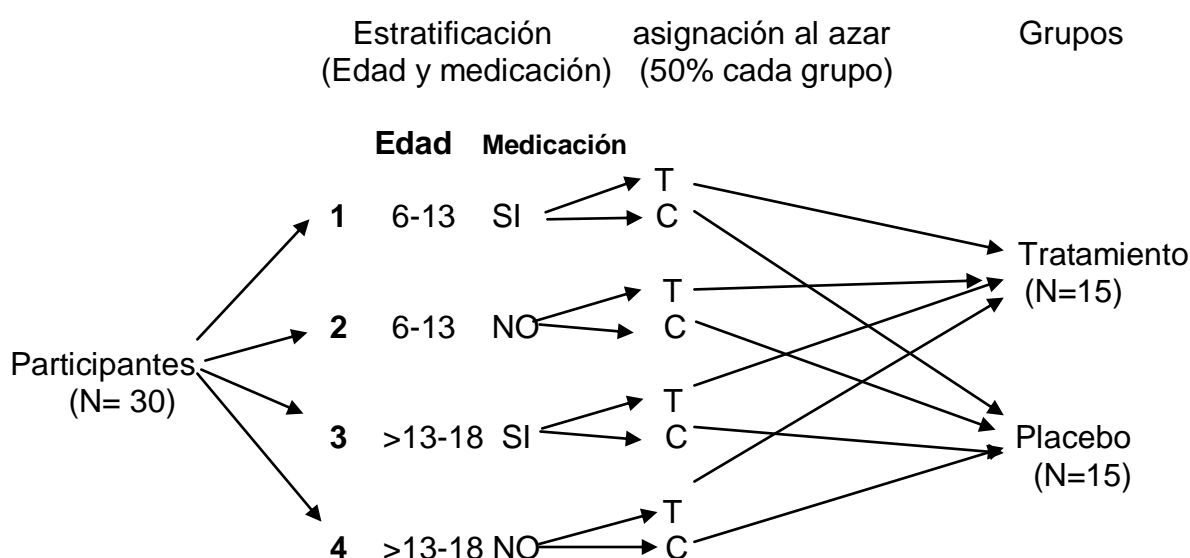
El modo de selección de participantes y su asignación al azar se puede ver en la figura 17. Para evitar sesgos asociados a la edad y a factores como la toma de medicación se estratificaron los grupos teniendo en cuenta ambos factores de confusión a la hora de aleatorizar los participantes en los grupos de placebo y tratamiento.

Figura 17. Diagrama de flujo del ensayo piloto.



Como ya hemos comentado, se asignaron dos grupos según la edad y en los casos en los que parecía haber diferencias significativas, por toma o no de psicofármacos en el momento del inicio del ensayo (figura 18). La división por edad se realizó siguiendo el ejemplo y recomendaciones de publicaciones previas (Hagerman RJ, 2002).

Figura 18. Criterios de aleatorización por bloques y estratificación por factores de confusión (edad y medicación concomitante)



• SEGUIMIENTO DE LOS PARTICIPANTES Y EFECTOS ADVERSOS OBSERVADOS.

Durante el ensayo se comunicaron reacciones adversas leves y de corta duración: 8 en el grupo placebo y 5 en el grupo de tratamiento. En 2 casos los participantes presentaron una reacción recidivante o intermitente y el resto fueron episodios únicos (Tabla 11). Estos eventos se comunicaron a través de contacto telefónico y fueron supervisados por un médico especialista. Se mantuvo una actitud vigilante en todos los casos y en ninguno de ellos estos problemas obligaron a la interrupción del tratamiento ni al abandono del ensayo.

En ocasiones, los síntomas observados podían deberse a otras circunstancias concomitantes pero se describen por su posible asociación a la toma de la medicación. Por tanto podemos concluir que para los participantes incluidos en nuestra muestra de tratamiento con combinación de antioxidantes, el tratamiento tiene muy buena tolerancia y no presenta efectos adversos significativos en comparación con el placebo.

Tabla 11: Efectos adversos recogidos en ambas series

	PLACEBO (n = 15)	TRATADOS (n = 15)
Diarrea	2	2
Nerviosismo	2	2
Vómitos	1	1
agresividad	1	0
irritabilidad	1	0
Erupción cutanea	1	0

• RESULTADOS DE EVALUACIONES NEUROPSICOLOGICAS

Se realizó una evaluación del cuestionario de Conners a padres y profesores al inicio y a las 12 semanas de inclusión en el estudio. También se evaluó en los participantes la Escala de Inteligencia de Wechsler para niños revisada (WISC-R) al inicio y tras esas 12 semanas. Como hemos comentado para la inclusión de los participantes precisamos una puntuación del cuestionario de Conners mayor de 55 (considerado límite de la normalidad).

1- Valoración de escala de Conners

De acuerdo con los resultados de la escala del cuestionario de Conners para padres, en relación con los resultados para el índice total de sintomatología TDHA-DSM-IV, encontramos que un total de 22 participantes presentaban síntomas de hiperactividad moderada-grave y el resto de hiperactividad leve. Si consideramos los casos de hiperactividad moderada-grave encontramos 10 participantes en el grupo tratado y 12 participantes en el grupo control. La respuesta al tratamiento a las 12 semanas es significativa ya que hemos obtenido resultados positivos en un 70 % de los participantes del grupo tratado (7/10), estos participantes redujeron el grado de severidad en el índice global de hiperactividad a un nivel inferior dentro de la clasificación antes reseñada tras 12 semanas de tratamiento. En el grupo placebo este porcentaje fue del 16.6 % (2/12) ($p < 0.05$). Estos resultados se analizaron por el test X^2 . La tabla 12 recoge los resultados de los análisis estadísticos de la población estudiada.

Tabla 12: Características de los participantes y respondedores según subgrupos. Los resultados de los test de hiperactividad mejoran tras el tratamiento de 12 semanas en el grupo tratado con antioxidantes tras un periodo de tratamiento de 12 semanas, (Test estadístico χ^2).

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	N	Numero de respondedores en el ensayo de 12 semanas/ participantes con síntomas moderado a grave		
		TRATADOS (N = 15)	PLACEBO (N = 15)	Significación estadística
Total	30	11/15	4/15	0.04
Grupo de edad:				
6-13 años	16	7/8	1/8	0.04
>13-18 años	14	4/7	3/7	ns
Escala de Conners para padres				
• Hiperactividad/impulsividad (DSM-IV)	22	7/10	2/12	0.04
• Inatención (DSM-IV)	21	5/9	4/12	ns
Escala de Conners para profesores				
• Hiperactividad/impulsividad (DSM-IV)	23	5/12	2/11	ns
• Inatención (DSM-IV)	26	8/13	2/13	ns

En la tabla 13 (subgrupo de 6 a 13 años) y tabla 14 (subgrupo de >13 hasta 18 años), se puede apreciar que la mejoría significativa en los parámetros de hiperactividad se observan sobre todo en el grupo de participantes de 6 hasta 13 años. Esta diferencia con el grupo al que se le suministro placebo es estadísticamente significativa sólo en el subgrupo de participantes más jóvenes. Los datos globales, aun sin significación estadística, son favorables en el grupo tratado con antioxidantes.

Tabla 13: Datos de los análisis de resultados del índice total sintomatología TDHA-DSM-IV en el cuestionario de Conners para padres en T0 y T1 para placebo y tratados, evaluación subgrupo participantes de 6 a 13 años.

grupo	Tiempo	Media	Error típico	Intervalo confianza 95%	
				Límite sup	Límite inferior
PLACEBO (n =8)	0	66.85	1.65	63.57	70.12
	1	63.88	2.16	59.58	68.19
TRATADOS (n =8)	0	68.70	1.75	65.23	72.18
	1	60.25*	2.30	55.68	66.81

Distribución normal. Análisis de la varianza por ANOVA de medidas repetidas comparando T0 *versus* T1 en tratamiento y placebo. * $p < 0,05$ tiempo 1 comparado con tiempo 0

Tabla 14: Datos de los análisis de los resultados de las evaluaciones del Índice total de sintomatología TDHA-DSM-IV en el cuestionario de Conners para padres comparando T0 y T1 para placebo y tratados, evaluación del subgrupo de participantes mayores de 13 a 18 años.

grupo	Tiempo	Media	SEM	Intervalo confianza 95%	
				Limite sup	Límite inferior
PLACEBO (n =7)	0	63.95	1.82	60.32	67.97
	1	53.13	2.40	48.36	57.90
TRATADOS (n =7)	0	67.65	1.68	64.12	70.99
	1	58.88	2.21	54.86	63.27

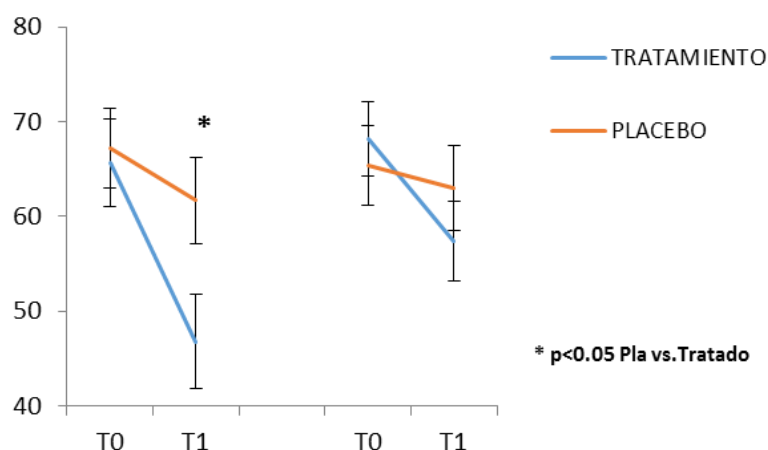
Distribución normal. Análisis de la varianza por ANOVA de medidas repetidas comparando T0 *versus* T1 en tratamiento y placebo.

En estas evaluaciones se valoran las respuestas de los padres. Indicamos en la figura 19 los resultados según las subescalas de índice total de sintomatología TDHA-DSM-IV separadas por edad. En edades más tempranas y, sobre todo, en el perfil hiperactivo se aprecia una diferencia estadísticamente significativa en los menores de 13 años tras 12 semanas de tratamiento. En los resultados de los análisis para

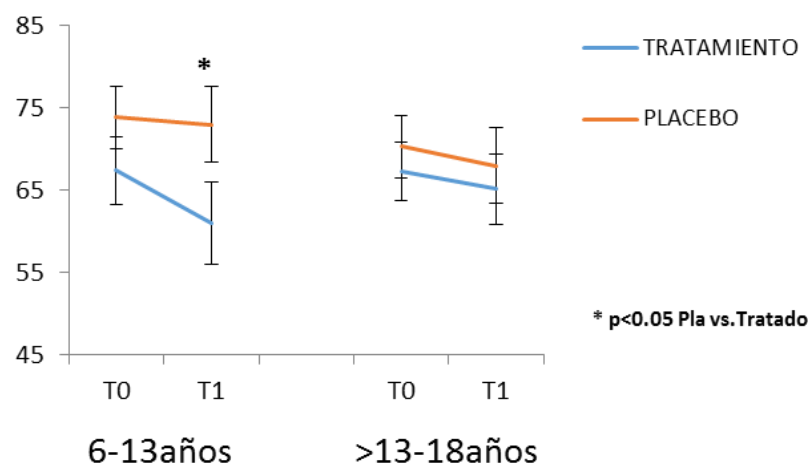
mayores de 13 años se observa un marcado efecto placebo que favorece el no obtener resultados estadísticamente significativos en este subgrupo de edad. Se puede apreciar que la mejoría significativa en los parámetros de hiperactividad Índice total se observan sobre todo en el grupo de participantes de 6 a 13 años.

Figura 19: Gráfica representativa de la valoración tras 12 semanas de tratamiento en la **Escala de Conners para padres y profesores, índice total de sintomatología TDHA según DSM-IV**. Primer grupo participantes de 6 a 13 años y segundo grupo mayores de 13 a 18 años. * $p < 0.05$ placebo vs. Tratamiento en T1. ANOVA de medidas repetidas

Escala Conner's padres.



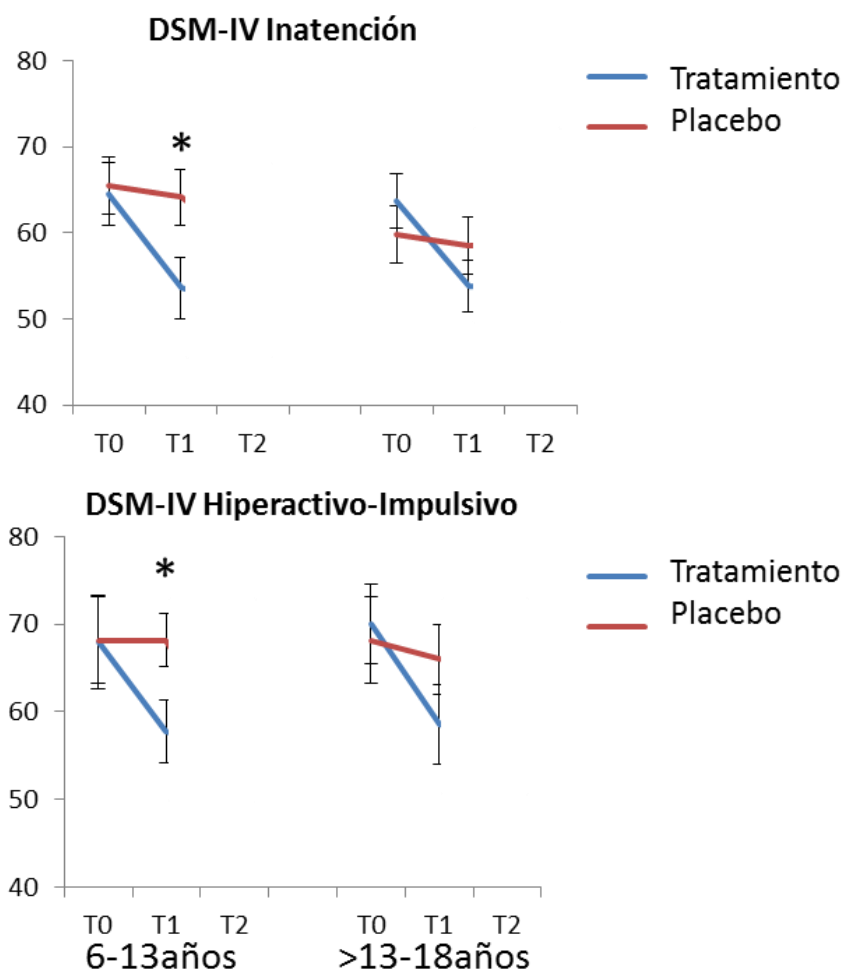
Escala Conner's profesores



En la figura 20, mostramos la gráfica de los resultados de las subescalas de inatención y de hiperactivo-Impulsivo según DSM-IV para padres separadas por grupos de edad. En edades más tempranas y, sobre todo, en la subescala de inatención y en hiperactividad-impulsividad se aprecia una diferencia estadísticamente significativa el grupo de participantes de 6 a 13 años tras 12 semanas de tratamiento. En los resultados de los análisis para mayores de 13 años no se observa diferencias estadísticamente significativas.

Figura 20: Gráfica representativa de la valoración tras 12 semanas de tratamiento en la **Escala de Conners para padres, índice de inatención y el índice de hiperactivo-impulsivo según DSM-IV**. Primer grupo participantes de 6 a 13 años y segundo grupo mayores de 13 a 18 años. * $p < 0.05$ placebo vs. Tratamiento en T1.

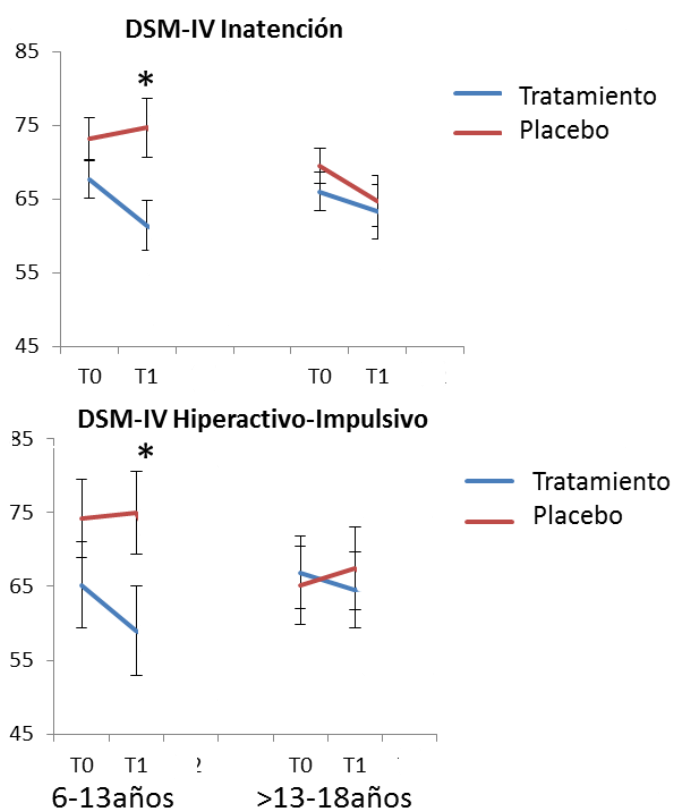
Escala Conner's padres



Indicamos, en la figura 21, los resultados según las subescalas inatención y hiperactivo-impulsivo según DSM-IV para profesores, separadas por edad. En los resultados de los análisis estadísticos para mayores de 13 años no se observa diferencias estadísticamente significativas en este subgrupo de edad. Se puede apreciar que la mejoría es significativa en los parámetros sobre todo en el grupo de participantes de 6 a 13 años

Figura 21: Gráfica que representa la valoración tras 12 semanas de tratamiento en la Escala de Conner's para profesores, índice inatención y el índice hiperactivo-impulsivo según DSM-IV. Primer grupo participantes de 6 a 13 años y segundo grupo mayores de 13 a 18 años. * $p < 0.05$ placebo vs. Tratamiento en T1. Análisis ANOVA medidas repetidas.

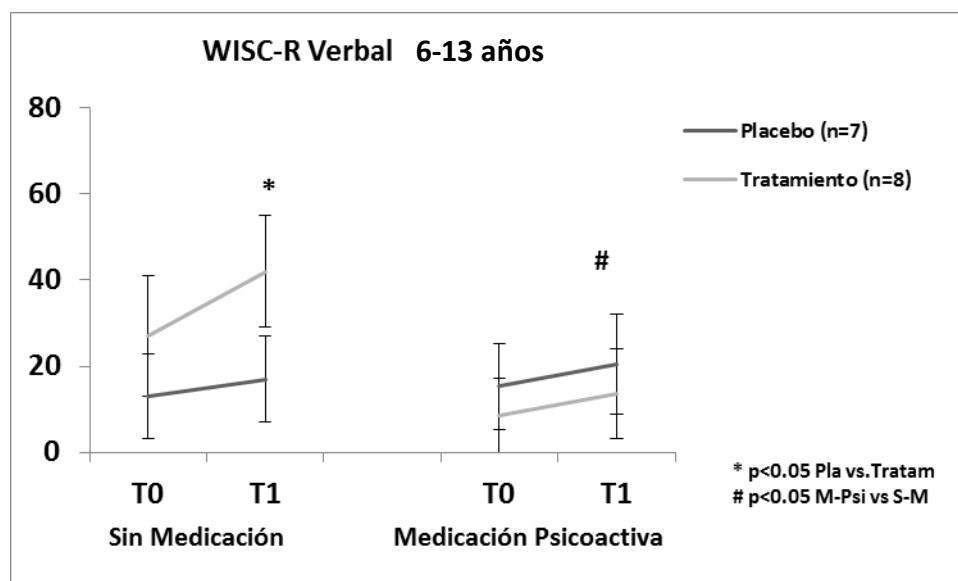
Esacala Conner's profesores



2- Valoración de Escala de WISC-R

La escala de WISC-R es una extensa batería para valorar perfil cognitivo de los individuos, esta validada y muy ampliamente usada en discapacidad intelectual. La evaluación de los casos se realizó siempre por el mismo examinador para evitar la variabilidad interjueces. Los resultados de mejoría son evidentes en el grupo de participantes de 6 a 13 años, a nivel de escala verbal (figura 22) y en la escala manipulativa (Figura 23). Esta mejoría es evidente en aquellos sin medicación concomitante. En la escala manipulativa se obtienen resultados estadísticamente significativos en ambos rangos de edad solo en aquellos que no tenían medicación concomitante.

Figura 22. Graficas de resultados de la escala verbal del test de WISC-R después de 12 semanas de tratamiento, controladas con placebo, en los grupos de 6-12 años (superior) y de 13-18 años (inferior). Estratificados según tomen o no medicación concomitante.



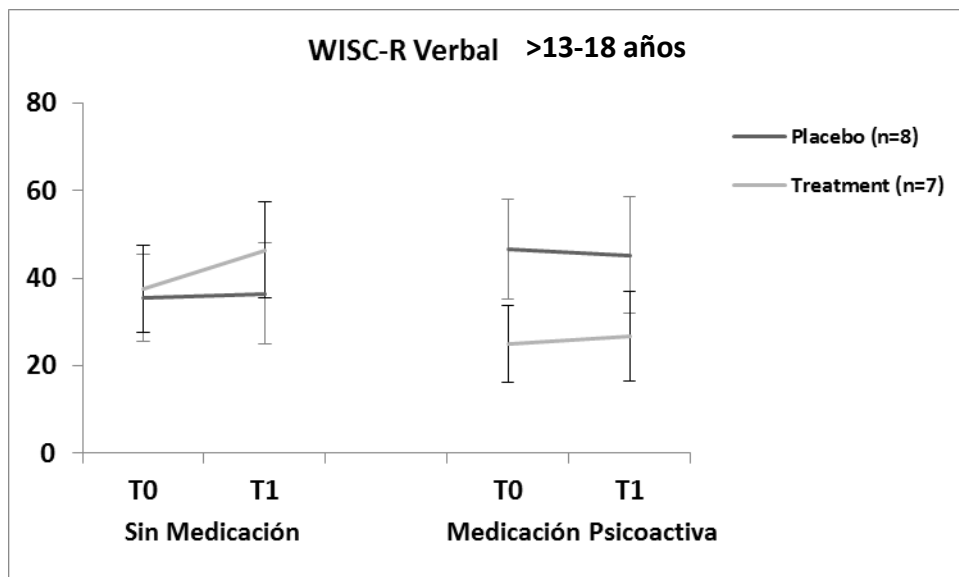
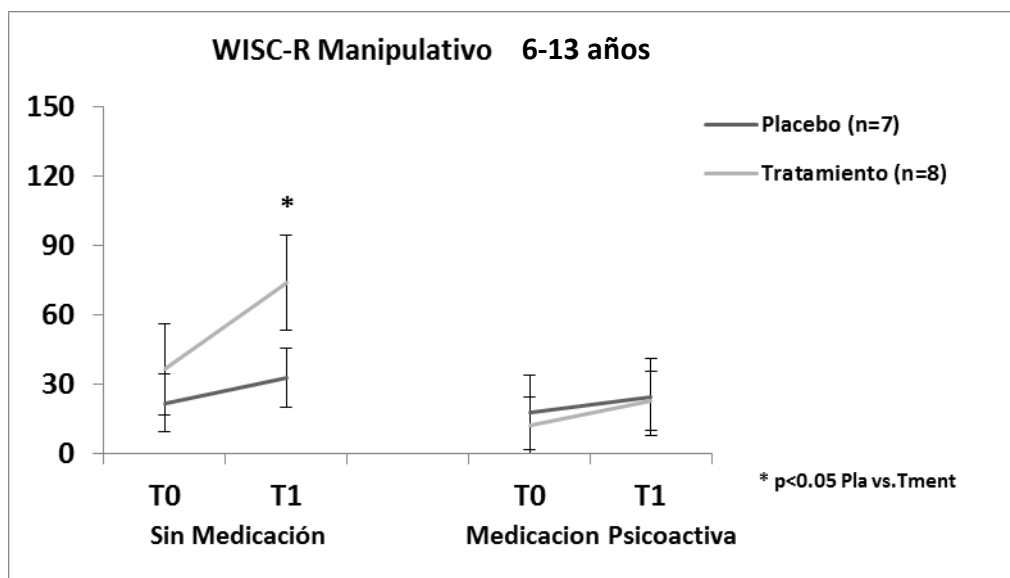
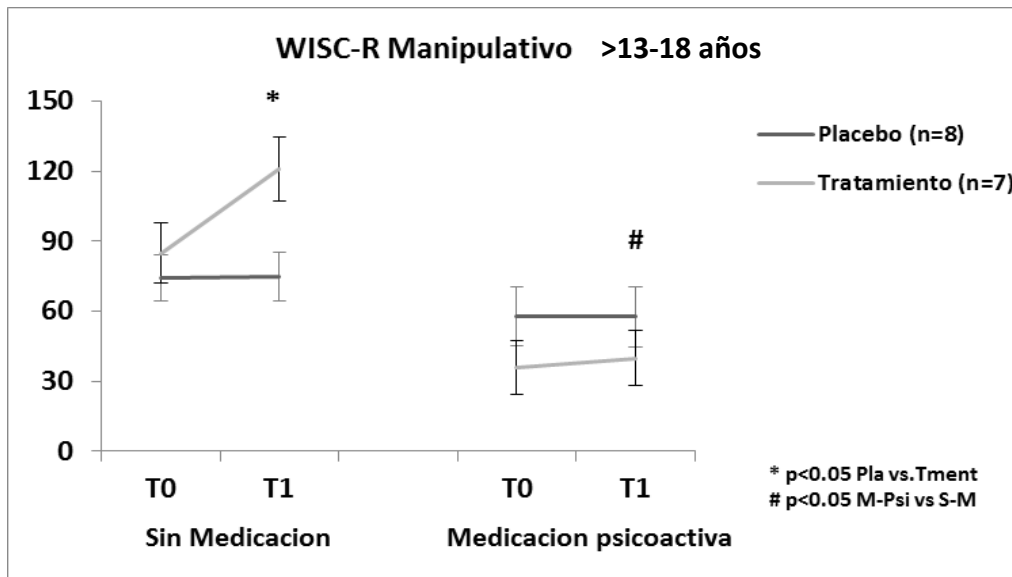


Figura 23. Resultados de la escala manipulativa del test de WISC-R después de 12 semanas de tratamiento, controlado con placebo, en los grupos de 6-13 años (superior) y de >13-18 años (inferior). Estratificados según tomen o no medicación concomitante.





3- Inventario de Comportamientos en el Desarrollo (DBC-P 24)

El test DBC-P24 (Taffe JR, 2007) es una forma corta de 24 ítems, derivada del test original más extenso, que se completa por padres y cuidadores. Intenta valorar una medida aproximada global del estado cognitivo y conductual de los participantes en el ensayo. Tiene un buen perfil de sensibilidad y especificidad en relación a test más largos.

Con respecto a los resultados de este test se observó una tendencia clara sin llegar a ser estadísticamente significativa ($p= 0.07$) a la mejoría, con una disminución de los valores registrados en el inventario tanto en el índice global como en la subescala de problemas de comportamiento, cuando se comparó el grupo de tratamiento al inicio (basal T0) con la evaluación a las 12 semanas del ensayo (T1) en este grupo tratado con la combinación de antioxidantes.

La escala global se ajustó con una distribución normal, por lo que se realizó un test ANOVA de medidas repetidas comparando T0 *versus* T1 en tratamiento y placebo, los resultados se recogen en la tabla 15

Tabla 15: Resultados del análisis del índice global de escala DBC-P24 Distribución normal. ANOVA de medidas repetidas comparando T0 versus T1 en tratamiento

Grupo de intervención	Evaluación	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Placebo N=15	T0	36,91	4,41	27,86	45,96
	T1	38,06	4,62	28,56	47,55
Tratamiento N=15	T0	50,28	4,40	41,23	59,33
	T1	43,73*	4,27	34,24	53,23

* $p<0,07$

En la subescala de problemas de relación social la distribución de los resultados no se ajustaba a una distribución normal por lo que se ha realizado un análisis no paramétrico con la prueba U Mann-Whitney comparando T0 con T1 en los participantes con tratamiento. Se observa una reducción significativa ($p < 0.05$) de los problemas sociales tras el tratamiento con vitaminas antioxidantes. Los resultados pueden observarse en la tabla 16 que representa la media en cada grupo junto al error estándar de la media y los intervalos de confianza.

Tabla 16: Resultados de la Subescala “problemas de relación social” de la DBC-P24. Los datos no se ajustan a la distribución normal. Análisis no paramétrico prueba U Mann-Whitney comparando T0 versus T1 en tratamiento

Grupo de intervención	Evaluación	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Placebo N=15	T0	4,25	0,84	2,34	5,16
	T1	3,87	0,70	2,23	4,51
Tratamiento N=15	T0	5,14	0,68	3,58	6,76
	T1	3,03 *	0,54	2,37	5,10

* $p < 0,05$

4-Índice general de bienestar psicológico (PWBG)

Para comprobar si el tratamiento de los participantes podría repercutir de alguna forma en el bienestar de los padres, se recogió la escala del Índice global de bienestar psicológico al inicio y a las 12 semanas de tratamiento. Los resultados pueden observarse en la tabla 17 que representa la media en cada grupo junto al error estándar de la media y los intervalos de confianza. Donde detectamos una mejora significativa en el grupo de tratamiento en comparación con placebo.

Tabla 17: Resultados de la valoración de la escala de bienestar general psicológico en familiares

Grupo de intervención	Evaluación	Media	Error estándar de media	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Placebo N=15	T0	73,53	3,04	72,47	81,68
	T1	75,53	3,03	71,48	80,68
Tratamiento N=15	T0	67,55	2,76	61,99	73,10
	T1	60,93*	2,76	55,380	66,48

* $p < 0,05$ ANOVA medidas repetidas comparando T0 versus T1 en tratamiento

- **RESULTADOS ANALITICOS RELEVANTES**

Durante el ensayo se han realizado dos determinaciones analíticas completas incluyendo sangre y orina de todos los sujetos participantes. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los resultados analíticos más generales de los parámetros medidos para analizar hematología, funcionamiento hepático, renal, etc.

Lo más significativo se refleja a continuación:

Niveles de antioxidantes en sangre

Destacamos la elevación en sangre de las dos vitaminas administradas lo que demuestra una buena biodisponibilidad de la medicación con las dosis administradas en el ensayo. Consiguiendo en sangre niveles dentro del rango de la normalidad pero mayores que los basales con 12 semanas de tratamiento.

VITAMINA C:

Se observa el ascenso exponencial de niveles plasmáticos de Vit-C en sangre de los participantes en el grupo tratado. Los niveles de vitamina C en estadio basal estaban por debajo de la media normal para la edad en los participantes con Síndrome X frágil en este ensayo, al igual que los datos aportados en nuestro estudio previo. Los valores aumentaron exponencialmente con la administración del tratamiento, que aportaba una dosis superior a las recomendaciones diarias de ambas vitaminas según la RDA. Los resultados pueden observarse en la tabla 18 que representa la media en cada grupo junto al error estándar de la media y los intervalos de confianza.

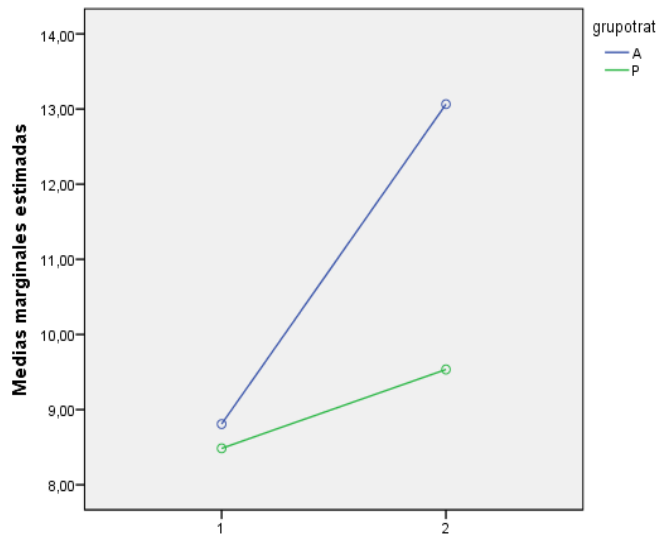
Tabla 18: Resultados de los niveles de vit C en plasma en estadio basal y tras completar el tratamiento o placebo durante 12 semanas.

Grupo tratamiento	Tiempo	Media Vit C (mg/l)	Error estándar de la media	Intervalo confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Placebo (N=15)	T0	8,48	0,81	6,81	10,15
	T1	9,53	0,91	7,66	11,40
Tratamiento (N=14)	T0	8,80	0,81	7,13	10,48
	T1	13,06*	0,91	11,19	14,93

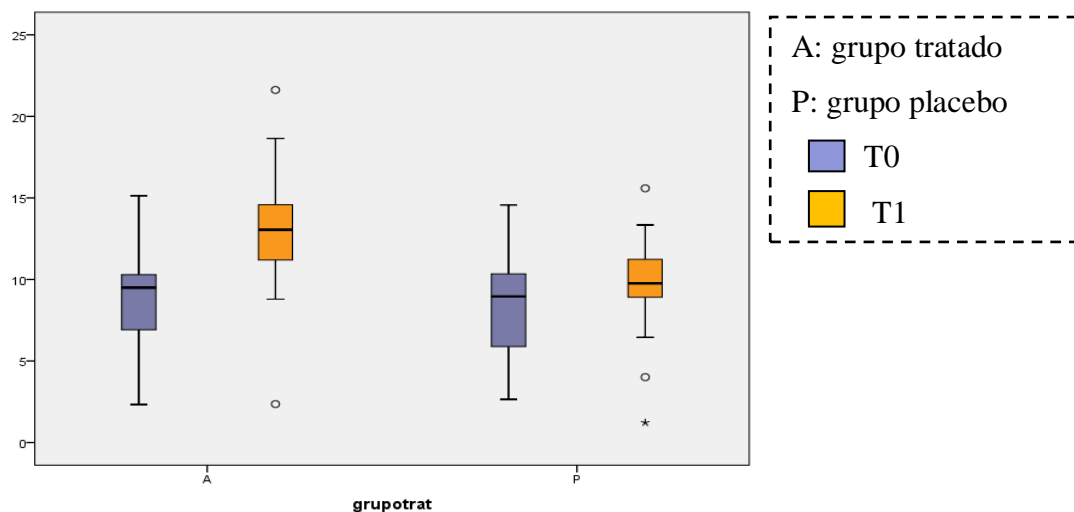
*p< 0,05 ANOVA medidas repetidas comparando T0 versus T1 en tratamiento

Figura 24: Gráfico de resultados de niveles de vit C en sangre en participantes SXF tratados con medicación o placebo. Gráfico A diagrama de comparación del análisis ANOVA de medidas repetidas, representando los resultados; grupos A= tratado P= placebo; evaluaciones 1= T0, 2=T1. Gráfico B diagrama de cajas (A = tratamiento. P= Placebo. Color morado=T0 Color Naranja= T1).

A



B



VITAMINA E:

Los niveles de vitamina E aumentaron exponencialmente con la administración del tratamiento durante 12 semanas, que aportaba una dosis superior a las recomendaciones diarias de la vitamina según la RDA. Los resultados pueden observarse en la tabla 19 que representa la media en cada grupo junto al error estándar de la media y los intervalos de confianza.

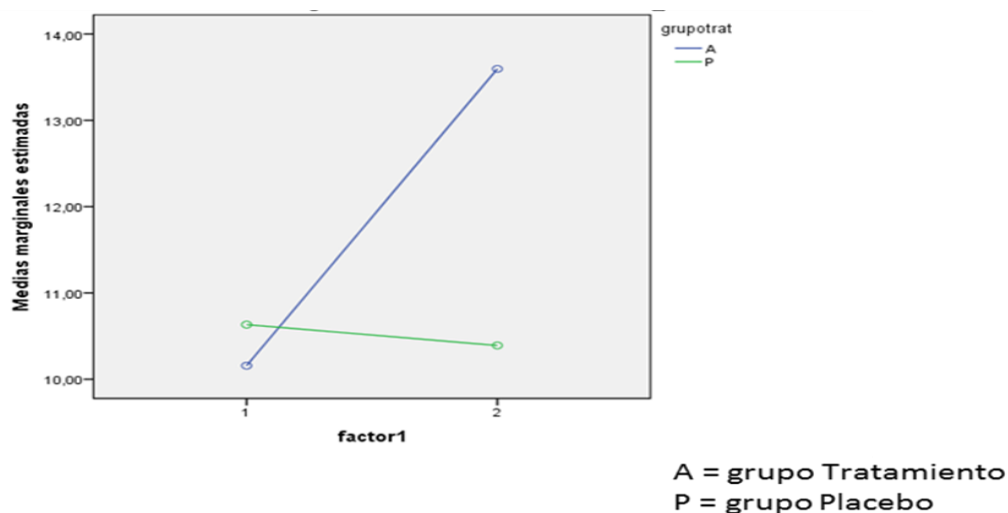
Tabla 19: Niveles de Vit-E en plasma en estadio basal y tras completar 12 semanas en tratamiento o placebo.

Grupo tratamiento	Evaluación	Media Vit E (mg/L)	Error estándar de la media	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Placebo (n=15)	T0	10,63	0,51	9,57	11,68
	T1	10,39	1,01	8,30	12,47
Tratamiento (n= 14)	T0	10,15	0,53	9,06	11,24
	T1	13,59*	1,05	11,43	15,75

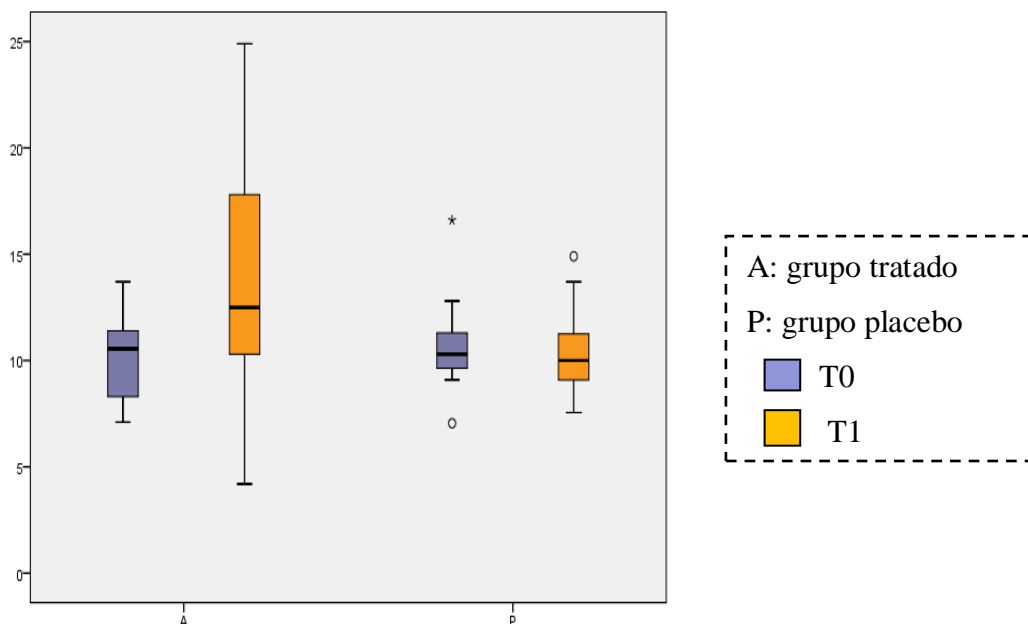
*p< 0,05 ANOVA medidas repetidas comparando T0 versus T1 en tratamiento

Figura 25: Gráfico de resultados de niveles de vit E en sangre en participantes SXF tratados con medicación o placebo tras 12 semanas de tratamiento. Se observa el ascenso exponencial de niveles plasmáticos de vitamina E en sangre de los participantes en el grupo tratado. Gráfico A diagrama de comparación del análisis ANOVA de medidas repetidas, representando los resultados; grupos A= tratado P= placebo; evaluaciones 1= T0, 2=T1. Gráfico B diagrama de cajas (A = tratamiento. P= Placebo. Color morado=T0 Color Naranja= T1).

A



B



Niveles de metabolitos de estrés oxidativo y eje HPA

Dentro de todos los parámetros analizados solo han resultado significativos los cambios en niveles de dos metabolitos en orina. Adrenalina, que como ya sabíamos de estudios previos puede estar muy elevada en nuestros niños con SXF, y el ácido homovanílico. Este último es un metabolito del catabolismo de catecolaminas (dopamina). Ambos han presentado un descenso significativo en orina en relación con el estadio basal. Los niveles de ambas muestras en estadio basal estaban elevados en T0 y, posteriormente, se encontraban dentro del límite superior de la normalidad. Los resultados que se estiman normales pueden observarse en la tabla 20 que representa los rangos para cada valor.

Tabla 20: Catecolaminas en orina, niveles normales en niños

	3-8 años	9-12 años	13-17 años	Adultos
Dopamina (mcg/24 hr)	80-378	51-474	51-645	52-480
Adrenalina (mcg/24 hr)	1-7	≤8	≤11	2-14
Noradrenalina (mcg/24 hr)	5-41	5-50	12-88	15-100
ácido Homovanílico (mg/24 hr)	0.5-6.7	1.1-6.8	1.4-7.2	1.6-7.5
ácido Vanil mandelico (g/24 hr)	≤2.3	≤3.4	≤3.9	≤6.0

(Extraído de Blondell R, y cols., 1999)

ADRENALINA:

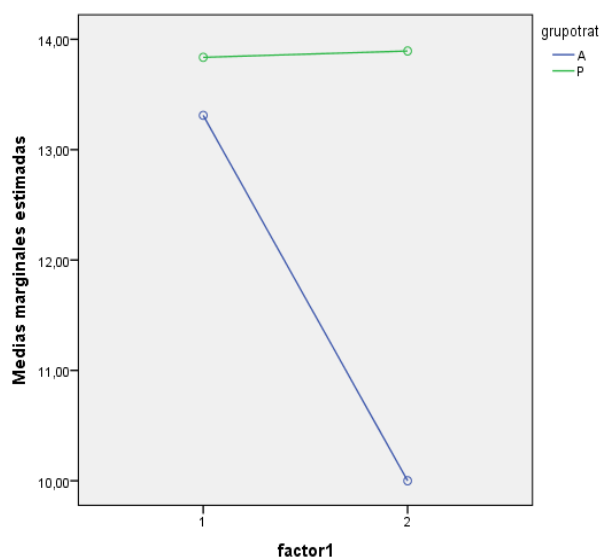
Los niveles de adrenalina en orina de 24 horas disminuyeron significativamente en los participantes tratados en relación con el grupo control. En el estadio T0 son superiores a los valores normales en orina en niños normales en todos los rangos de edades. En T1 entran dentro del límite superior de la normalidad en los rangos de edad. No varían los niveles en los individuos dentro del grupo placebo. Los resultados pueden observarse en la tabla 21 que representa la media en cada grupo junto al error estándar de la media y los intervalos de confianza. En este caso este descenso es estadísticamente significativo.

Tabla 21 Valores de adrenalina en orina de 24 horas en la muestra de 30 participantes del ensayo. En situación basal (T0) y tras 12 semanas de seguimiento (T1) con medicación o con placebo.

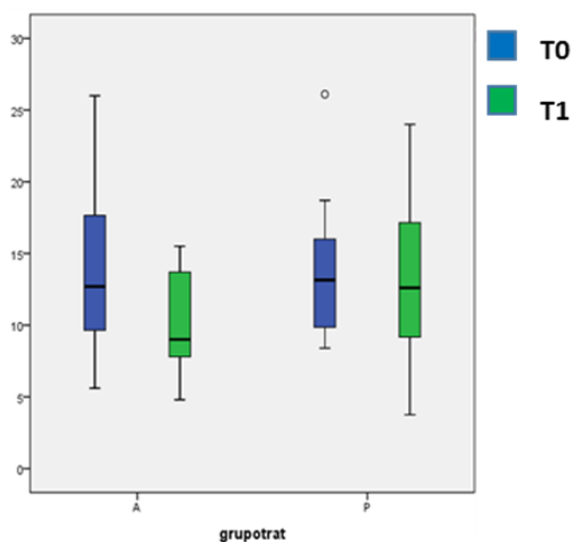
Grupo tratamiento		Media Mcg/día	Error típico.	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Tratados	T0	13,31	1,34	10,56	16,06
	T1	10,00	1,62	7,30	12,70
Placebo	T0	13,83	1,27	11,08	16,58
	T1	13,89	1,03	11,19	16,59

Figura 26: Grafica de resultados de niveles de adrenalina en orina en participantes SXF tratados con medicación o placebo tras 12 semanas de tratamiento. Se observa el descenso exponencial de niveles de adrenalina en orina de los participantes en el grupo tratado. Gráfico A: diagrama de comparación del análisis ANOVA de medidas repetidas, representando los resultados; grupos A= tratado P= placebo; evaluaciones 1= T0, 2=T1. Gráfico B: diagrama de cajas.

A



B



A = grupo Tratamiento
P = grupo Placebo

ÁCIDO HOMOVANÍLICO EN ORINA

Se observa una disminución significativa del marcador ácido homovanílico en orina en los participantes en tratamiento del grupo de edad de 6 a 13 años cuando los resultados de la evaluación al inicio (basal=T0) se compararon con la evaluación a las 12 semanas del ensayo (T1), en participantes tratados con la combinación de antioxidantes. Los valores estaban elevados en todos los participantes en estado basal por encima de los valores normales para la edad. Tras las 12 semanas de tratamiento el descenso lleva a los valores al límite superior de la normalidad. Presenta una distribución normal por lo que el análisis de la varianza se realizó por ANOVA de medidas repetidas. Los resultados que se han encontrado pueden observarse en la tabla 22 que representa la media en cada grupo junto al error estándar de la media y los intervalos de confianza.

Tabla 22: Valores de ácido homovanílico en orina de 24 horas en la muestra de 30 participantes. En situación basal (T0) y tras 12 semanas de seguimiento (T1) con medicación o con placebo.

grupo de edad	grupo intervención	evaluación	Media	Error típico	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
6-13años N=16	Placebo N=8	T0	10,50	2,34	4,289	13,919
		T1	7,81	1,11	4,516	9,104
	Tratamiento N=8	T0	12,84	2,34	10,229	19,859
		T1	6,77 *	1,11	5,477	10,065
>13-18 años N=14	Placebo N=7	T0	8,27	2,06	6,13	16,42
		T1	5,60	1,35	3,14	8,05
	Tratamiento N=7	T0	6,99	2,31	1,85	12,14
		T1	5,38	1,19	2,93	7,84

Distribución Normal. ANOVA de medidas repetidas. * $p < 0,05$. Grupo de edad 6-13 años, comparando T0 y T1 en participantes del grupo control y tratamiento.

DISCUSIÓN

PARTE A. PATRÓN BIOQUIMICO EN INDIVIDUOS SXF COMPARADO CON SUS HERMANOS SANOS

Como hemos ya comentado, para esta colaboración finalmente se reclutaron 33 participantes varones. 18 de ellos eran niños con SXF y 15 controles sanos, hermanos de los participantes. Se han analizado tanto los datos de todos los participantes globales, como los resultados apareados de los participantes y hermanos como controles. Finalmente estos datos apareados no aparecen en el estudio por no aportar mayor significación estadística. Son muy poco frecuentes los estudios que comparan datos en SXF con hermanos sanos por lo que aumenta el interés del estudio, a pesar de ser una muestra pequeña, como es habitual en las enfermedades de baja prevalencia.

Inicialmente evaluamos datos epidemiológicos y clínicos en nuestros participantes, como la presencia o no de características del fenotipo conductual propias del SXF, que pueden estar relacionadas con un aumento del estrés oxidativo (hiperactividad, fenotipo autista). También se recogieron datos de la toma de medicación. Ninguno de los controles presentaba características psicológicas del síndrome y tampoco tomaban medicación. Esto puede suponer un sesgo en nuestros hallazgos ya que la toma de medicación podría alterar algunos de los marcadores en los resultados de la analítica. Sin embargo, en la ficha técnica de ninguno de estos fármacos indica que puedan alterar los valores analíticos que han resultado estadísticamente significativos en nuestros participantes.

Entre los fármacos más empleados en nuestra muestra se registraron los Antipsicóticos (risperidona y aripiprazol) en 5 participantes, usados en participantes postadolescentes en los que prima los trastornos del comportamiento. Ansiolíticos (benzodicepinas) en 3 participantes. Psicoestimulantes (metilfenidato) en 6 participantes, sobre todo, en preadolescentes en los que, como se recoge en nuestra serie, son más

importantes los trastornos en relación con actitud hiperactiva e inatenta y en los que es habitual el uso de este tipo de medicación.

El estimulante más usado, metilfenidato no recoge en ficha técnica alteraciones en parámetros de la analítica. Actúa sobre receptores dopaminérgicos pero en ensayos clínicos no parece alterar el eje HHA (Seibert J, y cols., 2014; Castellanos FX y cols., 2011). Con respecto a los antipsicóticos, la risperidona, el más usado por nuestros participantes, puede alterar los valores de las siguientes determinaciones analíticas: aldosterona y prolactina, pero no refiere alteración de los parámetros que hemos estudiado en nuestra muestra. Con respecto a los ansiolíticos, las benzodiacepinas que tomaban los participantes pueden descender niveles de adrenalina y noradrenalina, efecto que no se ha tenido en cuenta en este estudio ya que el número de participantes que tomaban ansiolíticos era muy reducido solo 3 casos de los 18 participantes con SXF, por lo que entendemos que es poco probable que el resultados alcanzado este sesgado por este supuesto.

Hemos dividido a nuestra población en 2 grupos separados por edad, según las recomendaciones de trabajos previos. Se ha evidenciado en múltiples estudios que las características fenotípicas y las respuestas farmacológicas a ciertos tratamientos e intervenciones son diferentes en preadolescentes y postadolescentes. La edad de corte se ha decidido en 13 años, similar a la referida en otras investigaciones. (Hagerman RJ, 2002)

Con respecto al hemograma, nuestro grupo de participantes con SXF muestra un descenso de la hemoglobina corpuscular media y del volumen corpuscular medio contrario a lo que ya habían descrito antes en pacientes con SXF (Langenbeck U. y cols. 1984), aunque este hallazgo no ha podido ser reproducido en modelo animal para el SXF (Reyniers E, y cols., 1996). Este hallazgo solo ocurre en nuestro caso en los niños mayores de 13 años donde la diferencia de volumen y

hemoglobina corpuscular media es estadísticamente significativa. No se aprecian diferencias en otros parámetros del hemograma, ni en la serie blanca ni en plaquetas.

El análisis bioquímico básico tampoco refleja diferencias significativas entre ambas muestras (participantes SXF y hermanos sanos) a pesar de que en individuos que sufren estrés crónico, propio del fenotipo SXF, es habitual encontrar alteraciones en glucemia y perfil lipídico (Tsigos. Y cols., 2002).

En la búsqueda de posibles dianas terapéuticas para mejorar la sintomatología de nuestros pacientes analizamos en nuestra serie metabolitos que pueden modificar el estrés oxidativo o mejorar la regulación del eje HPA. La presencia de marcadores de estrés oxidativo se puede valorar de tres maneras: midiendo directamente ROS, midiendo el resultado del daño sobre biomoléculas y midiendo los niveles de antioxidantes. La medición directa de ROS parecería lo más adecuado pero son sustancias químicamente muy inestables. Por eso en ocasiones es preferible la medición del daño sobre proteínas, DNA, RNA, lípidos u otras biomoléculas. Otra aproximación es medir los niveles de enzimas antioxidantes y otras moléculas redox que sirven para contrarrestar el efecto de ROS (Hasnian BJ, 2004).

Entre los antioxidantes de origen endógeno se analizaron varias moléculas. Reseñamos aquí las que han resultado estadísticamente significativas. Dentro del grupo de proteínas de alto peso molecular: **transferrina, ceruloplasmina**. Entre los antioxidantes de origen exógeno y de bajo peso molecular se valoraron antioxidantes liposolubles como **vit E, vit A**, hidrosolubles como la **vit C**. Minerales antioxidantes como Zinc, cobre.

Los valores estándar de metabolitos como la ceruloplasmina y la transferrina, aún dentro de los límites de la normalidad se encuentran alterados con una diferencia estadísticamente significativa en nuestra muestra. En relación con la ceruloplasmina sus niveles son más

elevados en general en los niños con SXF que en sus hermanos sanos. Este hallazgo es estadísticamente significativo en los participantes mayores de 13 años. Se ha evidenciado en estudios recientes que niveles elevados de ceruloplasmina se observan en patología neurodegenerativa como Alzheimer y esquizofrenia (Wolf TL y cols. 2006). También se encuentran artículos que relacionan el síndrome de ataxia y temblor asociado a SXF (FXTAS) presente en portadores de la premutación con alteraciones del metabolismo del hierro, con niveles bajos de ambos metabolitos, ceruloplasmina y transferrina (Ariza J, 2015). No hay artículos publicados sobre alteraciones en los niveles de estos metabolitos en pacientes de corta edad con SXF. Aunque si existe mucha literatura en torno a la relación de ambos con el estrés y la activación del eje HPA (Halliwell B, 2006).

La transferrina, glicoproteína transportadora que une al hierro, junto a la ceruloplasmina, pertenecen a los antioxidantes endógenos dentro del grupo de las proteínas de alto peso molecular. Son captadores de iones metálicos en el medio extracelular, junto con la Haptoglobina, y Ferritina, evitando la formación de Radical hidroxilo (OH•). En nuestros participantes, los niveles de transferrina están dentro del rango de normalidad pero por debajo de sus hermanos sanos. Esto ocurre sobre todo en menores de 13 años, siendo estadísticamente significativo este decalaje en nuestra muestra. El metabolismo del hierro está siendo ampliamente estudiado en patologías crónicas en relación con estrés oxidativo e inflamación (neuromielitis, diabetes, cardiopatías, hepatopatías) (Aljwaid H y cols., 2015). Aun así no hay ningún artículo que describa alteraciones en el metabolismo del hierro en pacientes con SXF.

Se han valorado otras moléculas relacionadas con la regulación de la oxidación y con la reacción al estrés como son **el AMP cíclico y la serotonina**. Respecto al AMP cíclico se encuentra en niveles más bajos en nuestros participantes con SXF, aunque dentro de los valores

normales para la edad. Se ha documentado en varios artículos descenso de niveles de AMPc en pacientes con SXF, aunque se aprecia gran heterogeneidad en los valores reportados (Berry-Kravis E. y cols., 1995). El AMPc es un segundo mensajero relacionado con muchos procesos metabólicos implicados por ejemplo con los procesos ejecutivos como la memoria y la respuesta a la ansiedad. La cascada de AMPc está alterada en individuos con SXF y en diferentes modelos experimentales, así como en la valoración de niveles en individuos afectos. Esta reducción de los niveles de AMPc podría ser un buen biomarcador de la enfermedad. Además parece tener relación directa con las causas subyacentes de parte de la sintomatología propia del fenotipo conductual del SXF y del autismo. Los agentes farmacológicos que actúan modulando la cascada de AMPc podrían ser una buena diana terapéutica en pacientes SXF, complementando así los esfuerzos actuales centrados en la actuación sobre la señalización de mGluR (Kelley DJ, y cols., 2008; Berry-Kravis E y cols., 1995).

La serotonina alcanza niveles más elevados en nuestros participantes con SXF y, sobre todo, en los más pequeños Sabemos que la producción de serotonina está alterada en los niños con SXF y trastorno del espectro autista (TEA) (Yang CJ y cols., 2014). En la población normal los niveles de serotonina están relativamente elevados en el cerebro en desarrollo con un pico entre los 2-5 años (duplicando a esa edad los niveles que aparecen en cerebro adulto). Posteriormente, descienden hasta los 15 años cuando llegan a niveles de adulto (Chugani DC y cols., 1998). En niños con autismo, y también parece ocurrir en los niños con SXF, este pico no se produce por lo que los niveles en la primera infancia son más bajos para luego elevarse por encima de la norma en adolescentes y adultos. En nuestra muestra, con participantes a partir de 6 años, los niveles son más elevados que en el grupo control en ambos subgrupos de edad pero de manera más evidente en los menores de 13 años. No existen muchos estudios que valoren los niveles de serotonina en SXF pero si aparecen

diferencias en el subtipo SXF con autismo (Jackson A. y cols., 1984). Hessel en un estudio realizado en 2008 (Hessel D y cols., 2008) encontró polimorfismos en los genes que codifican la recaptación de serotonina en individuos con SXF, en concreto en los que presentaban un fenotipo conductual más agresivo. Además, niveles bajos de precursores de serotonina (triptófano) han sido referidos en artículos en relación con TEA, que está presente en al menos un tercio de los individuos con SXF (Boccutto y cols., 2013). Un tercio de los niños autistas tienen niveles incrementados de serotonina plasmática y se ha evidenciado que algunos síntomas autísticos mejoran mediante el consumo de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina en SXF, sobretodo en edades precoces (Hanson y cols., 2014). Los niveles de serotonina están ligeramente elevados en nuestra muestra en los niños SXF. Esto es más propio de un evento estresante agudo que de la activación crónica del eje que se evidencia en los individuos con SXF. Aun así los niveles en toda la muestra son bajos con respecto a los valores normales por lo que no permite extraer conclusiones.

Los niveles de antioxidantes no endógenos como **el tocoferol o el ácido ascórbico** cobran interés en nuestro caso ante la posibilidad de administración exógena de los mismos. Al analizar los resultados apareados por hermanos, también eliminamos posibles sesgos asociados a la dieta o el ambiente de los individuos participantes. Presuponiendo que hermanos que comparten domicilio deben tener unas condiciones vitales, una situación familiar y entornos similares en estos aspectos. También es más fácil que no haya diferencias en la capacidad absorbente de elementos de la dieta u otras características fenotípicas que influyan en los niveles en sangre de estas vitaminas.

En los participantes afectados de X-frágil mayores de 13 años se evidenció una reducción en plasma de los niveles de ácido ascórbico de manera estadísticamente significativa en relación con las muestras obtenidas de la sangre de sus hermanos sanos. Recordamos que el

ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante esencial que se obtiene de la dieta. Por otro lado no se apreciaron diferencias significativas en los niveles en suero de tocoferol en esta población.

Algunas enfermedades neurológicas se acompañan con frecuencia de una alteración del eje HPA. Éste eje controla la secreción de distintas hormonas, catecolaminas y glucocorticoides (GCs) que juegan un importante papel en múltiples funciones cerebrales superiores como memoria, cognición, así como en las emociones y reacción ante estímulos (Kim JJ y Diamond DM, 2002). En condiciones fisiológicas, los corticoides ayudan a la adaptación y son beneficiosos. Sin embargo, elevaciones prolongadas en el tiempo pueden ocasionar o facilitar ciertas disfunciones cerebrales (Raber J, y cols., 1998). El hipocampo tiene las mayores concentraciones de receptores para glucocorticoides (McEwen y cols., 1986), y activaciones crónicas del eje HPA e hipersecreción de glucocorticoides se asocian con alteraciones en la morfología del hipocampo (Ghilan M y cols., 2015; Lupien SJ y cols., 1998; Porter and Landfield, 1998) y su función.

Existen estudios en animales de experimentación que muestran como la deficiencia de proteína FMRP provocará una disregulación del eje HPA mediante un mecanismo que afecta a la secreción de la glándula adrenal y pituitaria (Beckel-Mitchener y cols., 2003) así como un aumento del estrés oxidativo (el Bekay R, y cols., 2007). La elevación prolongada de corticoides en el tiempo se puede observar en ratones Fmr1-KO tras exposiciones prolongadas a estrés (Lauterborn JC, y cols., 2004; Markham et al., y cols., 2006), así como en los ratones con la premutación del gen FRM1 (Brouwer y cols., 2008).

Los ratones Fmr1-KO, que presentan un fenotipo conductual similar al de los pacientes con SXF, tienen niveles anormalmente elevados de corticosterona en plasma después de un evento de estrés. Mientras que los niveles de hormona adrenocorticotropa están más altos que en

controles. A nivel adrenal estos ratones presentan niveles elevados de adrenalina. Los pacientes con X-frágil, que como ya sabemos presentan deficiencia de la proteína FMRP, muestran un incremento en los niveles plasmáticos de adrenalina, noradrenalina, cortisol y ACTH al presentar problemas para la regulación del eje HPA (Hessl y cols., 2006; Wisbeck y cols., 2000) lo que se asocia con mayor ansiedad y problemas de aprendizaje (Garber y cols., 2008). En algunos estudios se han comparado valores de metabolitos concretos en relación con estrés como cortisol (Hessl y cols., 2002; Hessl y cols., 2006) en pacientes con SXF y sus hermanos sanos, pero no se han recogido en la literatura análisis de analíticas completas de individuos SXF y sus hermanos sanos en situación basal.

Estos resultados apoyan la idea de que la proteína FMRP juega un papel clave en la fisiología inhibitoria de la glándula adrenal y en la actividad del eje HPA. En estudios en el modelo animal se ha descrito una expresión elevada de la proteína FMRP en la medula suprarrenal en etapas iniciales del desarrollo, sin expresión concomitante de la proteína FXR1 y FRX2 que tienen un 98% de homología, por lo que se entiende que FMRP tiene una función específica en medula suprarrenal que no puede ser compensada por las otras dos proteínas de la familia y su ausencia podría causar alteraciones en su fisiología (de Diego-Otero Y. y cols. 2000). Esto tiene importantes implicaciones en el comportamiento y en el análisis del aprendizaje y podría ser una diana potencial terapéutica del SXF.

Ante la evidencia de que el estrés crónico es un elemento clave en la sintomatología de los pacientes SXF, hemos valorado algunos parámetros relacionados con el eje HPA y hormonas que se encuentran elevadas en individuos sometidos a un alto nivel de estrés crónico. En nuestros participantes los niveles de hormonas de estrés como **adrenalina, noradrenalina, cortisol y ACTH** están elevados con respecto a sus hermanos sanos. Con respecto a los niveles de

adrenalina esta elevación es estadísticamente significativa en todos los rangos de edad. Con respecto a la noradrenalina, la elevación es estadísticamente significativa si consideramos todos los participantes en conjunto pero no si separamos por rango de edad. El cortisol y el ACTH también se han valorado para completar el estudio del eje HPA. Ambos están incrementados en nuestra población con SXF en comparación con sus hermanos sanos, siendo evidente ese incremento y estadísticamente significativo para ambas hormonas en los menores de 13 años.

Mención aparte requiere la Hormona del crecimiento, que en nuestra muestra tiene un comportamiento diferente. Los participantes con SXF del grupo de edad 6-13 años presentan una disminución significativa de los valores sanguíneos de hormona del crecimiento, contrariamente a lo que ocurre en el grupo de participantes de edad mayor de 13 años que tiene elevada significativamente esta hormona. Esto difiere de los hallazgos sobre la curva de crecimiento de los individuos con SXF (Loesch DZ y cols., 1995; Butler MG y cols., 1992; Kidds y cols., 2014), el total de la ganancia de altura puberal se deteriora, mientras que la tasa de crecimiento durante el periodo preadolescente se incrementa, en comparación con la tasa de crecimiento de los sujetos sanos. Esta La hipótesis de la activación prematura del eje HPA como la causa del deterioro del crecimiento en los niños y niñas de X frágil.

Ya sabemos, cómo hemos comentado en la introducción, que el fenotipo conductual de nuestros pacientes con SXF está muy determinado por el estado de activación continua de los mecanismos de estrés. El eje HPA presenta una regulación aberrante en modelos de ratón pero también en pacientes con SXF en situación basal. En ratones se recogen elevación de niveles de corticosterona en respuesta a factores de estrés leve en varias publicaciones, evidenciándose alteraciones de la homeostasis que podrían subyacer a la psicopatología de nuestros pacientes. También se han encontrado

niveles altos de cortisol en niños con SXF en comparación con hermanos sanos y en relación directa con problemas severos de comportamiento y alteración en el comportamiento visual (evitación de la mirada propia de estos niños (Hessl y cols., 2002; Hessl y cols., 2006; Markham y cols., 2006). Tanto en niños como en el modelo animal se ha comprobado un decalaje en el retorno a niveles basales de glucocorticoides tras una reacción de estrés (Miyashiro y cols., 2003).

Con respecto al perfil de aminoácidos encontrados en nuestra muestra ya se ha valorado en la literatura alteraciones en estos perfiles y en neurotransmisores entre el ratón *Fmr1-KO* y el control. El perfil de alteración en estos estudios es diferente al encontrado en nuestra muestra y no sugiere inicialmente ninguna hipótesis (Gruss M, y cols., 2001). Parece existir una relación entre algunos de estos aminoácidos y el metabolismo del óxido nítrico que podría, en individuos con SXF, tener relación también con los mecanismos de estrés oxidativo. Existen dos artículos que corroboran y dan soporte a estos hallazgos, pero se precisan mas estudios en relación con este tema (Lima-Cabello E. y cols. 2015; Lee J y cols., 2003).

PARTE B: ENSAYO CLINICO: TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES PARA EL SINDROME DE X FRAGIL

El SXF se considera actualmente dentro de los trastornos del desarrollo neurológico infantil de origen genético y está incluido en el grupo de las llamadas enfermedades raras o minoritarias. En España existe aún una escasa prevalencia en la población, que se debe en muchas ocasiones al infradiagnóstico (Fernández-Carvajal y cols., 2009). La falta de conocimiento de las características fenotípicas y conductuales de los pacientes ha provocado que, en general, solo se diagnostiquen los casos más graves, con importante sintomatología

conductual como trastorno de la capacidad intelectual grave y TEA evidente. Actualmente, se está tomando más interés en todas estas enfermedades de baja prevalencia. La mejora de las técnicas de diagnóstico genético por biología molecular, unidas a este mayor interés nos ha permitido reconocer pacientes con clínica más sutil en los que tratamientos que ayuden al control de los síntomas conductuales permitirán su integración de manera más eficiente a nivel socio-laboral y menor estrés a las familias, al evitar la incertidumbre de la falta de diagnóstico.

Hoy en día se está trabajando arduamente en la búsqueda de posibles tratamientos para SXF y otras enfermedades de las llamadas "enfermedades raras". A pesar de ello, se realizan pocos ensayos clínicos en pacientes afectados, y menos aún en niños. En el caso de los pacientes pediátricos se asocian las dificultades habituales para trabajar con este tipo de pacientes afectados de enfermedades de baja incidencia (pocos casos, dispersión geográfica, pérdida de participantes) con los asociados a cualquier ensayo terapéutico realizado en estas edades (consideraciones legales y éticas) Sabemos por otro lado que estos estudios son claramente necesarios y se están llevando a cabo en todo el mundo.

Recordando lo ya descrito en la introducción, FMRP es una proteína de unión al ARNm. Esta acción es importante ya que FMRP participa en el transporte del ARNm, su estabilización y la traducción y regulación de este ARNm en proteínas en la sinapsis (Chen E, y cols., 2014).

FMRP actúa también como cofactor en la regulación del estrés oxidativo cerebral por lo que, en ausencia de esta proteína, se produce una hiperactivación de una NADPH-oxidasa dependiente de RAC1-GTPasa. Esto se traduce, en los pacientes con SXF, en un evidente incremento del estrés oxidativo que se puede apreciar tanto en necropsias de animales de experimentación como el modelo de ratón. *Fmr1-KOut* presentará altos niveles de productos de

peroxidación lipídica, proteínas oxidadas, formación de carbonilos y alteración oxidativa del sistema de glutatión (el Bekay R y cols. 2007).

Estas alteraciones conducen a un exceso de la producción de radicales libres que, a largo plazo, provocan incremento del estrés oxidativo que influye de manera crucial en la relación entre los elementos del SNC interfiriendo en la comunicación natural entre la neurona, el astrocito y la microglía (Joshep Bravo P y cols., 2007).

En nuestra experiencia con pacientes, y también en artículos publicados por otros autores, se han recogido datos sobre el comportamiento de algunos de estos productos de la oxidación y de la hiperactivación del eje HPA en pacientes con SXF. Aunque en pocas ocasiones se ha realizado en comparación con sus hermanos sanos como en nuestra serie. Los resultados en los pacientes con SXF son en muchos casos similares a los obtenidos en experimentación animal con ratones Fmr1-KO. En estudios preclínicos metabolomicos se ha descrito la presencia de metabolitos de estrés oxidativo en los ratones Fmr1-KO, así como una alteración en la expresión de enzimas que participan de la detoxificación de los radicales libres (Bechara EG. Y cols. 2009, Davidovic L. y cols. 2011). En la muestra de sangre de niños con SXF se obtienen valores de algunos de estos parámetros mucho más altos que en sus hermanos sanos con significación estadística incluso en muestras pequeñas. Un ejemplo de ello son los resultados mostrados en este trabajo de análisis previo al ensayo clínico. En trabajos previos otros autores valoraron los niveles de cortisol en saliva en 90 niños con SXF y sus hermanos sanos en estado basal y durante una prueba de estrés en el hogar. Sus resultados muestran niveles anormales en la respuesta al estrés en los niños afectos. Esta respuesta anómala además se relacionó directamente con un comportamiento más inadecuado o patológico (Hessl D y cols., 2006).

ENSAYOS CLINICOS EN PACIENTES

Desde 1983, se ha propuesto por múltiples investigadores la teoría de que las vitaminas pueden mejorar el estado cognitivo de los pacientes SXF. La primera vitamina usada para el tratamiento del SXF fue el ácido fólico. Varias publicaciones describen la eficacia y seguridad del tratamiento con ácido fólico en las personas con SXF (Brown WT y cols., 1994, Carpenter y cols., NT 1983, Fisch y cols., 1988; Strom y cols., 1992).

Dos ensayos doble ciego han evaluado la seguridad y eficacia de L-acetilcarnitina (LAC) en los niños con SXF y su comorbilidad con TDHA. Ambos ensayos fueron estudios controlados y aleatorizados diseñados con placebo y un grupo control. El primer estudio incluyó a 20 pacientes y comparó LAC con una dosis de 100 mg/kg/día *versus* placebo. En este estudio los investigadores no encontraron ninguna diferencia significativa entre ambos grupos al valorar los datos globales, basándose en los resultados de las pruebas de Bender-Gestalt, WISC-R y los cuestionarios de Connors completados por los profesores. Sin embargo, los resultados de los cuestionarios CTRS-R y CPRS-R completado por los padres y maestros en la escuela mostraron una significativa reducción de comportamiento hiperactivo al final del estudio (Hedges $g = -3.94$, $SE = 0.91$) en los sujetos tratados con LAC (Torrioli MG, 1999).

En el segundo estudio, definido por los autores como un estudio de fase II, participaron ocho centros en tres países europeos. Los investigadores compararon LAC en dosis de 20-50 mg/kg/día frente a placebo en 63 pacientes. Se apreció una reducción estadísticamente significativa de la hiperactividad y mejoría de la conducta social observada en pacientes tratados con LAC en comparación con el grupo placebo. Estos resultados se basaron en la comparación de la batería de pruebas entre el grupo tratado y el control basado en los datos obtenidos de los cuestionarios de Connors, el Índice Global-Padres

(CGI-P) y las Escalas Vineland adaptativa de Comportamiento. También se recogió una tabla con efectos secundarios significativos en el grupo LAC (Torrioli MG y cols., 2008).

En otro ensayo en fase II en paralelo, aleatorizado, doble ciego, controlados con placebo de una duración de 4 semanas, los investigadores valoraron la eficacia y seguridad de ampakina compuesta CX516 *versus* placebo en 49 pacientes con SXF, 27 de los cuales estaban tomando otras medicaciones psicótropas concomitantes. Entre los participantes, 25 tenían diagnóstico adicional de TEA. Los resultados de este estudio no mostraron una mejoría significativa en la memoria ni en el lenguaje, funciones ejecutivas y atencionales, comportamiento ni actividad general en los pacientes tratados con CX516 en comparación con placebo. Tampoco se reportaron en estos pacientes efectos secundarios, ni reacciones adversas graves (Berry-Kravis E y cols. 2006).

Otro trabajo fue un ensayo piloto para evaluar la seguridad y eficacia del litio como posible tratamiento en los individuos con SXF. Planteaban la hipótesis de que la ausencia de FMRP interrumpe la regulación de proteínas de traducción mGluR- y mGluR5-dependiente en dendritas. Se sabe que el litio participa en la regulación de la traducción del mGluR y logra revertir en ratones la sintomatología. Los resultados indicaron que el litio es bien tolerado y proporciona beneficios funcionales en SXF, posiblemente modificando el defecto neural subyacente (Berry-Kravis E, y cols. 2008).

También se han publicado resultados de un ensayo clínico con riluzol en SXF. Este fármaco tiene un efecto inhibitorio en la liberación de glutamato, bloquea los efectos excitotóxicos de este y potencia la función del receptor postsináptico de GABA_A. Se sabe que la activación de la enzima ERK1 (participante en la cascada de la citogénesis) está reducida en humanos con SXF y en modelos animales. Se planteó que la corrección de la activación de la enzima podría ser un biomarcador

potencial de la respuesta a tratamientos ensayados para el SXF. Los resultados de un ensayo abierto de 6 semanas en adultos con SXF demostró que el tratamiento con riluzol (100 mg/día) no se asociaba con una mejoría clínica significativa, con una correlación uniforme de la activación periférica de ERK (Erickson CA, y cols. 2011).

El ensayo con acamprosato, un fármaco con posible antagonismo mGluR5, se realizó en 12 pacientes con SXF. En los pacientes, el tratamiento en abierto se asoció con mejoría de la comunicación lingüística. Según se recoge en el artículo mostraron un beneficio clínico global y una marcada mejoría en la comunicación lo que podría tener implicaciones potenciales para el tratamiento de SXF (Erickson CA, y cols. 2013).

Dentro de la etiopatogenia del SXF se ha propuesto el exceso de señal del receptor metabotrópico del glutamato 5 (mGluR5) como responsable de los síntomas neurológicos y psiquiátricos, incluyendo el déficit cognitivo, las convulsiones, ansiedad, estereotipias, y los problemas para la relación social. En ensayos experimentales en ratón Fmr1-KO se ha comprobado como la reducción de la expresión de mGluR5 en estos animales reducía la mayoría de la sintomatología evidenciada en estos animales de experimentación manipulados genéticamente para presentar fenotipo similar a los afectos de SXF. En las necropsias se encontraron diferencias con el grupo control en aspectos como la densidad de espinas dendríticas en neuronas de la corteza piramidal, aunque otros rasgos como el macroorquidismo no se modificaron. Los resultados obtenidos con el uso de antagonistas de mGluR5 en modelos animales de SXF apoya aún más esta teoría. El clorhidrato de piridina 2-metil-6-feniletinil (MPEP) es un antagonista potente y altamente selectivo de los receptores de mGluR5. MPEP es tóxico para los seres humanos, por lo que otros antagonistas del mGluR5, tales como fenobam y mavoglurant (AFQ056), han sido estudiados en SXF. En un ensayo de dosis única en 12 adultos con SXF

Fenobam se mostró como un fármaco seguro, sin efectos secundarios importantes. Se apreciaron mejoras en la hiperactividad y la ansiedad, y el 50% mostró al menos una mejora del 20% en la inhibición de los impulsos (Berry-Kravis E, y cols., 2009).

En un reciente estudio aleatorizado, doble ciego, comparado con placebo y cruzado de 30 pacientes masculinos SXF entre 18-35 años, se valoró si un inhibidor selectivo de un subtipo de receptor de mGluR5, AFQ056, mejoraba los síntomas conductuales de SXF. Los resultados no indican efectos significativos del tratamiento al valorarlos a los 20 días de tratamiento. Sorprendentemente, debido a un efecto epigenético, siete pacientes con metilación completa del promotor FMR1 y sin mRNA FMR1 detectable, presentaron mejoría significativa tras el tratamiento en comparación con placebo ($p < 0,001$). Veinticuatro de los treinta pacientes presentaron efectos adversos, en su mayoría leves. Los problemas iban desde dolor de cabeza a astenia de moderada a intensa (Jacquemont S y cols. 2011).

Agonistas del receptor de GABAB tales como baclofeno inhiben tanto la liberación presináptica de glutamato como la transmisión postsináptica y/o intracelular de señalización de mGluR5. Se realizó un ensayo cruzado, doble ciego controlado con placebo con arbaclofen con la colaboración de varios centros. Se incluyeron más de 150 individuos con SXF (desde los 6 años en adelante) El estudio preliminar de seguridad y eficacia mostró buenos resultados con mejoría en la sintomatología. Los pacientes con los valores iniciales más severos mejoraron globalmente en todas las escalas pero el ensayo se finalizó en 2013 por falta de financiación para continuar con la investigación (Berry-Kravis E, y cols. 2012).

El sistema GABAérgico también está alterado en SXF. El GABA es un neurotransmisor inhibitorio muy importante a nivel del SNC, actuando sobre receptores cerebrales que está implicado en la ansiedad, la depresión, la epilepsia, el insomnio, el aprendizaje y la memoria. La

inhibición mediada por GABA es importante en la prevención de las crisis en los pacientes con SXF (Olmos-Serrano JL y cols. 2010).

En otro estudio se usó ácido valproico (VPA) en un intento de identificar fármacos capaces de restaurar la actividad del gen FMR1. VPA es un antiepiléptico bien conocido que se usa en ocasiones como estabilizador del estado de ánimo. El tratamiento con VPA parece ser capaz de producir mejoría en la conducta adaptativa, definida como mejoría de desempeño de las actividades diarias requerido para la competencia personal y social). Su efecto parece estribar en la reducción de la hiperactividad (Torrioli M, y cols. 2010).

Con respecto a los ensayos con melatonina, un grupo de investigación puso en marcha un ensayo doble ciego, aleatorizado, cruzado y controlado con placebo de 4 semanas. En las primeras 2 semanas se dividieron los pacientes en 2 grupos administrando 3 mg/día de melatonina o placebo y posteriormente alternando otras 2 semanas. Los resultados de este estudio apoyan la eficacia y la tolerabilidad del tratamiento con melatonina para problemas de sueño en niños con SXF (Wirojatanan J, y cols. 2009).

La minociclina, un antibiótico ampliamente utilizado para tratar el acné e infecciones cutáneas, es otro fármaco prometedor que puede actuar sobre los síntomas centrales de SXF. Este fármaco inhibe la metalopeptidasa 9 (MMP-9) y reduce la inflamación en el sistema nervioso central. En ratones Fmr1-KO tratados con minociclina se apreció como las neuronas del hipocampo mostraron espinas dendríticas maduras. A nivel comportamental, se apreció disminución de la ansiedad y mejoría de habilidades de exploración del entorno. Se ha publicado cómo el uso en abierto de minociclina en el tratamiento de 50 personas con SXF dio como resultados una mejoría, según la observación de los padres, del comportamiento y de la comunicación mientras duró el tratamiento. El efecto secundario más común referido fueron problemas gastrointestinales, sobretudo pérdida de apetito

(Utari A, y cols. 2010). En un ensayo con minociclina, que incluyo a 20 pacientes mayores de 13 años, Paribello et al apreciaron efectos beneficiosos que se cuantificaron con test neuropsicológicos: la Escala de Impresión Clínica Global de comportamiento (CGI) y el listado de conductas aberrantes (ABC-C) (Paribello C, y cols. 2010).

En un ensayo abierto de 12 semanas con aripiprazol en 12 pacientes con SXF con edades comprendidas entre 6 a 25 años (edad media, 14,3 años), que no tomaban drogas psicoativas concomitantes, los resultados indicaron una mejoría de más de 25% en los resultados del listado de conductas aberrantes (ABC-C) en 10 (87%) de los 12 pacientes. El aripiprazol es generalmente seguro y bien tolerado y está asociada es estes ensayo con mejoría estadísticamente significativa en el comportamiento irritable (Erickson CA, y cols. 2011).

Recientemente se han publicado los resultados de la falta de eficacia en dos estudios, uno fase II que ha realizado Novartis con la molécula AFQ056 (Mavoglurant) en adolescentes y adultos, y uno fase III realizado por Roche con la molécula (RO4917523), las dos son antagonistas de receptores Glutamatérgicos, por lo que los fracasos de estos ensayos junto al cese de los ensayos con la molecula STX107 (Arbaclofen) han derivado en mucho mayor interés en otras dianas terapéuticas (Jacquemont S y cols., 2014).

Tabla 23: Resumen de los ensayos clínicos, las moléculas y sus dianas, que se han usado en la intervención terapéutica experimental en humanos con el SXF (Modificado del artículo de Diego Otero y col., 2014).

Número de registro del ensayo	Tipo/Fase en la que se encuentra	Fármaco	Población	Diana	Estado	Promotor	Resultados
NCT 01894958	Multicentrico -Fase II	MNZ-2566	Varones adolescentes y adultos	Antagonista NMDA	En marcha sin reclutar pacientes	Neuren Pharmaceuticals Limited	Pendiente
NCT 01725152	Unicentrico-Fase II	Ganaxolona	Adolescentes y niños	Agonista GABA-A	En marcha sin reclutar pacientes	Marinus Pharmaceuticals	Pendiente
NTC 01474746	Unicentrico-Fase II	Sertalina	Niños	Inhibidor de la recaptación de serotonina	En marcha sin reclutar pacientes	Universidad de California, Davis (USA)	Pendiente
NCT 01911455	Multicentrico -Fase II	Acamprosato	Adolescentes y niños	Modulador del receptor de NMDA	En marcha sin reclutar pacientes	Children's Hospital Medical Center, Cincinnati	Pendiente
NCT 01329770	Unicentrico Fase II	Vitamina C + Vitamina E	Adultos, Adolescentes y niños	Antioxidantes	Finalizado	Hospital Regional universitario de Málaga	Eficacia cognición con una potencia del 65%, lenguaje y en comportamiento.
NCT 02126995	Unicentrico-Fase II	Metadoxine MG01CI	Adultos y adolescentes	Vitamina 6	Finalizado	Alcobra Ltd.	Pendiente
NTC 01357239	Multicentrico -Fase II	Mavaglurant (AFQ056)	Adolescentes y niños	Antagonista mGluR5	Finalizado	Novartis (Basilea, Suiza)	Negativos, no hay mejoría en el comportamiento medido con la escala ABC-C (Jacquemont y col. (2011))
NTC 01015430	Multicentrico -Fase II	Basimglurant	Adultos	Antagonista mGluR5	Finalizado	Hoffman-La Roche	No hay eficacia
NTC 01013480	Multicentrico -Fase II	Arbaclofeno (STX209)	Adultos y adolescentes	Agonista GABA-B	Finalizado	Seaside Therapeutics, Inc.	Eficacia parcial, cierra el programa por falta de financiación por la empresa.
NTC 01053156	Unicentrico-Fase II	Minociclina	Adolescentes y niños	Antibiótico	Finalizado	Universidad de California, Davis (USA)	Mejoría tanto en el placebo como en el tratamiento (Paribello y col., 2010; Leigh y col., 2013)
NTC 01120626	Unicentrico-Fase II	Donepezil	Adolescentes y niños	Droga colinérgica	Finalizado	Universidad de Stanford (USA)	No hay mejoría en los test de inteligencia y comportamentales (Sahu JK y col., 2013)

ENSAYO CON ANTIOXIDANTES CON 30 PARTICIPANTES DOBLE CIEGO COMPARADO CON PLACEBO.

Como base de la segunda parte de este trabajo intentamos valorar en la muestra de participantes SXF la seguridad y eficacia de la administración de cantidades elevadas de antioxidantes (una combinación de tocoferol y ácido ascórbico) a dosis superiores a los

requerimientos diarios recomendados (ver tablas 24 y 25). Las dosis administradas correspondían a 10 mg/kg/día de ambas vitaminas por vía oral.

En nuestra muestra los participantes se distribuyen en un rango de edad desde los 6 a los 18 años. Se seleccionaron estos límites de edad ya que están dentro del intervalo en el que los síntomas asociados a la hiperactividad y los trastornos conductuales son muy invalidantes y evidentes (Hustyi KM y cols. 2014). Los pacientes dentro de este rango, además, pueden colaborar (dependiendo en parte de su nivel de afectación) en todos los test de evaluación realizados. Un porcentaje de nuestros participantes tomaban medicación psicotrópica durante el ensayo. Estos tratamientos no se retiraron ni se modificaron las dosis durante el periodo de seguimiento. Se ha intentado evitar el sesgo haciendo una aleatorización por factores de confusión como la edad y la toma de medicación concomitante, aspectos que podrían interferir en nuestras conclusiones.

Tabla 24: Recomendaciones de ingesta diaria de vit-C

RDA de vitamina C			
Etapa de vida/ condición	Edad (años)	Varones (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Niñez	1-3	15	15
Niñez	4-8	25	25
Niñez	9-13	45	45
Adolescencia	14-18	75	65
Adulthood	19 o más	90	75
Fumadores	19 o más	125	110
Embarazo	18 o menos	-	80
Embarazo	19 o más	-	85
Lactancia	18 o menos	-	115
Lactancia	19 o más	-	120

Tabla 25: Recomendaciones de ingesta diaria de vit-E.

RDA para <i>RRR-alfa-tocoferol</i> (<i>d-alfa-tocoferol</i>)			
Etapa de vida/ condición	Edad (años)	Varones (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Niñez	1-3	6	6
Niñez	4-8	7	7
Niñez	9-13	11	11
Adolescencia	14-18	15	15
Adultez	19 o más	15	15
Embarazo	todas las edades	-	15
Lactancia	todas las edades	-	19

Diversos antioxidantes administrados por vía oral, y entre ellos los empleados en este ensayo clínico (tocoferol y ácido ascórbico), han sido usados como suplemento nutricional y se consideran sustancias seguras incluso para los niños. Se han usado en ensayos clínicos de forma sistemática para patologías como fibrosis quística, Síndrome de Down, problemas hepáticos (Mustafa Nachvak S. y cols., 2014).

La Food and Drug Administration of USA (FDA) recomienda una dosis diaria de 10 mg/día, pero la dosis de seguridad se considera que puede llegar a ser hasta de 800 mg/día. Estas recomendaciones son similares en Europa y han sido recogidas por la comisión europea de salud y consumo (Scientific Committee on Food, SCF) (SCF ,2003). En nuestro ensayo la dosis máxima empleada es de 600mg/día en los participantes que tenían por encima de 60kg de peso.

La vitamina E (α -tocoferol) es una vitamina liposoluble con un amplio margen terapéutico. En ensayos clínicos y farmacodinámicos, se ha demostrado que tiene propiedades muy interesantes, participa en el metabolismo oxidativo a través de desaminación, transaminación y descarboxilación. También participa en la descarboxilación de ácido

glutámico a GABA, desde levodopamina a la dopamina y desde 5-hydroxytryptophan a la serotonina. Presenta propiedades anti-convulsivantes y parece ejercer un efecto neuroprotector y tampón ante tóxicos. Se puede administrar a los niños y ha sido autorizado su uso para el tratamiento de la prevención primaria de problemas cardiovasculares, en niños con alteraciones en el carácter (TEA), el lenguaje y el comportamiento; para individuos con dificultades de aprendizaje; retraso motor; crisis convulsivas; intoxicación del sistema nervioso central; temblor; y la enfermedad de Parkinson. La dosificación administrada puede variar ampliamente. Al ser de eliminación renal se asegura que su toxicidad es mínima (Ogunmekan AO, y cols.1989; Gregory J, y cols. 2000).

Ya existen estudios que han empleado combinaciones de antioxidantes para otras patologías e la infancia (Barbosa E y cols 2009): Se diseñó un estudio piloto en Fibrosis quística para evaluar la seguridad de una nueva formulación de micelas (CF-1) de nutrientes liposolubles y antioxidantes y para determinar su eficacia en la mejoría de los niveles plasmáticos de estos compuestos y la reducción de marcadores inflamatorios en el esputo. La nueva formulación de CF-1 aumentó los niveles plasmáticos de los nutrientes y antioxidantes liposolubles de manera segura y efectiva. Además, las mejoras en los niveles plasmáticos de antioxidantes se asociaron con reducciones en la inflamación de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística (Papas KA, y cols. 2008). El efecto de α -tocoferol y ácido ascórbico en los niveles de transaminasas y resistencia a la insulina ha sido evaluado en niños con enfermedad del hígado graso no alcohólico (Nobili V y cols. 2006).

Tomar estos ensayos como base nos permitió suponer que el uso de los compuestos que empleamos en nuestro estudio no ocasionaría problemas de tolerancia ni efectos adversos a sus posibles participantes. Las dosis máximas recomendadas por la comisión

europaea SCF (Scientific Committee on Food 2003) y por la academia americana (Institute of Medicine 2000) para las diferentes edades de vitamina E y C se recogen en la siguiente tabla 26.

Tabla 26: Dosis Maximas diarias recomendadas de vit-C y Tocoferol.

Edad	Vitamina C (mg/d)	α-Tocopherol (mg/d)
0-12 meses	ND	ND
1- 3 años	400	200
4 - 8 años	650	300
9 -13 años	1,200	600
14-18	1,800	800

ND. No determinable debido a la falta de datos de efectos adversos en este grupo de edad y la falta de capacidad para manejar las cantidades en exceso. En estas edades la fuente de la ingesta debe ser a través de los alimentos y evitando siempre niveles altos.

La dosis máxima diaria es el nivel más alto de ingesta diaria de nutrientes esenciales que es probable que no represente ningún riesgo de efectos adversos para la salud a casi todos los individuos de la población general. A medida que aumenta la ingesta por encima de estos valores, el riesgo de efectos adversos aumenta.

En el estudio que presentamos las dosis máximas administradas están por debajo de los límites de seguridad, con 600mg para tocoferol y 800mg para ácido ascórbico. Ambos han sido bien tolerados y los efectos secundarios mínimos, leves y temporales. En ningún caso la administración de la medicación obligo a detener o retirar a ningun participante del ensayo.

El período de seguimiento de 3 meses en nuestro caso se argumenta en la información de ensayos anteriores y en la necesidad de un período mínimo de tiempo necesario para apreciar con claridad la

mejoría de síntomas, tales como el comportamiento hiperactivo, la inatención y el estado antioxidante. Además se presupone un tiempo suficiente para valorar posibles efectos secundarios. Aun así algunos parámetros, sobre todo los analíticos, no se han modificado como cabría esperar. Esto nos hace pensar que un periodo de seguimiento más amplio permitiría ver resultados con más evidencia estadística.

La aplicación combinada de tres métodos de evaluación, a saber, la objetivación de los síntomas de SXF y la valoración de cambios en evaluaciones neuropsicológicas, la evaluación de cambios en los metabolitos relacionados con el estrés en sangre y orina y la evaluación de la situación dentro de la familia nos permitirá llegar a un juicio objetivo de la eficacia del tratamiento que se ha probado.

EVALUACIONES NEUROPSICOLÓGICAS

Con respecto a la aplicación de los test y cuestionarios psicológicos hemos valorado los resultados de las evaluaciones que se llevaron a cabo a todos los participantes en el momento de iniciar el ensayo (T0) y a las 12 semanas (T1) del inicio del mismo. Las evaluaciones se realizaron a doble ciego sin conocer ni la familia ni el entrevistador si el participante pertenecía al grupo placebo o tomaba el tratamiento.

Como requisito inicial los participantes debían tener una puntuación en la escala de Connors mayor de 55. En nuestra opinión, es más fácil identificar diferencias significativas si el participante tiene sintomatología evidente, apreciando con más facilidad como los síntomas se van controlando en mayor medida y más rápidamente en el grupo experimental que en el control. En la muestra de 30 pacientes 22 participantes presentaban síntoma de hiperactividad moderada o grave, y el resto, leve. En el caso de hiperactividad moderadas o grave 10 pacientes entraron en el grupo tratado y 12 pacientes en el grupo control. La respuesta a las 12 semanas de asignación al grupo tratado

o control con placebo es significativa ya que un 70 % de los participantes del grupo tratado redujeron el grado de afectación dentro de la subescala de hiperactividad a un nivel inferior dentro de la clasificación de la puntuación escalar. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. El descenso medio fue de 7.8 puntos dentro de la escala lo que en algunos casos supone pasar de un fenotipo claramente sintomático a situaciones más favorables.

Esta respuesta es similar a la que podría encontrarse con tratamiento con psicoestimulantes como metilfenidato en niños con TDHA (NICE, 2006). Como se aprecia en los resultados, se evidencia una mejoría significativa de los síntomas globales de TDHA-DSM-IV dentro de la evaluación del cuestionario de Conners. Esta mejoría es más significativa en el grupo de participantes de 6 a 12 años. Como ya sabemos en edades más precoces los síntomas de hiperactividad e inatención favorecen claramente problemas escolares y sociales y van a determinar el funcionamiento social futuro de estos individuos (Chromik LC, y cols. 2015), por lo que estos resultados son claramente beneficiosos para nuestros participantes.

Los resultados son similares en la escala de WISC-R. En este caso, a nivel cognitivo parece haber una mejoría significativa en la escala manipulativa y verbal sobretodo en los participantes de menor edad y que no consumían previamente ninguna medicación. En las escalas manipulativas mejoran los participantes que tomaban el tratamiento del ensayo en los dos grupos de edad en la valoración que se realiza a las 12 semanas.

Con respecto al Inventario de Comportamientos en el Desarrollo (DBC-P) (Taffe JR, y cols. 2007) es una forma corta de 24 ítems, derivada del test original mas extenso, que se completa por padres y cuidadores. Intenta valorar una medida aproximada global del estado cognitivo y conductual de los participantes en el ensayo. Tiene un buen perfil de sensibilidad y especificidad en relación a test más largos.

Con respecto a los resultados de este test se observa una tendencia clara sin llegar a ser estadísticamente significativa a la mejoría, con una disminución de los valores registrados en el inventario tanto en el índice global, y siendo estadísticamente significativos en la subescala de problemas de comportamiento, cuando se compara el grupo de tratamiento al inicio (basal T0) con la evaluación a las 12 semanas del ensayo (T1) tratando con la combinación de antioxidantes.

RESULTADOS ANALITICOS RELEVANTES:

La razón para la realización de extracciones de sangre y de orina de 24 horas en el grupo experimental en T0 y T1 es corroborar la seguridad general del tratamiento, comprobar que el compuesto administrado logra niveles correctos en sangre y la mejora el estado antioxidante en nuestros participantes. También nos interesaba revelar cualquier alteración que ocurriese en estos parámetros como resultado de la medicación administrada. Los parámetros analíticos básicos no se han modificado lo que indica buena tolerancia a la administración de la combinación de antioxidantes.

Los niveles en sangre de ambos compuestos, tocoferol y ácido ascórbico se han elevado de manera exponencial en los participantes tratados en relación con los participantes que tomaban el placebo. Esto corrobora que la mejoría que podamos apreciar en el resto de parámetros, a falta de otros elementos que pudieran interferir en los resultados, se debe al uso de nuestra combinación de antioxidantes.

Hemos encontrado cambios significativos en la excreción en orina de 24 horas de ácido homovanílico (metabolito del catabolismo de las catecolaminas) así como descensos significativos del nivel de adrenalina en nuestra muestra. Ambos datos nos hablan de un descenso de la actividad del eje HPA y del estrés oxidativo. A pesar de ello no se han apreciado cambios estadísticamente reseñables en el

resto de parámetros analíticos en nuestra muestra relacionados con el estrés, lo que nos hace pensar que sería necesario un periodo de seguimiento mayor o ampliar el número de participantes incluidos en el estudio.

Como ya hemos referido, la situación de estrés crónico que sufren los individuos SXF ya ha sido reportada en algunas ocasiones en la literatura. Bricout (Bricout VA y cols, 2008) controló los niveles de catecolaminas en sangre y orina de un adolescente con SXF durante una prueba de esfuerzo moderado, apreciando niveles inusualmente elevados de cortisol, adrenalina y noradrenalina. También Hessler (Hessler y cols 2006) valora el cortisol en niños con SXF y lo relaciona con respuestas comportamentales anómalas.

La combinación de ácido ascórbico y tocoferol ha sido empleada en varios ensayos en situaciones de estrés y se ha comprobado que puede disminuir o evitar la elevación de hormonas como adrenalina y cortisol en muestras de modelo animal para SXF (Lodhi GM, y col 2014; Nur Azlina MF, y cols. 2008)

También en estudios preclínicos se evidenció una eficaz disminución de los parámetros del eje HPA en el ratón Fmr1-KO tratado con vit E de forma crónica (de Diego Otero Y y cols. 1999).

En un reciente estudio se ha reportado el uso de tocoferol para control del estrés oxidativo en Síndrome de Down, con resultados significativos en comparación con placebo y con ácido lipóico, lo que apoya nuestra hipótesis de que este compuesto es un fármaco eficaz para controlar los efectos perjudiciales del estrés oxidativo a nivel fisiológico (Mustafa Nachvak S. y cols. 2014). Otro trabajo publicado comprueba en un ensayo piloto que la intervención en abierto para 21 pacientes pediátricos con Síndrome de Down con una combinación de 400mg/día de Tocoferol y 500mg/día de Ascórbico demostraron una mejoría significativa de los parámetros de estrés oxidativo medidos tras 6 meses de tratamiento (Parisotto EB y cols. 2014). Controles

posteriores sobre estos pacientes demostraron que la atenuación del estrés oxidativo se mantuvo incluso 6 meses después de terminar el ensayo de tratamiento (Parisotto EB, y cols. 2015) lo que permite entender que los beneficios fisiológicos del tratamiento pueden perdurar en el tiempo.

Recientemente, se ha publicado un estudio preclínico con participantes con el síndrome de Smith-Lemli-Opitz en el que se demuestra el beneficio de una combinación de vitaminas antioxidantes en la normalización del parámetro molecular 7-Dehidrocolesterol, lo que significa avances en el conocimiento y tratamiento de este síndrome que afecta al neurodesarrollo infantil (Korade Z. y cols. 2014).

Es también importante, en nuestra opinión, la valoración del bienestar de las familias durante el ensayo y la repercusión en la vida familiar (que ha mejorado sustancialmente en algunos casos) tras el mejor control de los síntomas de sus hijos. No tenemos ninguna duda de la correlación directa entre los síntomas de los niños y el bienestar psicológico dentro del entorno familiar. La escala Psychological general well-being (PGWB) index de Dupuy, (1984), en su versión validada en castellano (González MP y cols, 1996), es una escala que se basa en las teorías de la evaluación del entorno doméstico, y es un medio apropiado para la determinación de la distorsión producida por SXF dentro del hogar. Está diseñada con el objetivo de obtener un índice que permita medir estados emocionales intrapersonales que expresen un sentimiento subjetivo de bienestar o distrés. En este estudio los resultados concuerdan con la mejoría del resto de parámetros evidenciados en los pacientes.

El tratamiento actual del SXF presenta claras deficiencias por lo que se entiende que es necesario el desarrollo de ensayos clínicos para el SXF ya que las posibilidades de tratamiento actuales para control de síntomas en ocasiones son ineficaces o se asocian a importantes efectos secundarios. El tratamiento durante 12 semanas con una

combinación de vitaminas con una conocida acción antioxidante, hemos demostrado que reduce significativamente la sintomatología del síndrome, significando a su vez una mejora en el índice de bienestar de los padres de los afectados. Su baja toxicidad y buena tolerancia permite justificar nuevos ensayos en pacientes que corroboren estos resultados preliminares y permitan tratar pacientes más jóvenes que son los que parecen beneficiarse más con este nuevo enfoque experimental de tratamiento para el Síndrome X-frágil.

CONCLUSIONES

PARTE A.

1. Existen alteraciones de parámetros relacionados con el estrés oxidativo y el eje HPA en en las muestras biológicas en situación basal de pacientes afectos de SXF en comparación con sus hermanos sanos.
2. Se evidencia una disminución significativa en los niveles de Vitamina C y AMPc, así como unos valores mayores de Ceruloplasmina en sangre de los participantes con SXF del grupo de edad mayor de 13 años.
3. Se aprecia unos valores mayores de Serotonina y menores de Transferrina, así como una alteración de los parámetros del eje HPA (adrenalina y noradrenalina, ACTH, cortisol) en muestras sanguíneas de participantes con SXF comparadas con sus hermanos sanos, con diferencias mayores en el grupo de edad de 6-13 años.

En los mayores de 13 años se elevan los valores de adrenalina y ACTH, no así el resto de parámetros.

4. Se observa una alteración de varios aminoácidos en suero, algunos de ellos relacionados con el metabolismo del óxido nítrico como la arginina o la ornitina en los participantes con SXF del grupo de edad mayor de 13 años.
5. Los participantes con SXF del grupo de edad 6-13 años presentan una disminución de los valores sanguíneos de hormona del crecimiento, en relación con los controles, contrariamente a lo que ocurre en el grupo de participantes de edad mayor de 13 años que tiene elevada significativamente esta hormona.

PARTE B:

1. El tratamiento actual del SXF presenta claras deficiencias y son necesarios más ensayos clínicos.
2. Los resultados del ensayo utilizando ácido ascórbico y α -tocoferol proporcionan pruebas de eficacia en el control de la hiperactividad medida por la escala Connors de padres y Maestros, en los participantes del grupo de edad 6-13 años.
3. Los resultados del ensayo indican una mejora en parámetros cognitivos en participantes del grupo de edad 6-13 años sin tratamiento farmacológico concomitante.
4. No se han observado efectos secundarios por lo que el uso de estos compuestos tiene un buen perfil de tolerabilidad y seguridad, factor añadido que aporta más interés a los resultados de esta investigación.
5. Los beneficios son sobre todo evidentes en los participantes más jóvenes y que aún no han precisado medicación psicotrópica. Esta evidencia hace aún más necesario el diagnóstico precoz en este síndrome, ya que la intervención a edades temprana puede suponer un beneficio añadido.
6. Estos resultados justifican la realización de un ensayo con mayor número de participantes y un seguimiento a más largo plazo lo que permitirá conclusiones más fiables.

BIBLIOGRAFÍA

- Aman MG, Burrow WH, Wolforg PL. The Aberrant Behavior Checklist-Community: factor validity and effect of subject variables for adults in group homes. *Am J Ment Retard.* 1995; 100(3):283-92.
- Ariza J, Steward C, Rueckert F, Widdison M, Coffman R, Afjei A, et al. Dysregulated iron metabolism in the choroid plexus in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Brain Res.* 2015; 1598: 88-96.
- Artigas-Pallares J, Paula-Pérez I. Asignaturas pendientes del DSM-5. *Rev. Neurol* 2015; 60 (1): S95-101.
- Artigas-Pallarés J, Brun C, Gabau E. Aspectos médicos y neuropsicológicos del síndrome X frágil. *Rev neurol clin* 2001; 2 (1): 42-54.
- Artigas J, Brun C, Gabau E, Lahuerta A. Resultado de una encuesta nacional sobre problemas médicos y neurológicos en el Síndrome X frágil. *Rev Neurol* 2001; 33(3): 262- 3
- Artigas-Pallarés J., Brun-Gasca C. ¿Se puede atribuir el fenotipo conductual del síndrome X frágil al retraso mental y al trastorno por déficit de atención/hiperactividad? *Rev neurol* 2004; 38 (1): 7-11.
- Aljwaid H, White DL, Collard KJ, Moody AJ, Pinkney JH. Non-transferrin-bound iron is associated with biomarkers of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2015;29(7):943-9
- Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci* 2008, 108:227–238.
- Badia X, Gutiérrez F, Wiklund I, Alonso J. Validity and reliability of the Spanish version of the Psychological General Well-Being Index. *Qual Life Res.* 1996; 5(1):101-8.
- Bakker CE, de Diego Otero Y, Bonte C, Raghoe P, Luteijn T, Hoogeveen AT, et al. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res.* 2000; 10; 258:162-70.
- Bagni C, Tassone F, Neri G, Hagerman R. Fragile X syndrome: Causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest.* 2012; 122(12): 4314–22.

- Bailey DB Jr, Hatton DD, Tassone F, Skinner M, Taylor AK. Variability in FMRP and early development in males with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard.* 2001; 106:16-27.
- Barbosa E, Faintuch J, Machado Moreira EA, da Silva VR G, Lopes Pereima MJ, Martins Fagundes RL, et al. Supplementation of vitamin E, vitamin C, and zinc attenuates oxidative stress in burned children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Burn Care Res.* 2009, 30:859–866.
- Bardoni B, Mandel JL. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12(3):284-93.
- Bat O, Kimmel M, Axelrod DE. Computer simulation of expansions of DNA triplet repeats in the fragile X syndrome and Huntington's disease. *J Theor Biol.* 1997;188:53-67
- Bechara EG, Didiot MC, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, Castets M, Pognonec P, Khandjian EW, Moine H, Bardoni B. A novel functions for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol.* 2009; 7(1):e16.
- Beckel-Mitchener A1, Greenough WT. Correlates across the structural, functional, and molecular phenotypes of fragile X syndrome *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(1):53-9.
- Berry-Kravis E, Hicar M, Ciurlionis R. Reduced cyclic AMP production in fragile X syndrome: cytogenetic and molecular correlations. *Pediatr Res.* 1995; 38(5):638-43.
- Berry-Kravis E y Potanos K. Psychopharmacology in fragile X syndrome present and future. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004; 10(1):42-8.
- Berry-Kravis E, Krause SE, Block SS, Guter S, Wu J, Leurgans S, et al: Effect of CX516, an AMPA-modulating compound, on cognition and behaviour in fragile X syndrome: a controlled trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2006, 16:525–540.
- Berry-Kravis E, Sumis A, Hervey C, Nelson M, Porges SW, Weng N, et al: Open-label treatment trial of lithium to target the underlying defects in fragile X syndrome. *J Dev Behav Pediatr.* 2008, 29:293–302.

- Berry-Kravis EM, Hessler D, Rathmell B. Effects of STX209 (arbaclofen) on neurobehavioral function in children and adults with fragile X syndrome: a randomized, controlled, phase 2 trial. *Sci Transl Med.* 2012; 4:152ra27.
- Berry-Kravis E, Hessler D, Coffey S, Hervey C, Schneider A, Yuhas J, et al: A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. *J Med Genet* 2009, 46:266–271.
- Berstein CA. Meta-structure in DSM-5 process. *Psychiatr News.*2011; 46 (5) :7-29
- Boccuto L, Chen CF, Pittman AR, Skinner CD, McCartney HJ, Jones K, et al. Decreased tryptophan metabolism in patients with autism spectrum disorders. *Mol Autism.* 2013; 4(1):16.
- Blondell R Foster MB, Dave KC. Reference ranges from JHH Laboratories Disorders of puberty. *Is Family Phys.* 1999; 60:209-218.
- Bradford A, Atkinson J, Fuller N, Rand RP: The effect of vitamin E on The structure of membrane lipid assemblies. *J Lipid Res.* 2003; 44:1940–1945
- Bricout VA, Flore P, Eberhard Y, Faure P, Guinot M, Favre-Juvin A Maximal and submaximal treadmill tests in a young adult with fragile-X syndrome. *Ann Readapt Med Phys.* 2008;51(8):683-7
- Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A: The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:703–716.
- Brouwer JR, Mientjes EJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, Severijnen LA, Van der Linde HC, et al. Elevated FMR1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 244-53.
- Brouwer JR, Severijnen E, de Jong FH, Hessler D, Hagerman RJ, Oostra BA, Willemsen R. Altered hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis regulation in the expanded CGG-repeat mouse model for fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Jul; 33(6):863-73.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, et al. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and

- altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*. 2001; 107(4): 477–87.
- Brown WT, Jenkins EC, Friedman E, Brooks J, Cohen IL, Duncan C, Hill et al. Folic acid therapy in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 17:289–297.
 - Butler MG, Brunschwig A, Miller LK, Hagerman RJ. Standards for selected anthropometric measurements in males with the fragile X syndrome. *Pediatrics*. 1992;89:1059–1062
 - Burns J, Ouvrier RA, Yiu EM, Joseph PD, Kornberg AJ, Fahey MC, Ryan MM. Ascorbic acid for Charcot–Marie–Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol* 2009, 8:537–544.
 - Busquets-García A, Gomis-Gonzalez M, Guegan T. Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nature Med*. 2013; 19:603–607.
 - Castellanos FX, Acosta MT. Towards an understanding of the molecular mechanisms underlying the pharmacological treatments of attention deficit hyperactivity disorder *Rev Neurol*. 2011; 52 Suppl 1:S155-60.
 - Carpenter NJ, Barber DH, Jones M, Lindley W, Carr C. Controlled six-month study of oral folic acid therapy in boys with fragile X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* 1983; 35:82A.
 - Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993, 71:25–31.
 - Chen E, Sharma MR, Shi X, Agrawal RK, Joseph S: Fragile X mental retardation protein regulates translation by binding directly to the ribosome. *Mol Cell*.2014; 54:407–417.
 - Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 1999; 8:2317-23.
 - Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 1998 Jan; 7:109-13.

- Chugani DC, Muzik O Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol.* 1999;45:287-295
- Chromik LC, Quintin EM, Lepage JF, Hustyi KM, Lightbody AA, Reiss AL1. The Influence of Hyperactivity, Impulsivity and Attention Problems on Social Functioning in Adolescents and Young Adults With Fragile X Syndrome. *J Atten Disord* (internet). 2015. Disponible en: <http://jad.sagepub.com/content/early/2015/03/02/1087054715571739>
- Conners CK, Sitarenios G, Parker JDA, Epstein JN. The revised Conners' Parent Rating Scale (CPRS-R): factor structure, reliability, and criterion validity. *J Abnorm Child Psychol.* 1998; 26:257-268.
- Conners CK, Sitarenios G, Parker JDA, Epstein JN. Revision and restandardization of the Conners Teacher Rating Scale (CTRS-R): factor structure, reliability, and criterion validity. *J Abnorm Child Psychol.* 1998; 26:279-291.
- Cornish K, Munir F, Wilding J. Perfil neuropsicológico y conductual de los déficits de atención en el síndrome x frágil. *Rev Neurol* 2001; 33 (Supl 1): S24- S29
- Coy JF, Sedlacek Z, Bächner D, Hameister H, Joos S, Lichter P, et al. Highly conserved 3' UTR and expression pattern of FXR1 points to a divergent gene regulation of FXR1 and FMR1. *Hum Mol Genet.* 1995; 4:2209-18.
- Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, et al. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am J Med Genet.* 2002; 110(3):226-33.
- Davidovic L, Navratil V, Bonaccorso CM, Catania MV, Bardoni B, Dumas ME. A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the fragile X syndrome mouse model. *Genome Res.* 2011 Dec; 21(12):2190-202.
- De Diego-Otero Y, Romero-Zerbo Y, el Bekay R, Decara J, Sanchez L, Rodriguez-de Fonseca F, Del Arco-Herrera I: α -tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X Fmr1-KO mouse: an experimental therapeutic approach for the FMR1 deficiency. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34:1011-1026.

- De Diego Otero, Y, Bakker C, Ragho P, Hoogeveen A, Oostra B, Willemsen R. Immunocytochemical characterisation of FMRP, FXR1P and FXR2P during embryonic development in the mouse. *Gene Funct and Disease*.2000; 1: 2837.
- De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R. Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:8332-41.
- de Diego-Otero Y, Calvo-Medina R, Quintero-Navarro C, Sánchez-Salido L, García-Guirado F, del Arco-Herrera I, Fernández-Carvajal I, et al. A combination of ascorbic acid and α -tocopherol to test the effectiveness and safety in the fragile X syndrome: study protocol for a phase II, randomized, placebo-controlled trial. *Trials*.2014; 15:345.
- De Vries BB, Jansen CC, Duits AA, Verheij C, Willemsen R, van Hemel JO, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, Oostra BA, Halley DJ. Variable FMR1 gene methylation of large expansions leads to variable phenotype in three males from one fragile X family. *J Med Genet*. 1996; 33:1007-10.
- De Vries BB, Mohkamsing S, van den Ouweland AM, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, et al. Collaborative Fragile X Study Group: Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. *Am J Hum Genet*. 1997;61:660–667
- 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; 103:520-2.
- Díaz D, Rodríguez-Carvajal R, Blanco A, Moreno-Jiménez B, Gallardo I, Valle C, van Dierendonck D. (Spanish adaptation of the Psychological Well-Being Scales (PWBS)). *Psicothema*. 2006; 18(3):572-7.
- Di Matteo V, Esposito E: Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord*.2003; 2:95–107.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Belloq JP, Mandel JL. The FMR1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*. 1993; 4(4):335-40.

- Dhariwal KR, Hartzell WO, Levine M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(4):712-6.
- Dupuy, H.J. The psychological general well-being (PGWB) index. En: Wegner NK, Mattson ME, Fuberg CP, editores. *Assesment of quality of life in clinical trials of cardiovascular therapies.* New York. Le Jacq Publishing;1984.cap 9; 170-183
- Dyer-Friedman J, Glaser B, Hessel D, Johnston C, Huffman LC, Taylor A, et al. Genetic and environmental influences on the cognitive outcomes of children with fragile X syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002;41(3):237-44
- Dziembowska M Milek J, Janusz A, Rejmak E, Romanowska E, Gorkiewicz T, et al. Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9. *J Neurosci.* 2012; 32(42): 1438–47
- Dziembowska M, Pretto DI, Janusz A, et al. High MMP-9 activity levels in fragile X syndrome are lowered by minocycline. *Am J Med Genet A* 2013; 161A:1897–1903.
- Eadie BD, Cushman J, Kannangara TS, Fanselow MS, Christie BR. NMDA receptor hypofunction in the dentate gyrus and impaired context discrimination in adult Fmr1-KO mice. *Hippocampus.*2010; 22: 241–254.
- Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet.* 1996; 5:1083-91.
- El Bekay R, Romero-Zerbo Y, Decara J, Sanchez-Salido L, Del Arco-Herrera I, Rodríguez-de Fonseca F, de Diego-Otero Y: 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.*2007; 26:3169–3180.
- Eldamhoughy S, Elhelw Z, Yamamah G, Hussein L, Fayyad I, Fawzy D: The vitamin E status among glucose-6 phosphate dehydrogenase deficient patients and effectiveness of oral vitamin E. *Int J Vitam Nutr Res.*1988; 58:184–188.

- Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, et al. Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial. *Circulation*.2003; 108:1059–1063
- Erickson CA, Mullett JE, McDougle CJ. Open-Label Memantine in Fragile X Syndrome. *J Autism Dev Disord*. 2009; 39(12):1629-35.
- Erickson CA, Stigler KA, Wink LK, Mullett JE, Fmr1-KOHN A, Posey DJ, McDougle CJ: A prospective open-label study of aripiprazole in fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl)*.2011; 216:85–90
- Erickson CA, Wink LK, Ray B, et al. Impact of acamprosate on behavior and brain-derived neurotrophic factor: an open-label study in youth with fragile X syndrome. *Psychopharmacology*. 2013; 228:75–84.
- Erickson CA, Weng N, Weiler IJ, Greenough WT, Stigler KA, Wink LK, McDougle CJ: Open-label riluzole in fragile X syndrome. *Brain Res* 2011, 1380:264–270.
- Fariss MW, Zhang JG. Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Toxicology*. 2003; 189: 129-46.
- Farré-Riba A, Narbona J: Conners' rating scales in the assessment of attention deficit disorder with hyperactivity (ADHD): a new validation and factor analysis in Spanish children. *Rev Neurol*.1997; 25:200–204
- Feng Y, Lakkis L, Devys D, Warren ST. Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. *Am J Hum Genet*. 1995; 56:106-13.
- Feranchak AP, Sontag MK, Wagener JS, Hammond KB, Accurso FJ, SoFmr1-KOI RJ: Prospective, long-term study of fat-soluble vitamin status in children with cystic fibrosis identified by newborn screen. *J Pediatr*.1999; 135:601–610.
- Fernandez-Carvajal I, Walichiewicz P, Xiaosen X, Pan R, Hagerman PJ, Tassone F: Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population. *J Mol Diagn* 2009, 11:324–329.
- Ferrando Lucas MT, BanúsGómez P, López Pérez G. Aspectos cognitivos y del lenguaje en niños con síndrome X frágil. *Rev neurol*. 2003; 36 (Supl 1): 137-142

- Fisch GS, Cohen IL, Gross AC, Jenkins V, Jenkins EC, Brown WT: Folic acid treatment of fragile X males: a further study. *Am J Med Genet.* 1988; 30: 393–399.
- Flint J, Yule W. Behavioral phenotypes. En: Rutter M, Taylor E, Hersow L. *Child and adolescent psychiatry.* Oxford:Wiley- Blackwell; 1994.p. 666– 687
- Forman HJ, Torres M, Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem.* 2002; 234-235:49-62.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 1991.20; 67(6):1047-58.
- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neuro degeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:4280-10
- García-Nonell, E. Rigau-Ratera, J. Artigas-Pallarés J. Autismo en el síndrome de X frágil. *Rev Neurol.* 2006; 42 (Supl 2): 95-S98
- Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16(6):666-72.
- Gatto CL, Broadie K. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front Synaptic Neurosci.* 2010; 2: 4-8
- Ghilan M , Hryciwc BN, Brocardo PS , Bostrom CA, Gil-Mohapel J. Enhanced corticosteroid signaling alters synaptic plasticity in the dentate gyrus in mice lacking the fragile X mental retardation protein *Neurobiology of Disease.* 2015;77 ,26–34
- González MP, Bobes J, Sáiz PA, Pedregal J, Bousoño M. Bienestar psicológico y población involutiva. Evaluación a través del PGWB Index. *Rev Gerontol.* 1996; 4:232-238
- Gregory J, Lowe S, Bates CJ, Prentice A, Jackson LV, Smithers G, et al. National diet and nutrition survey young people aged 4-18 years. Volumen 1. Bates B, Lennox A, Bates C, Swan G. Report of the diet and nutrition survey. London: The Stationery Office. 2000.
- Gross C, Hoffmann A, Bassell GJ, Berry-Kravis EM. Therapeutic Strategies in Fragile X Syndrome: From Bench to Bedside and Back. *Neurotherapeutics.* 2015;12(3): 584-608

- Grossi E, Groth N, Mosconi P, Cerutti R, Pace F, Compare A. Development and validation of the short version of the Psychological General Well-Being Index (PGWB-S). *Health and Quality of Life Outcomes*. 2006; 4, 88-90.
- Gruss M, Braun K. Alterations of amino acids and monoamine metabolism in male Fmr1 knockout mice: a putative animal model of the human fragile X mental retardation syndrome. *Neural Plast*. 2001;8(4):285-98.
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, et al. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*. 2001;57(1):127-30
- Hagerman RJ: Physical and behavioral phenotype. En: *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*. 3rd edition. Hagerman RJ, Hagerman PJ. Editors. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2002. p. 3-109.
- Hagerman PJ. The fragile X prevalence paradox. *J Med Genet*. 2008;45(8):498-9
- Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, et al. Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics*. 2009 Jan;123:378-90
- Hagerman RJ, Des-Portes V, Gasparini F, et al. Translating molecular advances in fragile X syndrome into therapy: a review. *J Clin Psychiatry*. 2014; 75:294-e307.
- Hagerman R, Polussa J. Treatment of the psychiatric problems associated with fragile X syndrome. *Curr Opin Psychiatry* 2015, 28:107-112
- Hall SS, Jiang H, Reiss AL, Greicius MD. Identifying large-scale brain networks in fragile X syndrome. *JAMA Psychiatry*. 2013 N; 70(11):1215-23.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006; 97(6):1634-58.
- Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen SH, Laird CD. Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*. 1992; 1:571-8.

- Hanson A, Hagerman RJ. Serotonin dysregulation in Fragile X Syndrome: implications for treatment. *Int & Rare Diseases Res.* 2014; 3(4):110-117.
- Hasnian BJ, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: What should we be telling our patients? *Clev Clin J Med.* 2004;71(4):327-4
- He CX, Portera-Cailliau C. The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience.*2013; 251:120–128.
- Heo JH, Hyon L, Lee KM. The possible role of antioxidant vitamin C in Alzheimer's disease treatment and prevention. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2013; 28(2):120-5.
- Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997; 20:78-84.
- Hessler D, Glaser B, Dyer-Friedman J, Blasey C, Hastie T, Gunnar M, Reiss AL. Cortisol and behavior in fragile X syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2002; 27:855-72.
- Hessler D, Tassone F, Loesch DZ, Berry-Kravis E, Leehey MA, Gane LW, et al. Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*2005; 139:115–121.
- Hessler D, Glaser B, Dyer-Friedman J, Reiss AL. Social behavior and cortisol reactivity in children with fragile X syndrome. *J Child Psychol Psychiatry.* 2006 ;47:602-10
- Hessler D, Tassone F, Cordeiro L, Koldewyn K, McCormick C, Green C, et al. Brief report: aggression and stereotypic behavior in males with fragile X syndrome--moderating secondary genes in a "single gene" disorder. *J Autism Dev Disord.* 2008; 38:184-9.
- Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE and Schalling M. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat. Genet.*1993, 3, 36–43
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1991 1; 41:289-94.

- Hoeft F, Carter JC, Lightbody AA, Cody Hazlett H, Piven J, Reiss AL. Region specific alterations in brain development in one- to three-year-old boys with fragile X syndrome. *PNAS*. 2010; 107(20):9335–9339
- Hoeft F, Walter E, Lightbody AA, Hazlett HC, Chang C, Piven J, et al. Neuroanatomical differences in toddler boys with fragile X syndrome and idiopathic autism. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;68 (3):295-305
- Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2014; 164A (7):1648-58.
- Hustyi KM, Hall SS, Jo B, Lightbody AA, Reiss AL. Longitudinal trajectories of aberrant behavior in fragile X syndrome. *Res Dev Disabil*. 2014; 35(11):2691-701.
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 2012; 74:285–299.
- Indah Winarni T, Chonchaiya W, Adams E, Au J, Mu Y, Rivera SM, et al. Sertraline may improve language developmental trajectory in young children with fragile x syndrome: a retrospective chart review. *Autism Res Treat*. 2012; 1043-17.
- Jacquemont S, Curie A, des Portes V, Torrioli MG, Berry-Kravis E, Hagerman RJ, et al. Epigenetic modification of the FMR1 gene in fragile X syndrome is associated with differential response to the mGluR5 antagonist AFQ056. *Sci Transl Med*.2011; 3:64-81.
- Jacquemont S, Berry-Kravis E, Hagerman R, von Raison F, Gasparini F, Apostol G, et al. The challenges of clinical trials in fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014; 231(6):1237-50.
- Jackson A 3rd, Hogerman R, Levitas A. Serotonin levels in fragile X autistic patients. *J Autism Dev Disord*. 1984; 14(4):451-2.
- Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem*.1999; 73:889–902.
- Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*.2000; 9:901–908.
- Joseph-Bravo P, De Gortari P. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología*. 2007; 14, 65–76.

- Kappus H, Diplock AT. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic Biol Med.* 1992; 13:55–74
- Kelley DJ, Bhattacharyya A, Lahvis GP, Yin JC, Malter J, Davidson RJ. The cyclic AMP phenotype of fragile X and autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32(8):1533-43.
- Kidd SA, Lachiewicz A, Barbouth D, Blitz RK, Delahunty C, McBrien D, et al. Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics.* 2014 Nov; 134(5):995-1005.
- Kiefer F, Mann K. Acamprosate: how, where, and for whom does it work? Mechanism of action, treatment targets, and individualized therapy. *Curr Pharm Des.* 2010; 16:2098–2102.
- Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3, 453–462.
- Kirkpatrick LL, Mc Ilwain KA, Nelson DL. Comparative genomic sequence analysis of the FXR gene family: FMR1, FXR1 and FXR2. *Genomics.* 2001; 78, 169–177.
- Kishida KT, Klann E: Sources and targets of reactive oxygen species insynaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(2):233–244.
- Kontush K, Schekatolina S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1031:249-62.
- Korade Z, Xu L, Harrison FE, Ahsen R, Hart SE, Folkes OM, Mirnics K, Porter NA. Antioxidant supplementation ameliorates molecular deficits in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biol Psychiatry.* 2014; 75(3):215-22.
- Koukoui SD, Chaudhuri A. Neuroanatomical, molecular genetic and behavioral correlates of fragile X syndrome. *Brain res rev.* 2007; 53(1):27-38.
- Langenbeck U, Schmidtke J, Bartels I, Hansmann I, Knüppel H. Mean corpuscular hemoglobin is increased in Martin-Bell syndrome. *Hum Genet.* 1984; 66(4):365-6.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 2001; 10:329-38.

- Lauterborn, JC. Stress induced changes in cortical and hypothalamic c-fos expression are altered in fragile X mutant mice. *Mol. Brain Res.* 2004; 131, 101–109.
- Lavine JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr* 2000, 136:734–738.
- Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(8):4843-8
- Leigh MJ, Nguyen DV, Mu Y. A randomized double-blind, placebo controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J Dev Behav Pediatr.* 2013; 34:147–155
- Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002; 8(3):117-34.
- Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:2276-83.
- Lim JH, Booker AB, Fallon JR. Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *J Cell Physiol* 2005; 205:170–175.
- Lima-Cabello L, Garcia-Guirado F, Calvo-Medina R,, el Bekay R, Perez-Costillas L, Quintero-Navarro C, et al An Abnormal Nitric Oxide Metabolism Contributes to Brain Oxidative Stress in the Mouse Model for the Fragile X Syndrome, a Possible Role in Intellectual Disability. *Oxidativ Med and Cell Long .*2016, Article ID 8548910, 12 pages
- Lodhi GM, Latif R, Hussain MM, Naveed AK, Aslam M. Effect of ascorbic acid and alpha tocopherol supplementation on acute restraint stress induced changes in testosterone, corticosterone and nor epinephrine levels in male Sprague Dawley rats. *JAMC.* 2014;26(1):7-11.
- Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet.*1969; 21: 231-44
- Lupien SJ, De Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci.* 1998;1(1):69-73
- Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex linkage. *J Neurol Psychiatry* 1943; 6:154-7.

- Marshall CJ: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995, 80:179–185.
- Markham JA, Beckel-Mitchener AC, Estrada CM, Greenough WT: Corticosterone response to acute stress in a mouse model of fragile X syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2006, 31:781–785.
- McEwen BS, Magarinos AM. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Jun 21;821:271-84
- McNaughton CH, Moon J, Strawderman MS, Maclean KN, Evans J, Strupp BJ. Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav Neurosci*. 2008;122(2):293-300.
- Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, et al. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *Fmr1* null mice. *Neuro*. 2003; 37, 417–431.
- McNaughton CH, Moon J, Strawderman MS, Maclean KN, Evans J, Strupp BJ. Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav. Neurosci*. 2008; 122, 293–300
- Moyano D, Vilaseca MA, Pineda M, Campistol J, Vernet A, Póo P, et al. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin Chim Acta*. 1997, 263:147–155.
- Mustafa Nachvak S, Reza Neyestani T, Ali Mahboob S, Sabour S, Ali Keshawarz S, Speakman JR. α -Tocopherol supplementation reduces biomarkers of oxidative stress in children with Down syndrome: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Oct; 68(10):1119-23.
- National Institute for Clinical Excellence. Methylphenidate (Ritalin, Equasym) for attention deficit/ hyperactivity disorder (ADHD) in childhood. London: National Institute for Clinical Excellence (NICE); 2000. p. 13. HTA 20001776. URL: <http://nhscrd.york.ac.uk/online/hta/20001776.htm>
- Nakamoto M, Nalavadi V, Epstein MP, Narayanan U, Bassell GJ, Warren ST. Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive

- mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 15537-42.
- Nawara M, Szczaluba K, Poirier K, Chrzanowska K, Pilch J, Bal J, et al. The ARX mutations: a frequent cause of X-linked mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006; 140: 727-32.
 - Nobili V, Manco M, Devito R, Ciampalini P, Piemonte F, Marcellini M: Effect of vitamin E on aminotransferase levels and insulin resistance in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1553–1561.
 - Nolin SL, Dobkin C, Brown WT. Molecular analysis of fragile X syndrome. *Curr Protoc Hum Genet*. 2003;38, 951-962
 - Nur Azlina MF, Nafeeza MI. Tocotrienol and alpha-tocopherol reduce corticosterone and noradrenalin levels in rats exposed to restraint stress. *Pharmazie*. 2008;63(12):890-2.
 - Olmos-Serrano JL, Paluszkiwicz SM, Martin BS, Kaufmann WE, Corbin JG, Huntsman MM. Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*.2010; 30:9929–9938.
 - Ogunmekan AO, Hwang PA. A randomized, double-blind, placebo controlled, clinical trial of D- α -tocopheryl acetate (vitamin E), as add-on therapy, for epilepsy in children. *Epilepsia*.1989; 30:84–89.
 - Osakada F, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kane S, Akaike A. Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *Eur J Pharmacol*. 2003; 28:15-22.
 - Osterweil EK, Chuang SC, Chubykin AA, et al. Lovastatin corrects excess protein synthesis and prevents epileptogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuron*. 2013; 77:243–250.
 - Papas KA, Sontag MK, Pardee C, SoFmr1-KOI RJ, Sagel SD, Accurso FJ, Wagener JS: A pilot study on the safety and efficacy of a novel antioxidant rich formulation in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*.2008; 7:60–67.
 - Paribello C, Tao L, Folino A, Berry-Kravis E, Tranfaglia M, Ethell IM, Ethell DW. Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. *BMC Neurol*. 2010; 10:91-97.

- Parisotto EB, Garlet TR, Cavalli VL, Zamoner A, da Rosa JS, Bastos J, et al. Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. *Res Dev Disabil.* 2014 ;3(6):1228-36.
- Parisotto EB, Giaretta AG, Zamoner A, Moreira EA, Fröde TS, Pedrosa RC, Filho DW. Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome. *Res Dev Disabil.* 2015; 45-46:14-20.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. Absence of expression of the FMR1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 1991;66:817-22
- Pietropaolo S, Goubran MG, Joffre C, Aubert A, Lemaire-Mayo V, Crusio WE, Layé S. Dietary supplementation of omega-3 fatty acids rescues fragile X phenotypes in Fmr1-KO mice. *Psychoneuroendocrinol.* 2014;49:119-29
- Pop AS, Gomez-Mancilla B, Neri G, et al. Fragile X syndrome: a preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology.* 2014; 231:1217–1226
- Porter NM, Landfield PW. Stress hormones and brain aging: adding injury to insult? *Nat Neurosci.* 1998;1(1):3-4.
- Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ. De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J Cell Physiol* 1995, 163:555–560.
- Raber J, Sorg O, Horn TF, Yu N, Koob GF, Campbell IL, Bloom FE. Inflammatory cytokines: putative regulators of neuronal and neuroendocrine function. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998;26(2-3):320-6
- Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel TA, et al. The structure of the N-terminal domain of the Fragile X Mental retardation protein: a platform for protein–protein interaction. *Structure.* 2006; 14, 21–31.
- Rauhala P, Lin AMY, Chiueh CC. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 1998, 12:165–173.

- Rebec GV, Barton SJ, Marseilles AM, Collins K. Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport*. 2003; 14(9):1263-5.
- Renda MM, Voigt RG, Babovic-Vuksanovic D, Highsmith WE, Vinson SS, Sadowski CM, Hagerman RJ. Neurodevelopmental disabilities in children with intermediate and premutation range fragile X cytosine-guanine-guanine expansions. *J Child Neurol*. 2014;29(3):326-30
- Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B, et al. The full mutation in the FMR1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet*. 1993;4(2):143-6.
- Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*. 1998;56:359-84.
- Roberts JE, Clarke MA, Alcorn K, Carter JC, Long AC, Kaufmann WE. Autistic behavior in boys with fragile X syndrome: social approach and HPA-axis dysfunction. *J Neurodev Disord*. 2009;1(4):283-91.
- Rogers SJ, Wehner EA, Hagerman RJ. The behavioural phenotype in fragile X: symptoms of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr*. 2001; 22: 409-17.
- Romero-Zerbo Y, Decara J, el Bekay R, Sanchez-Salido L, Del Arco-Herrera I, et al. Protective effects of melatonin against oxidative stress in Fmr1 knockout mice: a therapeutic research model for the fragile X syndrome. *J Pineal Res*. 2009 Mar; 46:224-234.
- Rooms L, Kooy RF. Advances in understanding fragile X syndrome and related disorders. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(6):601.
- Rosen LB, Ginty DD, Weber MJ, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*. 1994; 12:1207-1221
- Rousseau F, Robb LJ, Rouillard P, Der Kaloustian VM. No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. *Hum Mol Genet*. 1994;3(6):927-30.

- Rudelli RD, Brown WT, Wisniewski K, Jenkins EC, Laure-Kamionowska M, Connell F, Wisniewski HM. Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol.* 1985;67:289-95.
- Saldarriaga W, Tassone F, González-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, Hagerman R. Fragile X Syndrome. *Colomb Med.* 2014; 45(4): 190-8.
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med.* 1997;336:1216-22.
- SCF (Scientific Committee for Food) (2003) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin E Commission of the European Communities, Luxembourg. http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html.
- Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:211-215
- Seibert J, Ysek CM, Penno CA, Schmid Y, Kratschmar Dv. Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and methylphenidate on circulating steroid levels in healthy subjects. *Neuroendocrinology.* 2014;100(1):17-25
- Sherman, S. L. (2000), Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000, 1997: 189–94
- Shirakata Y, Shiraishi S, Sayama K, Shinmori H, Miki Y: High-dose tocopherolacetate therapy in epidermolysis bullosa siblings of the Cockayne-Touraine type. *J Dermatol.*1993; 20:723–725
- Sinden RR. Neurodegenerative diseases. Origins of instability. *Nature.* 2001; 411:757-8.
- Sidorov MS, Auerbach BD, Bear MF. Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Mol Brain.*2013; 6:15-21
- Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, et al. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(11):2103-8.
- Steullet P, Cabungcal JH, Kulak A, Kraftsik R, Chen Y, Dalton TP, et al. Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus: impairment of parvalbumin neurons, γ oscillations, and related behaviors. *J Neurosci.* 2010; 30:2547–2558.

- Strom CM, Brusca RM, Pizzi WJ. Double-blind, placebo-controlled crossover study of folinic acid (Leucovorin) for the treatment of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1992; 44:676–682.
- Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington DC: The National Academies Press; 2000.p.35-57.
- Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA: Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid Redox Signal.*2006; 8:2021–2037.
- Sung S, Yao Y, Uryu K, Yang H, Lee VM, Trojanowski JQ, Praticò D. Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2004; 18:323-5.
- Sutherland GR, Ashford PL. X-linked mental retardation with macroorchidism and the fragile site at Xq 27 or 28. *Hum Genet.*1979; 48:117–120.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST. DNA methylation represses FMR1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 1992; 1:397-400.
- Taffe JR, Gray KM, Einfeld SL, Dekker MC, Koot HM, Emerson E, et al. Short Form of the Developmental Behaviour Checklist. *American Journal on Mental Retardation*, 2007; 112(1), 31-39
- Tang AH, Alger BE. Homer protein-metabotropic glutamate receptor binding regulates endocannabinoid signaling and affects hyperexcitability in a mouse model of fragile x syndrome. *Neurosci.*2015; 35(9):3938-45.
- Tassone F, Hagerman RJ, Ikle DN et al. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 84: 250–261
- Tassone F, Hagerman RJ, Loesch DZ, Lachiewicz A, Taylor AK, Hagerman PJ. Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet.* 2000; 94:232-6.

- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Hagerman PJ. A majority of fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of FMR1 messenger RNA. *J Med Genet.* 2001; 38: 453-6.
- Tahzib M, Frank R, Gauthier B, and Valderrama E, Trachtman H: Vitamin E treatment of focal segmental glomerulosclerosis: results of an open-label study. *Pediatr Nephrol.*1999; 13:649–652.
- Taketomo CK, Hodding JH, Kraus DM. *Pediatric Dosage Handbook.* 14th edition. Hudson, OH: Lexi-Comp; 2007.
- Tamanini F, Kirkpatrick LL, Schonkeren J, van Unen L, Bonte C, Bakker C, et al. The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. *Hum Mol Genet.* 2000;9: 1487-93.
- Taylor AK, Tassone F, Dyer PN, Hersch SM, Harris JB, Greenough WT, Hagerman RJ. Tissue heterogeneity of the FMR1 mutation in a high-functioning male with fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1999 May 28;84:233-9.
- Tejada MI, Glover G, Martínez F, Guitart M, de Diego-Otero Y, Fernández-Carvajal I, et al. Molecular testing for fragile X: analysis of 5062 tests from 1105 fragile X families--performed in 12 clinical laboratories in Spain. *Biomed Res Int.* 2014. :195793.
- Torrioli MG, Vernacotola S, Mariotti P, Bianchi E, Calvani M, De Gaetano A, Chiurazzi P, Neri G: Double-blind, placebo-controlled study of L-acetylcarnitine for the treatment of hyperactive behaviour in fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1999, 87:366–368.
- Torrioli MG, Vernacotola S, Peruzzi L, Tabolacci E, Mila M, Militerni R, et al. 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.*2008; 146A:803–812.
- Torrioli M, Vernacotola S, Setini C, Bevilacqua F, Martinelli D, Snape M, et al. Treatment with valproic acid ameliorates ADHD symptoms in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet A.*2010; 152A:1420–1427.
- Tsigos C, Chrousos G. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J of Psych Res.* 2002; 53: 865–871.

- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of Fragile X Syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 196- 7.
- Utari A, Chonchaiya W, Rivera SM, Schneider A, Hagerman RJ, Faradz SM, Ethell IM, Nguyen DV: Side effects of minocycline treatment in patients with fragile X syndrome and exploration of outcome measures. *Am J Intellect Dev Disabil.* 2010; 115:433–443.
- Vajro P, Mandato C, Franzese A, Ciccimarra E, Lucariello S, Savoia M, Capuano G, Migliaro F: Vitamin E treatment in pediatric obesity-related liver disease: a randomized study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*2004; 38:48–55.
- Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA. Characterization and localization of the FMR1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature.* 1993; 363:722-4.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 1991;65(5):905-14.
- Wang H , Pali S, Pozzo-Miller L , Doering LC "Targeted pharmacological treatment of autism spectrum disorders: fragile X and Rett syndromes." *Front Cell Neurosci.* 2015; 9: 55-59
- Westmark CJ, Malter JS. FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol.*2007;5 (3):52.
- Wilfond BS, Farrell PM, Laxova A, Mischler E. Severe hemolytic anemia associated with vitamin E deficiency in infants with cystic fibrosis. *Clin Pediatr.* 1994; 33:2–7.
- Winklhofer-Roob BM, Hof MA, Shmerling DH. Long-term oral vitamin E supplementation in cystic fibrosis patients: RRR- α -tocopherol compared with all-rac- α -tocopheryl acetate preparations. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63:722–728.
- Wirojanan J, Jacquemont S, Diaz R, Bacalman S, Anders TF, Hagerman RJ, Goodlin-Jones BL: The efficacy of melatonin for sleep problems in children with autism, fragile X syndrome, or autism and fragile X syndrome. *J Clin Sleep Med.*2009; 5:145–150.

- Wisbeck JM, Huffman LC, Freund L, Gunnar MR, Davis EP, Reiss AL. Cortisol and social stressors in children with fragile X: a pilot study. *J Dev Behav Pediatr.* 2000;21(4):278-82
- Wohrle D, Schwemmle S, Steinbach P. DNA methylation and triplet repeat stability: new proposals addressing actual questions on the CGG repeat of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1996;64(2):266-7.
- Wolf TL, Kotun J, Meador-Woodruff JH. Plasma copper, iron, ceruloplasmin and ferroxidase activity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2006;86(1-3):167-71.
- Yang CJ, Tan HP, Du YJ. The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development. *Neuroscience.* 2014; 267:1-10.
- Yasui K, Kurata T, Yashiro M, Tsuge M, Ohtsuki S, Morishima T: The effect of ascorbate on minor recurrent aphthous stomatitis. *Acta Paediatr.* 2010, 99:442-445.
- Zhang J, Fang Z, Jud C, Vansteensel MJ, Kaasik K, Lee CC, et al. Fragile X-related proteins regulate mammalian circadian behavioral rhythms. *Am J Hum Genet.* 2008;83:43-52.

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS:

1. Ejemplo de herencia del SXF	6
2. Estructura del gen FMR1	21
3. Interacción de la proteína FMRP dentro de la neurona	26
4. Diferentes dianas terapéuticas propuestas para el SXF	33
5. Resumen de la producción de ROS en las neuronas	40
6. Hemoglobina corpuscular media en los diferentes grupos	80
7. Volumen corpuscular medio en los diferentes grupos	80
8. Representación gráfica de los valores de ceruloplasmina	83
9. Representación gráfica de los valores de transferrina	83
10. Representación gráfica de los valores de AMPcíclico	84
11. Representación gráfica de los valores de serotonina	
12. Representación gráfica de los niveles de ácido ascórbico	87
13. Representación gráfica de los niveles de tocoferol	87
14. Niveles de adrenalina y noradrenalina.	90
15. Niveles de Cortisol y ACTH	90
16. Niveles plasmáticos de aminoácidos en los que hay diferencias en los grupos comparados	92
17. Diagrama de flujo del ensayo piloto	95
18. Criterios de aleatorización por bloques y estratificación por factores de confusión	96
19. Escala de Conners para padres y profesores índice total de sintomatología para TDHA	101
20. Escala de Conners para padres índice inatención e hiperactivo-impulsivo	102
21. Escala de Conners para profesores índice inatención e hiperactivo-impulsivo	103
22. Escala verbal del test WISC-R, estratificada grupos de edad	104
23. Escala manipulativa del test WISC-R, estratificada grupos de edad	105
24. Gráfico de resultados de niveles de Vit C	112
25. Gráfico de resultados de niveles de Vit E	112

26. Gráfico de resultados de niveles de adrenalina en orina	117
---	-----

INDICE DE TABLAS

1. Características fenotípicas propias del SXF	18
2. Mecanismos de defensa antioxidante endógena	39
3. Valoración de resultados del cuestionario de Conners	68
4. descripción de la muestra de participantes	78
5. Valores de hemoglobina corpuscular media y volumen corpuscular medio	79
6. Valores alterados con significación estadística de los metabolitos medidos en nuestra muestra	82
7. Valores de tocoferol y ácido ascórbico	86
8. Niveles de hormonas relacionados con estrés	89
9. Niveles plasmáticos de aminoácidos en suero	91
10. Datos sociodemograficos de la muestra analizada, puntuación en la escala de Conners y condiciones médicas asociadas	94
11. Efectos adversos recogidos en ambas series	97
12. Características de los participantes y respondedores según los diferentes subgrupos	99
13. Datos de análisis de resultados del índice total de sintomatología TDHA cuestionario Conners para padres, 6-13 años	100
14. Datos de análisis de resultados del Índice total de sintomatología TDHA en cuestionario Conners para padres 13-18 años	100
15. Resultados del análisis del índice global de la escala DBC-24	107
16. Resultados Subescala "problemas de relación social" de la DBC-24	108
17. Resultado de la valoración de la escala del bienestar general psicológico en familiares	110
18. Resultado de los niveles de vit C en plasma en estadio basal y tras completar tratamiento	111

19. Resultado de los niveles de vit E en plasma en estadio basal y tras completar tratamiento	113
20. Catecolaminas en orina, niveles normales en niños	115
21. Valores de adrenalina en orina de 24 horas en los 30 participantes del ensayo	116
22. Valores de ácido homovanílico en orina de 24 horas en los 30 participantes del ensayo	118
23. Resumen de los ensayos clínicos, las moléculas y sus dianas	139
24. Recomendaciones de ingesta diaria de vit- C	140
25. Recomendaciones de ingesta diaria de vit-E	141
26. Dosis máxima diarias recomendadas de vit-C y tocoferol	143

