



# Influencia de las interrupciones AGGs en la expansión del triplete CGGs, y repetición polimórfica más frecuente de las AGGs en la población aragonesa.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Isidoro López Solanas

Curso 2023/24

Tutor: Dra. Silvia Izquierdo Álvarez

Servicio de Bioquímica. Sección de Genética Clínica

Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)

## ABSTRACT

The *FMR1* gene encodes the FMRP protein, which is responsible for regulating protein translation in neurons. An abnormal expansion of CGG repeats (cytosine-guanine-guanine), located in the gene's 5'UTR region, is the cause of Fragile X syndrome. This disorder is one of the most common causes of inherited intellectual disability. The length of the CGG repeat region allows for the distinction of four alleles: the normal allele (<45 CGG repeats), the intermediate or gray allele (45-54 CGG repeats), the premutation allele (55-200 CGG repeats), and the full mutation allele (>200 CGG repeats). AGG interruptions within these repeats play a crucial role in sequence stability and modulate the risk of expansion to a full mutation during germline transmission, especially in carriers of premutations or intermediate alleles.

This study aims to analyze the frequency of AGG interruptions in the Aragonese population, and in women with gray or premutation alleles, to assess the effect of AGG interruptions on CGG repeat expansion in their offspring. To achieve this, a pseudonymized database was used, created in the HUMS Genetics Section, based on *FMR1* gene studies conducted between 2017 and 2024 (8 years).

The results showed that two is the most frequent number of AGG interruptions in the Aragonese population. Additionally, it was found that a higher number of AGG interruptions is associated with a lower probability of CGG repeat expansion, suggesting a protective role in stabilizing the genetic sequence. This finding is consistent with previous studies and highlights the importance of evaluating AGG interruptions in genetic analysis of premutation carriers to improve prognosis and genetic counseling.

Keywords: AGGs interruptions; *FMR1*; FXS

## RESUMEN

El gen *FMR1* codifica para la proteína FMRP encargada de la regulación de la traducción proteica en las neuronas. Una expansión anómala de las repeticiones CGG (citosina-guanina-guanina), que se encuentran en la región 5'UTR del gen, es la causa del síndrome del X Frágil. Esta enfermedad es una de las causas más comunes de discapacidad intelectual hereditaria. La longitud de la región de repeticiones CGG permite distinguir 4 alelos: El alelo normal (<45 repeticiones CGGs), el alelo intermedio o gris (45-54 CGGs), el alelo premutado (55-200 CGGs) y el alelo de mutación completa (>200CGGs). Las interrupciones AGG dentro de estas repeticiones juegan un papel fundamental en la estabilidad de la secuencia y modulan el riesgo de expansión a una mutación completa durante la transmisión germinal, especialmente en portadores de premutaciones o alelos intermedios.

Este trabajo tiene como objetivo analizar la frecuencia del nº de interrupciones AGG en la población Aragonesa y en los casos mujeres con alelo gris, o premutadas analizar en su descendencia el efecto de las AGG en la expansión del triplete CGG. Para ello se ha trabajado haciendo uso de una base de datos pseudonimizada creada en la Sección de Genética del HUMS a partir de estudios genéticos del gen *FMR1*, entre 2017-2024 (8 años).

Los resultados han mostrado que dos es el número de interrupciones AGG más frecuente en la población aragonesa. Además se ha comprobado que un mayor número de interrupciones AGG está asociado con una menor probabilidad de expansión de las repeticiones CGG, lo que

ha sugerido un papel protector en la estabilización de la secuencia genética. Este hallazgo coincide con estudios previos y resalta la importancia de incluir la evaluación de las interrupciones AGG en los análisis genéticos de pacientes portadores de la premutación para mejorar el pronóstico y asesoramiento genético.

Palabras clave: interrupciones AGGs; *FMR1*; SXF

## ABREVIATURAS

AGG – trinucleótido Adenina Guanina Guanina

CGG – trinucleótido Citosina Guanina Guanina

ZG – Zona Gris

PM – Premutación

MC – Mutación Completa

AN – Alelo normal inferior a 45 repeticiones CGG

TP-PCR -[Triplet Repeat Primed PCR \(Reacción en cadena de la polimerasa\)](#)

FXS – Síndrome del X Frágil

FXTAS - Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome

FXAND- Fragile X- associated Neuropsychiatric Disorders

FXPOI-Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency

## ÍNDICE

### Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	- 7 -
1. 1. Gen <i>FMR1</i> .....	- 7 -
1.2 Fenotipos patológicos asociados al gen <i>FMR1</i> y mecanismos fisiopatológicos.....	- 8 -
1.3 Influencia de las interrupciones AGG .....	- 9 -
1.4 Detección de las repeticiones CGG y las interrupciones AGG .....	- 10 -
1.5 Interpretación de los electroferogramas.....	- 11 -
2. HIPÓTESIS .....	- 13 -
3. OBJETIVOS .....	- 13 -
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	- 13 -
5. RESULTADOS.....	- 14 -
6. DISCUSIÓN .....	- 15 -
7. CONCLUSIONES.....	- 18 -
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 19 -
9. ANEXOS .....	- 22 -
ANEXO 1 .....	- 22 -
ANEXO 2 .....	- 23 -
ANEXO 3 .....	- 24 -
ANEXO 4 .....	- 25 -

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Electroferograma que se visualiza con el reactivo AmplideX® FMR1 Controls cuando se analiza con el AmplideX® PCR/CE FMR1 Kit y con el que se realiza la curva de calibración	11
Figura 2: Electroferograma de un varón normal con un alelo de $27 \pm 1$ repeticiones CGG y 2 interrupciones AGG	11
Figura 3: Electroferograma de un varón premutado, con un alelo de $94 \pm 3$ repeticiones CGG, dentro del rango permutación, y sin interrupciones AGG	12
Figura 4: Electroferograma de una <b>mujer con la mutación completa</b> del gen <i>FMR1</i> , con un alelo sano de $31 \pm 1$ repeticiones CGG y el expandido aproximadamente de $332 \pm 10$ repeticiones CGG	12
Figura 5: Electroferograma de una mujer con varios alelos en mosaicismo en los rangos de premutación (PM) y mutación completa (MC)	12
Figura 6 y 7: Ejemplos de pedigrí en los que se aprecia la expansión del triplete CGG	16
Figura 8: Curvas para la estimación del riesgo de expansión según número de repeticiones CGG y número de interrupciones AGG	16
Figura 9: Pedigrí en el que se aprecia la transmisión estable de un alelo en rango PM con un número bajo de CGG y con dos interrupciones AGG	17
Tabla 1: Prevalencia y relación de prevalencias entre sexo de repeticiones CGG de diferentes longitudes alélicas	7
Tabla 2: Frecuencias absolutas de pacientes del estudio con expansión del triplete CGG divididas por sexos	14
Tabla 3: Número de interrupciones AGG más frecuente para los AG, PM y MC de la base de datos	15
Tabla 4: Representa el nº de interrupciones AGG más común separado por tipo de alelo y por sexo en la población en estudio	15

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1. 1. Gen *FMR1*

El gen *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) se ubica en el locus Xq27.3, este codifica para la proteína de unión a RNA llamada FMRP encargada de regular el transporte y traducción de los mRNA de proteínas relacionadas con la plasticidad y maduración de las neuronas. El gen consta de 17 exones que abarcan 39 kb de DNA genómico (1).

En la región 5'UTR del gen encontramos una repetición del triplete Citosina Guanina Guanina (CGG) y cuya longitud es altamente polimórfica. Gracias a ello se pueden distinguir cuatro formas alélicas: El alelo normal cuenta con un número de repeticiones CGG inferior a 45, el alelo intermedio o gris que cuenta con un numero de repeticiones CGG de entre 45 y 54, el alelo premutado con entre 55 y 200 repeticiones y el alelo de mutación completa que cuenta con un numero de repeticiones superior a 200. Si analizamos cual es el alelo más frecuente sin tener en cuenta aspectos como la raza o el sexo de la población obtenemos que el alelo más común es de 29 y 30 repeticiones CGG (1).

La prevalencia de estas formas alélicas puede verse reflejada en la siguiente tabla:

	Prevalencia femenina	Prevalencia masculina	Relación mujeres/hombres
<b>Alelo zona gris (45-54 CGG)</b>	1:33	1:62	1,87
<b>Premutación (55-200 CGG)</b>	1:148	1:290	2,09

**Tabla 1:** Prevalencia y relación de prevalencias entre sexo de repeticiones CGG de diferentes longitudes alélicas (2).

Se puede observar en la Tabla 1 que la prevalencia es más alta para la zona gris (ZG) y en premutación (PM) en mujeres con una relación aproximada de 2 mujeres por cada hombre en ambos casos.

Se estima una frecuencia de mutación completa en la población general de 1:7143 hombres los cuales se verán afectados por la enfermedad y 1:11111 mujeres que presentarán un fenotipo variable que puede abarcar desde problemas de aprendizaje hasta un fenotipo completo (3).

Estas expansiones de trinucleótidos CGG desembocan en un silenciamiento transcripcional de la proteína FMRP de manera que esta proteína de unión a RNA estará ausente y no podrá cumplir su función principal, la modulación de la duración del potencial de acción y plasticidad sináptica (3).

Las expansiones del triplete CGG se observan en más del 99% de las personas que sufren FXS (síndrome de X frágil) aunque otro tipo de mutaciones en el gen *FMR1* como delecciones o mutaciones sin sentido han sido responsables de algunos casos de FXS (2).

El gen *FMR1* pertenece a la familia de genes FX, que está compuesta además por dos genes autosómicos llamados *FXR1* y *FXR2* (*Fragile X Related*). Estos son homólogos al gen *FMR1* en un 86% y un 60%, respectivamente (4).

Los tres factores más influyentes en la estabilidad del gen *FMR1* son el tamaño, la estructura interna (interrupciones AGG) y el sexo del progenitor transmisor (5).

Se ha demostrado que el tamaño del alelo afecta a la inestabilidad del mismo aumentando a mayor tamaño del alelo. El alelo más pequeño que se ha informado que se expande a mutación completa (MC) en una sola generación es de 56 CGG (6).

La presencia de interrupciones Adenina-Guanina-Guanina (AGG) entre las repeticiones CGG se relaciona con un menor riesgo de expansión en la descendencia. A más interrupciones AGG intercalados en un alelo premutado existe menor riesgo de transmisión a la MC. De esta manera un alelo con 75 repeticiones CGG y sin AGG intercalados tiene un riesgo de expansión a MC del 77% y este riesgo se reduce al 12% si hay dos interrupciones AGG (5).

La expansión de los tripletes puede deberse a elementos cis como la longitud de repeticiones CGG y la presencia de AGG intercalados, la transcripción bidireccional que se da en *FMR1* y la organización de la cromatina. También pueden deberse a elementos trans como los errores en la replicación y reparación del DNA (7).

Cuando la longitud de las repeticiones CGG alcanza un rango de MC se produce el silenciamiento del gen *FMR1* mediante una hipermetilación del ADN. Esta ocurre desde la secuencia flanqueante 5' hasta el primer intrón abarcando las repeticiones CGG y la región promotora. Además, se produce una metilación de las histonas H3 en las lisinas 9 y 27. La hipermetilación del ADN y la metilación de histonas conducen a un bloqueo del promotor de *FMR1* (5).

En el caso de los alelos grises y premutados se ha podido comprobar que los niveles de mRNA aumentan, indicando así que el elemento CGG actúa como un activador transcripcional (cis). En estos casos algunos rasgos del fenotipo patológico podrían deberse a un aumento de los niveles mRNA (8).

Se dice que estos mRNA poseen una función tóxica ya que secuestran proteínas de unión a ARN impidiendo el funcionamiento correcto de los procesos de expresión y regulación génica en las neuronas (9).

Existen 2 vías para la expansión de alelos del gen *FMR1*. La primera se trata de una acumulación gradual de repeticiones CGG en alelos normales que contienen interrupciones AGG pudiendo alcanzar un tamaño de PM con más de 79 repeticiones y volviéndose así altamente inestables. La segunda vía de expansión implica la perdida de interrupciones AGG en las transmisiones en las que se producen contracciones del gen convirtiéndose de esta manera en alelos de PM, AG o normales sin AGG cuyo riesgo de expansión es mucho mayor (10).

## **1.2 Fenotipos patológicos asociados al gen *FMR1* y mecanismos fisiopatológicos**

En cuanto a los alelos de MC principalmente se asocian con el síndrome de X frágil (FXS, OMIM #300624). Los rasgos fenotípicos más comunes son una cara alargada con frente amplia y mentón prominente, orejas grandes, hiperlaxitud, testículos grandes, macrocefalia y pies planos. También pueden llegar a presentar sobrepeso (fenotipo Prader Willi) y es común la discapacidad intelectual. También pueden aparecer síntomas en mujeres aunque comúnmente son menos severos por el fenómeno de lyonización (7).

Los alelos premutados están asociados al Síndrome de Ataxia/Temblor X Frágil (FXTAS, OMIM #300623), que afecta al 33% de los hombres portadores y aproximadamente 5-10% de las mujeres portadoras.(11)

Esta patología se caracteriza por presentar síntomas como temblores, ataxia y problemas de equilibrio y también son comunes los síntomas de parkinsonismo. Esta enfermedad lesiona la sustancia blanca del pedúnculo cerebeloso medio. Se ha detectado algún caso portador de alelo gris con síntomas de FXTAS (12,13).

Además las mujeres premutadas corren riesgo de sufrir una menopausia prematura denominada insuficiencia ovárica primaria asociada al cromosoma X frágil (FXPOI, OMIM # 311360), esta afecta al 20% de las mujeres portadoras de alelo premutado y supone una amenorrea temprana (antes de los 40 años). La menstruación no cesa de manera total por lo que las mujeres pueden seguir quedando embarazadas. El deterioro ovárico se relaciona con niveles elevados de la hormona estimuladora de los folículos (FSH) y bajos de la hormona antimülleriana (AMH) (14)(15).

### **1.3 Influencia de las interrupciones AGG**

En la población general alrededor de un 95% de los alelos tienen una o dos interrupciones AGG, estas suelen ocurrir después de 9-10 repeticiones CGG. Estas interrupciones AGG actúan estabilizando el gen durante la transmisión disminuyendo así el riesgo de deslizamiento de la DNA polimerasa durante la replicación del ADN (6).

Gracias a la presencia de interrupciones AGG en los alelos de repeticiones CGG en el gen *FMR1* se reduce la inestabilidad del alelo durante la transmisión de padres a hijos y en el caso de la transmisión materna se produce una disminución del riesgo de expansión de alelo premutado a MC.

Esta afirmación se contrasta a través de estudios en los que se analizaba la correlación entre la presencia o ausencia de interrupciones AGG en pacientes con alelos gris o premutados donde se observó un aumento en la frecuencia de expansión a MC en los alelos con menos interrupciones AGG. Los patrones de presentación de las AGG más comunes en la población son 9-AGG-9-AGG-9 y 10-AGG-9-AGG-9 (16).

La presencia de uno o más AGG disminuye el riesgo de expansión, especialmente en alelos maternos con menos de 70 repeticiones CGG. Para alelos que contienen más de 70 repeticiones, la estabilidad disminuye considerablemente, incluso con interrupciones AGG. Además, los alelos sin AGG presentan el mayor riesgo de inestabilidad y expansión. En alelos con más de 90 repeticiones, casi todos se expanden a una MC, independientemente de la cantidad de AGG. Las contracciones de las repeticiones, tanto en transmisiones maternas como paternas, no parecen estar influenciadas por la estructura AGG. Esto sugiere que las contracciones responden a un mecanismo diferente al de las expansiones (17).

También se han evaluado la relación entre la perdida de AGG y la consanguinidad entre dos grupos étnicos diferentes concluyendo que las poblaciones con una alta consanguinidad son más susceptibles de tener pérdidas de AGG asociadas al aumento de CGG (18).

Hay estudios que revelan la gran importancia de un buen asesoramiento genético al paciente. A la hora de transmitir resultados es muy importante no solo reportar el número de repeticiones CGG si no también el número de interrupciones AGG en conjunto, ya que como se ha visto estas juegan un papel crucial en la expansión de los tripletes CGG en pacientes con premutación o alelo gris (6).

Existen reportados en la literatura algunos estudios que han tratado de encontrar más factores de riesgo a parte del número de repeticiones CGG. Para ello han tratado de relacionar el número de interrupciones AGG con la aparición de FXPOI en mujeres con alelos premutados pero no lo han conseguido (19).

Una vez comprobado el alto valor de las interrupciones AGG se plantea de que manera estas interrupciones son capaces de reducir el riesgo de expansión. Estas interrupciones AGG se encargan de desestabilizar estructuras no canónicas formadas por oligonucleótidos que contienen repeticiones CGG, lo que protege de la expansión mediada por ADN polimerasa durante la embriogénesis temprana. Las interrupciones AGG no son capaces de intervenir ni en la transcripción ni en la traducción del gen *FMR1*.

También existe la posibilidad de que las interrupciones AGG puedan intervenir en la asociación del fragmento de DNA con repeticiones y el núcleo de las histonas. De manera que la presencia de interrupciones AGG favorecen la incorporación al nucleosoma (20,21).

## **1.4 Detección de las repeticiones CGG y las interrupciones AGG**

La técnica utilizada para determinar simultáneamente las repeticiones CGG y las interrupciones AGG es la TP-PCR (Triplet Primed repeat Polymerase Chain Reaction). Se trata una técnica que permite identificar el número de repeticiones de fragmentos tri, tetra o hexanucleotídicos como por ejemplo, las repeticiones CGG del gen *FMR1* o las repeticiones CAG (Citosina Adenina Guanina) en el gen *HTT* asociadas con la enfermedad de Huntington.

Para llevar a cabo este tipo de TP-PCR son necesarios tres cebadores:

- El primero de ellos es un cebador directo que se une a una secuencia única y que no pertenece a la región de repeticiones trinucleotídicas en el extremo 5' de la expansión, está marcado con fluorescencia en su extremo 5' (P1).
- El segundo cebador es reverso y es específico de la región de interés, pudiendo hibridar con cualquier zona de esta región (P2).
- El tercer cebador también es un cebador reverso y es complementario al extremo 3' de la expansión (P3)

Los volúmenes de los reactivos empleados en la reacción empleada en el kit AmplideX® PCR/CE *FMR1* (Asuragen) se recogen en el ANEXO 3.

Las principales ventajas que nos ofrece usar esta técnica de TP-PCR son:

- Resultados en menos de 24 horas y de una fiabilidad alta (alrededor del 99%).
- No es necesaria una muestra de gran volumen ni de una concentración excesivamente alta de ADN.
- Permite diferenciar entre pacientes homocigotos y heterocigotos.

La explicación del fundamento de la TP-PCR para el estudio de las repeticiones CGG y AGG se recoge en el ANEXO 2.

## 1.5 Interpretación de los electroferogramas

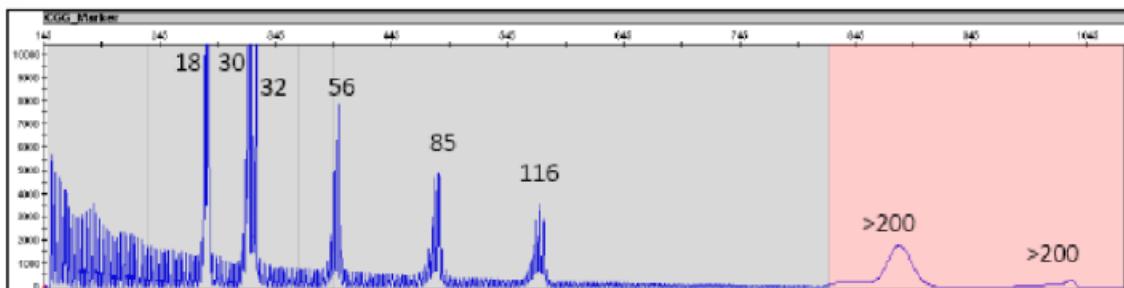
Gracias a los electroferogramas podemos calcular el tamaño de la repetición del triplete CGG y conocer así a qué grupo pertenecen los alelos en estudio, además del número de interrupciones AGG.

El número de interrupciones AGG se puede calcular de forma manual a partir del electroferograma, pues se observa un espacio más grande de lo normal entre dos picos, que corresponde con las tres pares de bases del AGG y las tres del CGG.

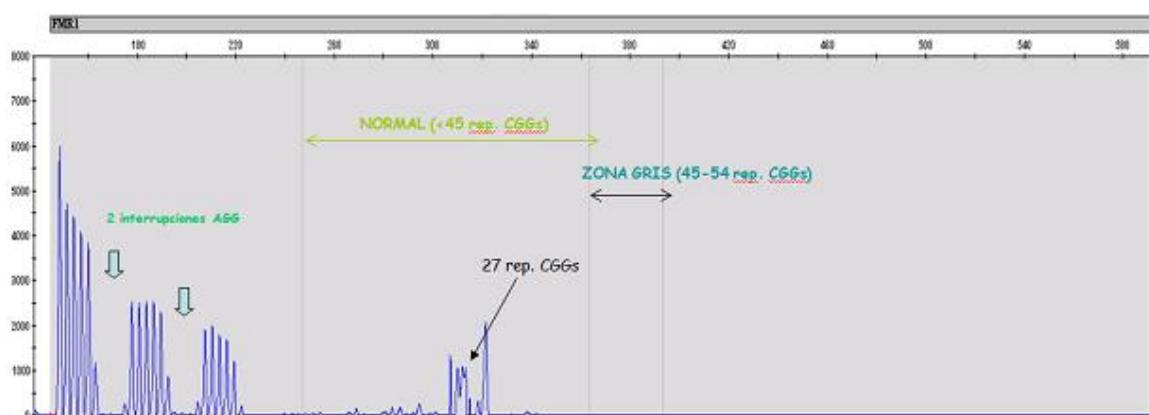
Los primeros picos corresponden a las múltiples longitudes de fragmentos generados por la unión del cebador que se une a la repetición CGG y que lo hace aleatoriamente a lo largo de cualquier parte de la expansión. Cuando la polimerasa se pude extender a lo largo de toda la expansión desde el cebador directo al reverso se generan fragmentos que corresponden con la longitud de la expansión completa.

Además, en el caso de que aparezca un número de picos superior al esperado se puede tratar de un mosaicismo, es decir que hay células con diferentes longitudes de expansión CGG en el cromosoma X.

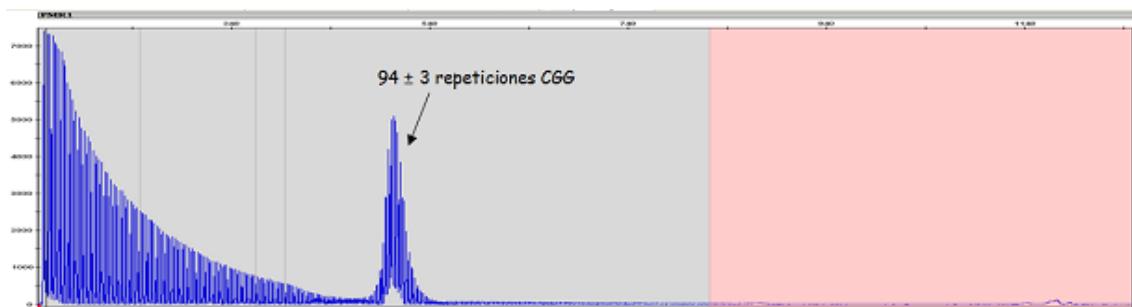
A continuación, se presentan diferentes ejemplos de electroferogramas y su interpretación:



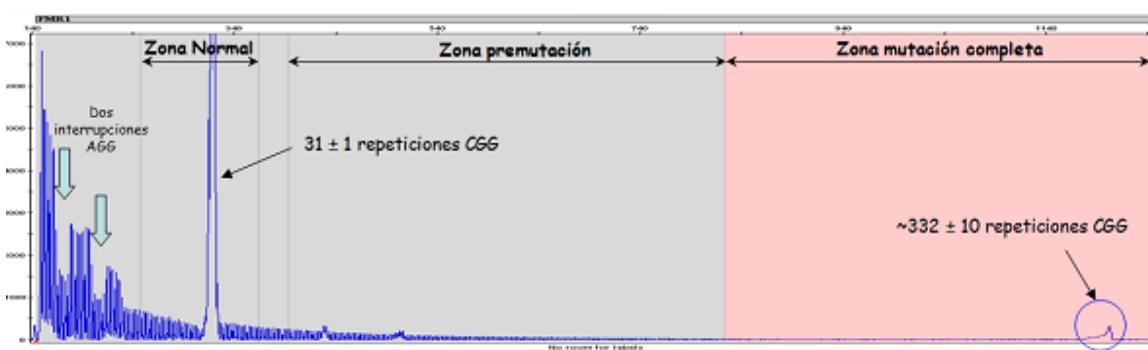
**Figura 1:** Electroferograma que se visualiza con el reactivo AmplideX® FMR1 Controls cuando se analiza con el AmplideX® PCR/CE FMR1 Kit y con el que se realiza la curva de calibración.



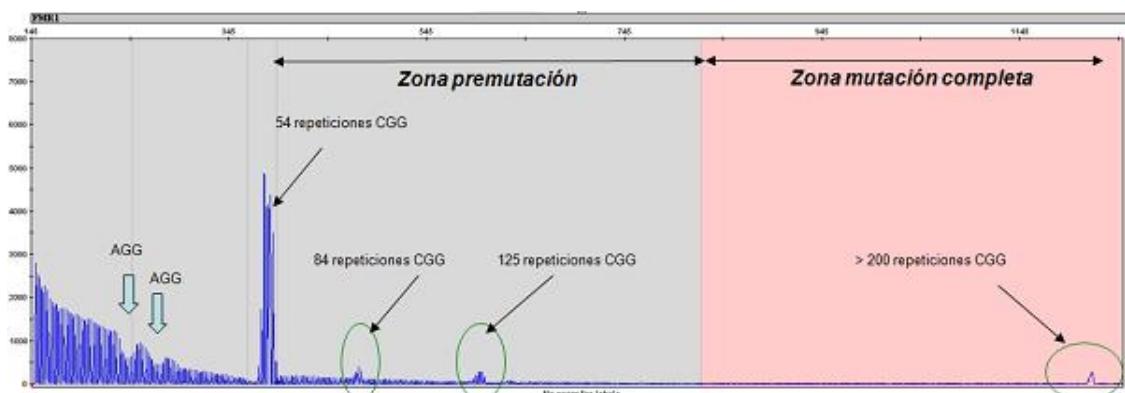
**Figura 2:** Electroferograma de un varón normal, con un alelo de  $27 \pm 1$  repeticiones CGG, y 2 interrupciones AGG.



**Figura 3:** Electroferograma de un varón premutado, con un alelo de  $94 \pm 3$  repeticiones CGG, dentro del rango permutación, y sin interrupciones AGG.



**Figura 4:** Electroferograma de una mujer con la mutación completa del gen *FMR1*, con un alelo sano de  $31 \pm 1$  repeticiones CGG y el expandido aproximadamente de  $332 \pm 10$  repeticiones CGG.



**Figura 5:** Electroferograma de una mujer con varios alelos en mosaicismo en los rangos de premutación (PM) y mutación completa (MC).

## 2. HIPÓTESIS

Se pretende confirmar que la presencia de interrupciones AGG en el gen *FMR1* reduce el riesgo de expansión de las repeticiones CGG en la transmisión materna (mujeres con alelo gris o premutadas).

## 3. OBJETIVOS

El objetivo de este TFG es evaluar todos los pacientes estudiados desde el 2017 -2024, 8 años, en la Sección de Genética del Servicio de Bioquímica Clínica del HUMS a los que se les solicitó estudio genético de FRAXA, FXTAS y FXPOI, y se determinaron las interrupciones AGG, evaluar en los negativos para el Síndrome de X frágil y negativos para premutación en el gen *FMR1*, cual es la frecuencia del número de interrupciones AGG más frecuente ( nº de repeticiones polimórfica) en la población a estudio (Aragón) y además, en los casos mujeres portadoras de alelo en zona gris, o premutadas para el gen *FMR1* analizar en su descendencia el efecto de las AGG en la expansión del triplete CGG.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

**Diseño:** Estudio descriptivo retrospectivo

**Participantes:** Pacientes a los que se les realizó estudio genético de X Frágil y/o premutación en el gen *FMR1* en la Sección de Genética del Servicio de Bioquímica Clínica del HUMS en el periodo de 2017 a 2024 (8 años) mediante TP-PCR llevada a cabo con el Kit AmplideX® PCR/CE *FMR1* (Asuragen), junto con una electroforesis capilar del producto de la amplificación. El procedimiento completo de extracción y análisis del DNA se recoge en el PTA 06\_Z2(E)M\_L-GE (Procedimiento para el estudio genético Síndrome X-Frágil/FXPO/FXTAS), implantado en el laboratorio de genética del Servicio de Bioquímica Clínica del HUMS del Servicio Aragonés de Salud, el cual está acreditado según la norma ISO 15189. Dicho procedimiento permite determinar el número de repeticiones CGG e interrupciones AGG.

**Fuentes de información:** Se realizó una revisión bibliográfica de las publicaciones que existían en la literatura sobre la influencia de las interrupciones AGG y su relación con el riesgo de expansión de los tripletes CGG en pacientes portadores de la premutación o con alelo gris. Además, se incluyeron en el análisis artículos que explicaban los mecanismos por los cuales las interrupciones AGG reducen el riesgo de expansión.

**Procedimiento:** Se trabajó sobre una base de datos seudonimizada que incluía resultado de la TP-PCR y el contexto clínico y/o motivo de solicitud del estudio genético de Sd. X Frágil o premutación en gen *FMR1* y se analizó la frecuencia del número de interrupciones AGG más frecuente en casos negativos (sin expansión del triplete CGG) y en los casos con alelos gris, o en

rango de premutación del gen *FMR1* (en dichos casos se verificó aquellos que tenían descendencia estudiada para evaluar el papel protector de las interrupciones AGG en la expansión del triplete CGG).

**Ánálisis estadístico:** Se analizaron los resultados del número de repeticiones del triplete AGG y las variables sexo, motivo de estudio y si hubo descendencia en aquellos casos que se dispuso de información reportada (en el laboratorio se dio código a las familias anonimizadas). Se trabajaron los datos en un archivo Excel y con el software de estadística Jamovi y se aplicaron los test estadísticos apropiados. El número de interrupciones AGG más frecuentes fue determinado mediante un análisis modal de los distintos grupos de pacientes.

**Limitaciones del estudio:** Pueden haber quedado excluidos del estudio pacientes que residían en la comunidad autónoma de Aragón, que no fueron estudiados genéticamente en la Sección de Genética del HUMS, sino en centros privados por lo que pudo haber sesgo en el tamaño muestral, así como en el porcentaje de frecuencias de las interrupciones AGG.

**Ética:** El presente trabajo contó con el dictamen favorable del CEICA (ANEXO 1).

## 5. RESULTADOS

En el periodo evaluado (entre el 1-12-2017 hasta el 12-04-2024 ) se analizaron 2055 muestras recogidas de pacientes a los que se les solicitó el análisis genético correspondiente a la expansión del gen *FMR1*.

Todas los datos recopilados en este estudio se correspondían a resultados del estudio genético solicitado en pacientes por alguna sospecha de posibilidad de padecer X Frágil o alguna de las enfermedades relacionadas con la expansión del triplete CGG, en base a antecedentes familiares o síntomas característicos pudieron detectar los facultativos correspondientes. Por ejemplo, retraso psicomotor, amenorrea primaria, infertilidad, trastorno de aprendizaje TDAH (Trastorno Déficit de Atención e Hiperactividad) o TEA (Trastorno Espectro Autista).

De estas 2055 estudios recogidos en la base que se analizó, el 61% pertenecieron a hombres y el 39% a mujeres.

De las 2055 muestras 54 eran portadoras del alelo gris, 44 del premutado y 9 de un alelo de mutación completa. Lo que supone un 2,63%, 2,14% y 0,44% respectivamente. O lo que es lo mismo 1:38, 1:47, 1:227.

	AG	PM	MC
Hombres	21	10	6
Mujeres	33	34	3

**Tabla 2:** Frecuencias absolutas de pacientes del estudio con expansión del triplete CGG divididas por sexos. AG (Alelo Gris); PM (Premutación); MC (Mutación Completa).

Se realizó un análisis estadístico general en el que se obtuvo que el nº de interrupciones más común es dos con un 72% y seguido de una con un 18,3%. El nº máximo de interrupciones que se recogió en esta base de datos fue de cinco interrupciones AGG en un paciente portador de alelo gris.

Se obtuvieron los siguientes datos de los pacientes portadores de alelo gris, PM y MC:

	AG	PM	MC
Nº de interrupciones AGG más frecuente	2	2	0

Tabla 3: Número de interrupciones AGG más frecuente para los AG, PM y MC de la base de datos. AG (Alelo Gris); PM (Premutación); MC (Mutación Completa).

Si se centra la atención únicamente en aquellos pacientes con un rango alélico normal, inferior a 45 repeticiones CGG, se obtuvo que el número de interrupciones AGG más frecuente también fueron dos.

Diferenciando a la población muestral por sexo obtuvimos los siguientes resultados:

	AN	AG	PM	MC
Masculino	2	2	2	0
Femenino	2	4	2	0

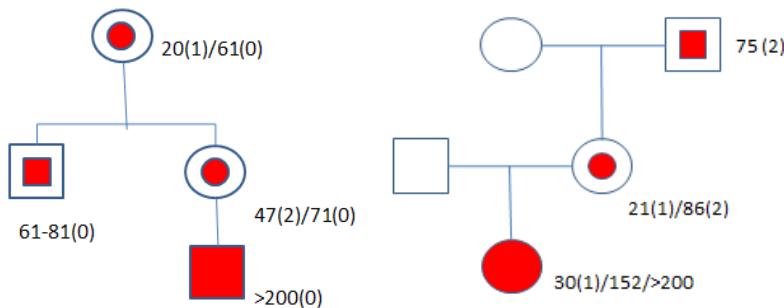
Tabla 4: Representa el nº de interrupciones AGG más común separado por tipo de alelo y por sexo en la población en estudio. AN (Alelo normal <45 repeticiones CGGs); AG (Alelo Gris); PM (Premutación); MC (Mutación Completa)

## 6. DISCUSIÓN

La relación entre la expansión del triplete CGG y las interrupciones AGG ya ha sido documentada en multitud de estudios como (Olatz Villate et al 2020) (6). Estos datos son respaldados por los resultados que hemos obtenido, siendo cero el número de interrupciones AGG más frecuente entre los pacientes con MC y dos en el resto de pacientes. Lo que indica una relación entre la expansión del triplete CGG y la pérdida o ausencia de interrupciones AGG.

En la figuras 6 y 7 se reflejan dos pedigríos de casos en los que se había estudiado el número de repeticiones CGG e interrupciones AGG en los miembros de familias en tres generaciones, y evidencian la expansión en pacientes de alto riesgo. En el primer caso (figura 7) portadores de

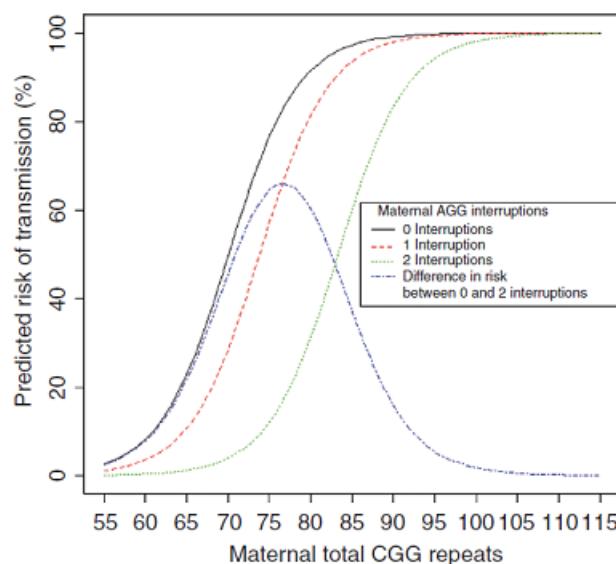
la PM sin interrupciones AGG y en el segundo caso (figura 7) con un número de CGG superior a 70 y con presencia de dos AGG.



**Figura 6 y Figura 7:** Ejemplos de pedigríos en los que se aprecia la expansión del triplete CGG. En la figura 6 se muestra un niño en la tercera generación que padece FXS y en la segunda generación un varón que presenta mosaicismo. En la figura 7 se muestra una niña que presenta mosaicismo, se ha producido pérdida de AGG y padece FXS.

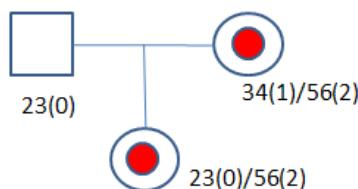
Los alelos normales suelen tener dos interrupciones AGG y raramente una o ninguna y suelen estar separadas cada 9-10 repeticiones CGG siendo, 9-AGG-9-AGG-9 y 10-AGG-9-AGG-9, los patrones más comunes en todas las poblaciones que han sido estudiadas (22). Estos datos concuerdan con los datos de la población aragonesa que se han estudiado en los que también es dos el número de interrupciones más frecuente representando 72%, seguido de una interrupción representando el 18,3%.

En línea con estudios previos, los resultados muestran que los pacientes con un mayor número de interrupciones AGG presentan menor riesgo de expansión del triplete CGG. Esto lo podemos apreciar en la figura 8.



**Figura 8:** Curvas para la estimación del riesgo de expansión según número de repeticiones CGG y número de interrupciones AGG (referencia Yrigollen et al 2012) (23).

Nolin et al. (2013) estableció que el riesgo de sufrir una expansión en el rango de 45-49 repeticiones CGG y dos AGG era de un 5%. Este porcentaje era igual tanto en este primer grupo como en el segundo que tenía entre 55-59 repeticiones CGG y dos AGG, lo que demostraba que el riesgo de expansión en rangos de AG y PM de bajas repeticiones era el mismo teniendo dos interrupciones AGG. Domniz et al. (2018) determinó que el riesgo de sufrir expansión en pacientes entre 55 -59 CGG con dos AGG era mayor (14,5%) pero que este decrecía hasta 0% en caso de que el número de AGG fuera >2. En el caso de que el número de repeticiones CGG fuera de 60-64 con 2 o más AGG el riesgo de transmisión inestable ascendía hasta 50%. Olatz et al. (2020) observaron también que en los casos con menos de 60 repeticiones CGG y dos AGG no se producían expansiones en las siguientes generaciones en cambio cuando el número de repeticiones CGG era mayor de 60 el riesgo de sufrir una transmisión inestable era mayor.



**Figura 9:** Pedigrí en el que se aprecia la transmisión estable de un alelo en rango PM con un número bajo de CGG y con dos interrupciones AGG.

Aunque las transmisiones maternas reciban mayor atención debido al riesgo de expansión a mutación completa Nolin et al. (2019) afirma que las transmisiones paternas inestables son más frecuentes para alelos normales e intermedios. Lo que concuerda con las tasas de mutación más altas para espermatozoides (25).

La importancia de las interrupciones AGG en la estabilidad de la transmisión del gen FMR1 en humanos ya ha sido bien documentada pero los mecanismos por los cuales las AGG son capaces de ejercer esta función todavía son desconocidos (10).

A diferencia de las expansiones las contracciones no parecen verse afectadas por la estructura AGG es decir, se producen contracciones en transmisiones con cero, una, dos o tres AGG. Esto sugiere el mecanismo por el que se dan las contracciones es distinto al mecanismo por el que se dan las expansiones y en el caso concreto de los padres las longitudes de repetición más grandes se asocian con una mayor probabilidad de contracción.

Como se ha comprobado en los resultados del estudio, el número de repeticiones más común en los pacientes que presentan MC es de cero lo que concuerda con lo reportado por Noam et al. (2018) donde se observa una baja incidencia de interrupciones AGG en pacientes que poseen MC. Todo ello puede deberse a contracciones previas del gen que han llevado a pérdidas de AGG lo cual está asociado a un mayor riesgo de expansión de CGG.

En la tabla 4 podemos ver reflejado que el número de interrupciones más frecuente para mujeres portadoras de AG es 4 este resultado no es coherente con el del resto de la literatura revisada. Este valor puede deberse a que la población de mujeres con AG que se ha estudiado es pequeña por lo que no sería representativa.

## 7. CONCLUSIONES

- 1. El número de interrupciones AGG más frecuente en la población aragonesa concuerda con el de la población general (dos interrupciones AGG)
  - 2. Los alelos que presentan mutación completa tienen un menor número de interrupciones AGG (una o cero interrupciones AGG) esto puede deberse a dos razones: La primera es que son los alelos con menos interrupciones AGG, los que tienen un mayor riesgo de expansión a MC y la segunda es que en alelos con un número de interrupciones AGG normal se produzcan contracciones que conlleven a pérdidas de AGG y a expansiones del triplete CGG.
  - 3. Se confirma que las interrupciones AGG adoptan un papel decisivo en la expansión del triplete CGG del gen *FMR1* en pacientes portadores de AG o PM en la población aragonesa del presente estudio. A mayor número de interrupciones AGG más se reduce el riesgo de expansión.
  - 4. Los análisis genéticos del gen *FMR1* deberían ir siempre acompañados del número de interrupciones AGG. Lo que permite diferenciar entre mujeres con bajo y alto riesgo de expansión. Este dato cobra especial importancia en los asesoramientos genéticos para transmitir la información del riesgo de expansión con la mayor certeza posible. De esta manera se podrá tranquilizar a mujeres con bajo riesgo de expansión incluso si son clasificadas como portadoras de la PM con interrupciones AGG y realizar un mayor seguimiento en mujeres con un riesgo más elevado incluyendo a aquellas portadoras de un AG sin interrupciones AGG. Si una mujer duda sobre si someterse o no a pruebas prenatales de X frágil, esta información podría ser aclaratoria, de manera que las mujeres con bajo riesgo de expansión pueden evitar una prueba invasiva.
- 
- 1. The most frequent number of AGG interruptions in the Aragonese population matches that of the general population (two AGG interruptions).
  - 2. Alleles with full mutation tend to have fewer AGG interruptions (one or zero AGG interruptions). This may be due to two reasons: First, alleles with fewer AGG interruptions are at higher risk of expanding to a full mutation, and second, in alleles with a normal number of AGG interruptions, contractions may occur that lead to the loss of AGG interruptions and expansions of the CGG triplet.

- 3. It is confirmed that AGG interruptions play a decisive role in the expansion of the CGG triplet of the FMR1 gene in patients carrying AG or PM in the Aragonese population of this study. A higher number of AGG interruptions significantly reduces the risk of expansion.
- 4. Genetic analyses of the FMR1 gene should always include the number of AGG interruptions. This allows differentiation between women with low and high risk of expansion. This information is particularly important in genetic counseling to convey the risk of expansion with the greatest certainty possible. This way, women with a low risk of expansion can be reassured even if they are classified as carriers of the PM with AGG interruptions, and closer monitoring can be provided for women with a higher risk, including those with an AG allele without AGG interruptions. If a woman is uncertain about undergoing prenatal Fragile X testing, this information could be clarifying, allowing women with a low risk of expansion to avoid invasive testing.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25.
- (2) Hall DA, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Jacquemont S, Leehey MA. Prevalence of FMR1 repeat expansions in movement disorders: A systematic review. *Neuroepidemiology.* 2006;26(3):151-5.
- (3) Pastore LM, Johnson J. The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. *Front Genet.* 2014;5:195.
- (4) Lai A, Valdez-Sinon AN, Bassell GJ. Regulation of RNA granules by FMRP and implications for neurological diseases. *Traffic.* 2020;21(7):454-62.
- (5) Tabolacci E, Nobile V, Pucci C, Chiurazzi P. Mechanisms of the FMR1 repeat instability: How does the CGG sequence expand? *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5425.
- (6) Villate O, Ibarluzea N, Maortua H, de la Hoz AB, Rodriguez-Revenga L, Izquierdo-Álvarez S, et al. Effect of AGG Interruptions on FMR1 Maternal Transmissions. *Front Mol Biosci.* 2020;7:135.
- (7) Stone WL, Basit H, Shah M, Los E. Fragile X Syndrome. In: StatPearls. StatPearls Publishing; 2023.
- (8) Loesch DZ, Bui QM, Huggins RM, Mitchell RJ, Hagerman RJ, Tassone F. Transcript levels of the intermediate size or grey zone fragile X mental retardation 1 alleles are raised, and correlate with the number of CGG repeats. *J Med Genet.* 2007;44(3):200-4.
- (9) Tassone F, Iwahashi C, Hagerman PJ. FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol.* 2004;1(2):103-5.
- (10) Nolin SL, Glicksman A, Tortora N, Allen E, Macpherson J, Mila M, et al. Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of

- normal, intermediate, and premutation alleles. *Am J Med Genet A*. 2019;179(7):1148–56.
- (11) Hagerman RJ, Protic D, Rajaratnam A, Salcedo-Arellano MJ, Aydin EY, Schneider A. Fragile X-associated neuropsychiatric disorders (FXAND). *Front Psychiatry*. 2018;13:564.
- (12) Hall D, Tassone F, Klepitskaya O, Leehey M. Fragile X-associated tremor ataxia syndrome in FMR1 gray zone allele carriers. *Mov Disord*. 2012;27(2):296-300.
- (13) Pastore LM, Johnson J. The FMR1 gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. *Front Genet*. 2014;5:195.
- (14) Oostra BA, Willemsen R. FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(6):467-77.
- (15) Madrigal I, Xunclà M, Tejada MI, Martínez F, Fernández-Carvajal I, Pérez-Jurado LA, et al. Intermediate FMR1 alleles and cognitive and/or behavioural phenotypes. *Eur J Hum Genet*. 2011;19:921-3.
- (16) Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. *J Neurodev Disord*. 2014;6(1):24.
- (17) Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med*. 2015;17(5):358-64.
- (18) Manor E, Gonen R, Sarussi B, Keidar-Friedman D, Kumar J, Tang HT, et al. The role of AGG interruptions in the FMR1 gene stability: A survey in ethnic groups with low and high rate of consanguinity. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7(10)
- (19) Allen EG, Glicksman A, Tortora N, Charen K, He W, Amin A, et al. FXPOI: Pattern of AGG Interruptions Does not Show an Association With Age at Amenorrhea Among Women With a Premutation. *Front Genet*. 2018;9:292.
- (20) Volle CB, Delaney S. AGG/CCT interruptions affect nucleosome formation and positioning of healthy-length CGG/CCG triplet repeats. *BMC Biochem*. 2013;14:33.
- (21) Rolfsmeier ML, Lahue RS. Stabilizing effects of interruptions on trinucleotide repeat expansions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2000;20(1):173-80.
- (22) Yrigollen CM, Sweha S, Durbin-Johnson B, Zhou L, Berry-Kravis E, Fernandez-Carvajal I, et al. Distribution of AGG interruption patterns within nine world populations. *Intractable Rare Dis Res*. 2014;3(4):153–61.
- (23) Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, et al. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med*. 2012;14:729-36.

- (24) Domniz N, Ries-Levavi L, Cohen Y, Marom-Haham L, Berkenstadt M, Pras E, et al. Absence of AGG interruptions is a risk factor for full mutation expansion among Israeli FMR1 premutation carriers. *Front Genet.* 2018;9:606.
- (25) Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, et al. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45–69 repeat alleles. *Am J Med Genet.* 2013;161:771-8.
- (26) Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Martinez F, Tejada MI, Izquierdo-Alvarez S, Sanchez-Villar de Saz P, et al. Clinical implication of FMR1 intermediate alleles in a Spanish population. *Clin Genet.* 2018;94:153-8.
- (27) Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 2003;72:454-64.
- (28) Dombrowski C, Lévesque S, Morel ML, Rouillard P, Morgan K, Rousseau F. Premutation and intermediate size FMR1 alleles in 10,572 males from the general population: the loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. *Hum Mol Genet.* 2002;11(4):371-8.
- (29) Chopin DM. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investig Discapacidad.* 2012;1(2):86-9.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1

Dictamen favorable del CEICA



Departamento de Salud

#### Informe Dictamen Favorable Trabajos académicos

C.P. - C.I. PE24/329

10 de julio de 2024

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

#### CERTIFICA

**1º.** Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 10/07/2024, Acta N° 14/2024 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

**Título: Influencia de las interrupciones AGGs en la expansión del triplete CGGs, y repetición polimórfica más frecuente de las AGGs en la población aragonesa.**

**Estudiante: Isidoro López Solanas**  
**Tutora: Silvia Izquierdo Álvarez**

**Versión protocolo: Versión 18/06/2024**

**Se acepta la exención de consentimiento para la recogida de datos retrospectivos**

**2º.** Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la obtención de permisos necesarios para el acceso a los datos, el adecuado tratamiento de los datos en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

**3º.** Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización del proyecto.

Lo que firmo en Zaragoza  
GONZALEZ   
HINJOS Firmado digitalmente  
por GONZALEZ  
HINJOS MARIA - DNI  
03857456B  
Fecha: 2024/07/12  
13:13:21 +02'00'  
MARIA - DNI  
03857456B  
María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

## ANEXO 2

### Fundamentos de la técnica de identificación de repeticiones CGG e interrupciones AGG.

Para poder obtener un resultado de la prueba los productos de amplificación son analizados a través de una electroforesis capilar. En nuestro caso concreto empleamos una electroforesis capilar con POP-7.

La electroforesis con POP-7 es una técnica que utiliza un capilar lleno del polímero POP-7 para separar fragmentos de ADN según su tamaño y carga. Se trata de una técnica analítica que combina elementos de otras técnicas analíticas. Hace uso de detectores de alta sensibilidad y capilares de sílice fundida lo que permite la aplicación de campos eléctricos con alta eficiencia para la disipación del calor.

A  $\text{pH} \geq 3$ , los grupos silanol (Si-OH) en la pared del capilar se ionizan, generando una carga negativa (Si-O<sup>-</sup>). Según la teoría de la doble capa eléctrica, esto forma una capa fija de cationes en la pared, seguida por una capa móvil de cationes que migran hacia el cátodo al aplicar un campo eléctrico. Este movimiento genera el flujo electroosmótico (EOF), que es el desplazamiento del líquido a través del capilar. (18)

Los productos de la amplificación se añaden desnaturalizados. Para ello se debe preparar una solución de mezcla maestra añadiendo 2  $\mu\text{L}$  del producto de amplificación, 11  $\mu\text{L}$  de formamida Hi – Di y 2  $\mu\text{L}$  de marcador ROX 1000. Posteriormente esta solución será sometida a un programa de 2 minutos a 95°C en un termociclador. Y así finalmente la muestra estará preparada para ser añadida en el instrumento de electroforesis capilar.

En el eje x del electroferograma se representa el tamaño del fragmento amplificado. El eje x se divide en 4 zonas (normal, ZG, PM y MC), el eje y mide la fluorescencia relativa de los fragmentos. Cuanto mayor sea el valor de fluorescencia relativa mayor será el número de fragmentos de ese tamaño.

Cada uno de los picos del electroferograma está separado por tres pares de bases, por lo que el número de repeticiones CGG corresponde con el número de picos. Sin embargo, el cálculo para cada uno de los alelos de las muestras analizadas se realiza de forma automatizada a partir del tamaño del alelo en pares de bases y una recta de calibración (realizada cada 6 meses con estándares proporcionados por Asuragen).

### ANEXO 3

Volúmenes de reactivos para la TP-PCR

PCR con cebadores repetidos (RP) CGG	
Componente	Volumen (μL)
Tampón de amplificación	11,5
Cebadores P1 y P3 del FMR1	0,50
Cebador P2 del FMR1	0,50
Diluyente	0,50
Mezcla de polimerasa	0,05
Muestra de ADN	2
Volumen total de la reacción	15,05

## ANEXO 4

### Programa del termociclador para llevar a cabo la PCR

PCR con cebadores repetidos (RP) CGG	
Descripción	Duración
Desnaturalización	95°C durante 5 minutos
10 ciclos	97°C durante 35 segundos
	62°C durante 35 segundos
	68°C durante 4 minutos
	97°C durante 35 segundos
20 ciclos	62°C durante 35 segundos
	68°C durante 4 minutos + 20 segundos/ciclo
Extensión	72°C durante 10 minutos
Pausa	4°C ∞