

## Mutación dinámica y enfermedad: expansiones de trinucleótidos

F. Martínez Castellano y E. Monrós Marín

□ **INTRODUCCIÓN.** La expansión de secuencias del DNA genómico formadas por la repetición en tándem de un trinucleótido constituye una categoría reciente de mutación genética, sin precedentes en cualquier otro tipo de organismos. Presentan, tanto desde el punto de vista molecular como de genética clínica, peculiaridades que justifican una mención aparte del resto de las mutaciones, denominadas «estáticas» en contraposición.

Las secuencias formadas por la repetición en tándem de un motivo pequeño, también denominadas secuencias microsatélites, son bastante abundantes en todo el genoma humano, y a menudo aparecen de manera polimórfica, es decir, una misma secuencia está constituida por un número de repeticiones que puede variar de un cromosoma a otro.

Aunque no se descarta la posibilidad de que en el futuro se describan nuevos tipos, por el momento sólo se des-

cribieron expansiones de trinucleótidos que pueden llegar a ser patológicas. De las 64 posibles combinaciones de tres nucleótidos, que se reducen a 32 si se tiene en cuenta la secuencia complementaria, sólo tres: (CGG)/(CCG), (CAG)/(CTG) y recientemente (GAA)/(TTC), parecen intervenir en estas expansiones patológicas (tabla 13-1). La transmisión de estas secuencias, como la del conjunto de secuencias microsatélites, suelen ser estables de una generación a la siguiente, sólo con pequeños cambios esporádicos que originan la variabilidad polimórfica poblacional. La peculiaridad de estos tipos de repeticiones es que una vez superado cierto umbral, que corresponde a unas 40 repeticiones consecutivas, se tornan tan inestables que virtualmente nunca aparecen con el mismo tamaño en las generaciones siguientes (inestabilidad meiótica). Aunque se pueden producir tanto expansiones como retracciones de estas secuencias, la tendencia general, al menos

**Tabla 13-1** Relación de enfermedades hereditarias asociadas a la expansión de secuencias microsatélites y características moleculares

ENFERMEDAD	LOCALIZACIÓN	TRIPLETE	ESPECTRO NORMAL	ESPECTRO PREMUTACIÓN	ESPECTRO MUTACIÓN	POSICIÓN DE LA REPETICIÓN
Cromosoma X frágil FRAXA	Xq27.2	CGG	5-57	50-200	200-1.500	5' no traducida
FRAXE	Xq28	CCG	6-25	100-200	200-1.000	5' no traducida (?)
Distrofia miotónica	19q13	CTG	5-40	35-50	50-2.000	3' no traducida
Atrofia muscular espinal y bulbar	Xq21	CAG	11-31		40-62	Codificante (Gln)
Corea de Huntington	4p16.3	CAG	9-35	33-39 (?)	37-100	Codificante (Gln)
Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1)	6p23	CAG	19-36		43-81	Codificante (Gln)
Atrofia dentatorrubropalidoluisiana	12p	CAG	7-23		49-75	Codificante (Gln)
Enfermedad de Machado-Joseph (SCA3)	14q32.1	CAG	12-36		67-79	Codificante (Gln)
Ataxia de Friedreich	9q13	GAA	7-24	(?)	200-900	Intrón 1

durante las primeras generaciones, suele ser el incremento del número de repeticiones. Otra característica general es que una vez superado un segundo umbral, alrededor de las 200 repeticiones, además de la inestabilidad meiótica estas secuencias suelen presentar inestabilidad mitótica, o sea diferencias en el número de repeticiones entre células del mismo individuo.

Según el tipo de trinucleótido y la posición en el gen se pueden diferenciar cuatro categorías de expansiones patológicas que se describen a continuación.

### ■ SECUENCIAS (CGG)<sub>n</sub> SITUADAS EN LA REGIÓN 5' NO CODIFICANTE DEL GEN

Es el caso del síndrome del cromosoma X frágil (asociado con el sitio frágil FRAXA), la primera enfermedad hereditaria descubierta originada por secuencias inestables, así como otra forma de retraso mental asociada con el cercano sitio frágil FRAXE. Otras expansiones (CGG)<sub>n</sub> también son responsables de los sitios frágiles heredables FRAXE, FRA16A o FRA11B, que no se relacionan con ninguna enfermedad conocida, presumiblemente por que no llegan a afectar ningún gen importante en su proximidad.

Mediante estudios epidemiológicos se llegó a la conclusión de que la penetrancia del síndrome del cromosoma X frágil, es decir, la proporción de portadores de la mutación que llegan a expresarla en el fenotipo, parecía aumentar en el curso de sucesivas generaciones, fenómeno relacionado con el de anticipación del que se tratará más adelante, pero con el que no debe confundirse. En cualquier caso, a partir de esta observación se acuñaron los términos *premutación* y *mutación completa* para diferenciar los estados asintomático y patológico de lo que se suponía como mutación en dos pasos. Posteriormente, con el aislamiento del gen FMR1 (*retraso mental frágil 1*) se pudo identificar la premutación con expansiones moderadas, inferiores a 200 repeticiones, de la secuencia microsatélite (CGG)<sub>n</sub> en la región 5' del gen. Estos incrementos moderados presentan inestabilidad meiótica en su transmisión, pero no llegan a afectar la expresión del gen. La mutación completa, que muestra inestabilidad mitótica además de meiótica, corresponde en general a incrementos superiores a las 200 repeticiones que inducen una inactivación funcional del gen FMR1. Todavía no se sabe con certeza si, como causa o como consecuencia de la inactivación del gen, la mutación completa se asocia además con un exceso de metilación tanto en la isla CpG adyacente al gen, como en la propia repetición. Este exceso de metilación se detecta normalmente en todos los genes sujetos a inactivación en el cromosoma X inactivo, como resultado del proceso de lionización.

El sexo del progenitor ejerce gran influencia sobre la dinámica de este tipo de expansiones, es decir, la tendencia a ganar o perder repeticiones durante su transmisión, como ocurre, aunque de manera diferente, en otros tipos de expansiones. Las premutaciones maternas suelen ganar repeticiones durante su transmisión, y son las únicas en las que se produce el salto a mutación completa. Este paso a la mutación patológica depende además del tamaño de la premutación: si contiene menos de 60 repeticiones se transmite como premutación, y con más de 90 repeticiones suele dar lugar a una mutación completa, mientras que en el intervalo intermedio el riesgo aumenta con el tamaño. Las mutaciones completas maternas suelen transmitir-

se como tales y sólo de modo muy esporádico se producen retracciones a premutación. En cambio, las expansiones paternas se transmiten con pequeñas modificaciones de tamaño, salvo en los pocos casos descritos de portadores de mutación completa (ya que a menudo son estériles), en los cuales las hijas reciben expansiones en el espectro de la premutación.

Una característica importante de la secuencia normal (CGG)<sub>n</sub> es que suele contener tripletes AGG en su interior, a modo de interrupciones de la repetición. Estas interrupciones confieren mayor estabilidad intergeneracional a la repetición, de manera que existe cierto solapamiento de tamaños entre los alelos normales (estabilizados por un número de interrupciones AGG) y las premutaciones más pequeñas, que carecen de esas interrupciones. De este modo, se ha sugerido que la aparición de nuevos alelos inestables, que terminarán por convertirse en patogénicos después de varias generaciones, puede deberse a dos mecanismos alternativos: por ganancia de nuevas repeticiones CGG en un largo tramo sin interrupciones, o bien por pérdida/conversión de alguna interrupción AGG. Parece evidente que la inestabilidad aparece como consecuencia de la existencia de un tramo de ~40 repeticiones consecutivas.

El sitio frágil FRAXE, asociado con una forma más leve de retraso mental, se ha estudiado en menor grado que el FRAXA. Sin embargo, parece ser muy similar a éste, ya que también se ha detectado un exceso de metilación de la región 5' del gen correspondiente, inducido por grandes expansiones de la secuencia (CGG)<sub>n</sub>.

### ■ SECUENCIAS (CTG)<sub>n</sub> LOCALIZADAS EN LA REGIÓN 3' NO TRADUCIDA

Por el momento sólo se conoce el caso de la distrofia miotónica, una enfermedad que se transmite en forma autosómica dominante, caracterizada por un cuadro de miotonía, distrofia muscular y otros rasgos asociados, que en conjunto se presentan con una expresión clínica muy variable entre los individuos de una misma familia. En esta entidad resulta paradigmático el fenómeno de anticipación, es decir, un aumento de la gravedad con que se presenta en generaciones sucesivas. Se obtuvo una explicación parcial de este fenómeno cuando se identificó la mutación responsable: la expansión de la repetición (CTG)<sub>n</sub> localizada en la región 3' no traducida de un gen que codifica para una proteincinasa al que se ha denominado DMPK (*proteincinasa de la distrofia miotónica*). Existe una clara correlación cuantitativa entre el tamaño de la expansión (CTG)<sub>n</sub> y el grado de afectación fenotípica: en las primeras generaciones, los individuos prácticamente asintomáticos muestran incrementos muy pequeños sobre el espectro normal; las generaciones intermedias, con la forma clásica de distrofia miotónica, suelen contener entre 100 y más de 1.000 tripletes en la misma región, mientras que la forma congénita, especialmente agresiva y letal en los primeros años de vida, presenta expansiones en el espectro superior, con frecuencia más de 1.000 CTG.

Se ha observado que mientras que los varones pueden generar expansiones intermedias en su descendencia, las mayores expansiones sólo se producen en las mujeres. Por otra parte, tampoco se explica, salvo quizá por mosaicismo entre distintos tejidos de un mismo individuo, por qué



algunos pacientes que muestran (al menos en sus células sanguíneas) expansiones situadas en el mismo espectro que las de las formas congénitas, padecen no obstante una enfermedad mucho menos agresiva.

Por otra parte, tampoco existe una evidencia clara de que la expansión altere la expresión del gen DMPK o su patrón de metilación como en el tipo anterior: los distintos estudios realizados resultaron incoherentes y, en el mejor de los casos, insuficientes para aducir una pérdida de función de dicho gen. En ningún paciente se ha detectado otra mutación en ese gen, lo que sugiere que la expansión en sí podría generar una ganancia de función específica —desconocida por el momento—, o bien que sea otro el gen afectado; hasta ahora, ésta parece ser la explicación más aproximada.

### ■ SECUENCIAS (CAG)<sub>n</sub> EN SECUENCIAS CODIFICANTES

Por el momento, este tipo de expansiones es el que muestra la lista más larga de enfermedades, ya que son responsables de la atrofia muscular espinal y bulbar (enfermedad de Kennedy), la ataxia espinocerebelosa tipo 1, la enfermedad de Huntington, la atrofia dentatorrubropalidoluisiana, la enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelosa tipo 3) y el síndrome de Haw River. Sin embargo, presentan toda una serie de características en común que las diferencian claramente de las restantes expansiones patológicas, sin duda por ser las únicas que codifican para los aminoácidos:

1. Aunque el tamaño de los alelos normales es muy similar al de los otros tipos, las expansiones son mucho más modestas, habitualmente entre 40 y más de 60 repeticiones.

2. La pauta de lectura es siempre la misma, es decir, todas codifican para el aminoácido glutamina. Las repeticiones CAG que codifican para tramos de poliglutamina se encuentran en varios factores de transcripción y, en particular, en proteínas importantes para el desarrollo neuronal de *Drosophila*, donde se ha propuesto que podrían estar directamente implicados en la activación de la transcripción de otros genes o bien servir como zona de amortiguación entre dos dominios funcionales distintos de la misma proteína.

3. Por lo general, se trata de enfermedades neurodegenerativas con un patrón de herencia autosómico dominante de comienzo más o menos tardío.

4. Hay una acentuada correlación entre el tamaño de la expansión y la edad de aparición de los primeros síntomas; las formas juveniles muestran las mayores expansiones, así como una progresión más rápida de la enfermedad.

5. Las mayores expansiones (formas juveniles) a menudo se heredan del padre, más que de la madre, al parecer por la mayor tendencia a adquirir repeticiones durante la espermatogénesis que en la ovogénesis. Del mismo modo, parece ser que las mutaciones *de novo* surgirían sobre todo durante la espermatogénesis.

6. Otros tipos de mutaciones que afectan a los mismos genes correspondientes producen enfermedades de otra índole, o todavía no han sido detectadas. Resulta sorprendente, por ejemplo, que en la enfermedad de Ken-

nedy, en la que resulta afectado el gen del receptor androgénico, puedan presentarse ligeros signos de insensibilidad androgénica (ginecomastia, alteraciones de la espermatogénesis y niveles séricos de gonadotropina elevados con niveles normales de testosterona), mientras que los individuos con insensibilidad androgénica no muestran signo alguno de atrofia bulbospinal. También es llamativo el hecho de que los pacientes con la expansión de la enfermedad de Huntington en homocigosis son clínicamente idénticos a los que muestran expansión en un solo alelo.

Esto sugiere que las expansiones originan una ganancia o cambio de función muy específico. En la actualidad se desconoce el mecanismo patológico de este tipo de expansiones, aunque es muy probable que sea común a todas ellas. Se ha sugerido que, a la larga, estas proteínas se convierten en citotóxicas, quizá por una mayor resistencia a la degradación, por acumulación de subproductos de degradación, o por una mayor tendencia a oligomerizarse.

Además de estos rasgos comunes, también pueden mostrar sus peculiaridades, como:

1. La enfermedad de Kennedy muestra un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. El hecho de que sea la única enfermedad recesiva de este tipo puede deberse a que la expresión del alelo normal en la mitad de las células de las mujeres portadoras (en cada célula sólo se expresa un cromosoma u otro) es suficiente para evitar la aparición de los síntomas, sea por selección celular o por complementación fisiológica.

2. Los alelos normales del gen SCA1 (ataxia espinocerebelosa tipo 1) suelen contener de una a tres interrupciones CAT dentro de la secuencia (CAG)<sub>n</sub>, mientras que los alelos inestables expandidos carecen de ellas.

3. El síndrome de Haw River aparece por expansión de la misma repetición (CAG)<sub>n</sub> que la atrofia dentatorrubropalidoluisiana, pero es ligeramente distinto de ella desde el punto de vista clínico, tal vez como consecuencia de otros genes modificadores.

### ■ EXPANSIONES (GAA)<sub>n</sub> EN EL INTERIOR DE LOS INTRONES

Se ha demostrado que la ataxia de Friedreich se asocia con la expansión de una repetición del tipo (GAA)<sub>n</sub> en medio de una secuencia Alu, que a su vez se encuentra en el intrón 1 del gen X25, el cual codifica para la proteína denominada frataxina. Esta expansión, que habitualmente contiene entre 200 y más de 900 repeticiones GAA, al parecer interfiere de alguna manera en el procesamiento del propio RNA, provocando la ausencia del mensajero maduro en el citoplasma celular. A raíz de la aparición de este tipo de expansión asociada con ataxia de Friedreich se han dejado de lado una serie de generalizaciones previamente establecidas sobre las mutaciones dinámicas: en primer lugar, ni es de herencia dominante ni está ligada al cromosoma X. Esto, a su vez, implica que la expresión en el fenotipo no surge inmediatamente, sino que pueden transcurrir muchas generaciones hasta que coincida con otra mutación del mismo gen en el otro alelo, con lo cual los fenómenos de anticipación o de aumento de penetrancia en generaciones sucesivas, siempre asociados con las mutaciones dinámicas, ya no serán evidentes. Aunque la

edad de comienzo puede variar, por lo común aparece en la adolescencia y es muy rara en edades más tardías. Por otra parte, el elemento repetitivo no es rico en los nucleótidos citosina y guanina, que en forma repetitiva se consideran implicados en la formación de horquillas del DNA que facilitan, probablemente, su inestabilidad durante la replicación. Con respecto a esto, se desconoce la función que puede desempeñar la secuencia Alu en que se encuentra inmersa sobre la aparición de alelos expandidos inestables. Por último, aunque se transcribe como los otros tipos, se localiza en el interior de un intrón que debe ser procesado antes de pasar el RNA al citoplasma. Aquí se ha sugerido que el notable aumento de dinucleótidos AG podría ser el responsable de la patogenicidad. Prácticamente la totalidad de los intrones finaliza con este dinucleótido, e interviene en su eliminación como punto aceptor del procesamiento del RNA inmaduro.

En cuanto a una posible correlación entre el tamaño de la expansión y la gravedad clínica, los datos preliminares sugieren que existe, pero no se debe olvidar que, por tratarse de una enfermedad recesiva, la situación se complica con respecto a los casos anteriores.

Junto con el síndrome del cromosoma X frágil, es el único caso de mutación dinámica en que la enfermedad puede deberse también a otros tipos de alteraciones que causen pérdida de función: el 90 % de los pacientes muestran la expansión en homocigosis, pero el resto son heterocigotos compuestos con mutación puntual en el segundo alelo. En conjunto, la expansión supone el 95 % de las mutaciones que producen la enfermedad.

En varios sentidos, este tipo de elemento justifica que se amplíe el alcance de la búsqueda de nuevos genes alterados por la expansión de elementos intrónicos repetitivos, tal vez distintos de los anteriores, responsables de enfermedades recesivas, muchas de ellas todavía no caracterizadas a nivel molecular.

## ■ MECANISMOS DE EXPANSIÓN

Varias de estas enfermedades (síndrome del cromosoma X frágil, distrofia miotónica, enfermedad de Huntington y otras) están en desequilibrio de ligamiento con marcadores cercanos, lo cual sugiere que la mayoría de las mutaciones *de novo* no surgen a partir de cualquier alelo normal sino de los alelos con más repeticiones o, al menos, con mayor número de repeticiones consecutivas puras.

Básicamente se desconocen los mecanismos de expansión. Se presume que las primeras expansiones modestas se producen o por intercambio desigual (que podría ser el suceso inicial, pero que no encaja con la tendencia que manifiesta un alelo a expandirse durante sucesivas meiosis de una misma familia), o por deslizamiento de los elementos repetitivos cuando la fibra que se está replicando adopta estructuras secundarias. En ambos casos son importantes las interrupciones como estabilizadoras de la secuencia. Estos mecanismos no se pueden aplicar a las grandes expansiones, cuando el número de repeticiones se multiplica por diez o más. Las posibilidades sugeridas para esta situación son el intercambio múltiple de cromátidos o el deslizamiento de los fragmentos de Okazaki; ninguna

explicación es enteramente satisfactoria hoy en día. Además, se da la circunstancia de que algunos tetranucleótidos (CCTT, GGCA), pentanucleótidos (GGGCA) o elementos mayores también pueden ser inestables tanto en los seres humanos como en otros mamíferos, pero no se relacionan con ninguna alteración fenotípica y su tasa de mutación no llega a ser tan elevada como en los trinucleótidos (alrededor del 1-15 %). Sin embargo, al igual que el caso del cromosoma X frágil o de la distrofia miotónica, parece ser que la fase de inestabilidad mitótica, cuando se genera el mosaicismo somático, se limita prácticamente a las primeras fases del desarrollo, durante la segmentación del cigoto.

La conclusión general que puede extraerse de esta variedad de secuencias, posiciones y patrones de herencia es que la consecuencia de la expansión puede ser muy diferente según la posición del elemento inestable: pérdida de función por expansión masiva de elementos CGG en la región 5' no traducida o GAA en los intrones; adquisición de una propiedad citotóxica en caso de expansión más modesta de tramos de poliglutamina. Aunque por el momento sólo se las ha observado en enfermedades neurológicas, no hay ninguna base biológica que lo justifique, por lo que no se descarta su participación en la disfuncionalidad de otros tipos de tejidos.

## ■ APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS EXPANSIONES DE TRINUCLEÓTIDOS

La detección directa de expansiones de trinucleótidos, una vez establecida su intervención en el desarrollo de una determinada afección, es fundamental para el diagnóstico diferencial de la enfermedad, para la detección de portadores con riesgo de transmitirla a su descendencia —frecuentemente en forma más agresiva—, para el diagnóstico prenatal si fuera posible o para el diagnóstico predictivo de portadores que todavía no han desarrollado la enfermedad. Como esta última situación puede ser muy delicada y traumática para el paciente, es preciso informarle previamente acerca de sus implicaciones y evaluar su disposición para recibir el resultado. Aunque muchas de estas enfermedades muestran una buena correlación entre el tamaño de la expansión y la edad de comienzo y/o la gravedad de los síntomas, los márgenes de confianza son bastante amplios y, en ocasiones, como el desarrollo de la forma congénita de distrofia miotónica o la expresión clínica en mujeres portadoras de la mutación completa del cromosoma X frágil, lo máximo que se puede estimar por el momento son riesgos empíricos.

Por último, se espera que el conocimiento completo de la etiología de estas enfermedades permita desarrollar en el futuro tratamientos adecuados para erradicar la enfermedad o, al menos, mejorar la calidad de vida de los pacientes.

## Bibliografía

Véase la bibliografía del capítulo 12.