



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Trabajo Fin de Grado en MEDICINA

**“Actualizaciones en la terapia
génica del Síndrome X Frágil”**

María Bartolomé Morate

Elena Castro Marchán

Curso 2017 / 2018

Tutor: Juan José Tellería Orriols

Departamento de Pediatría e Inmunología,

Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología,

Psiquiatría e Historia de la Ciencia

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción

1.1. Qué es el Síndrome X Frágil

1.1.1. Historia

1.1.2. Herencia

1.1.3. Fenotipo

1.2. Gen FMR1

1.3. Silenciamiento del gen FMR1

1.4. Proteína FMRP

1.5. Líneas terapéuticas en el X Frágil

2. Material y métodos

2.1. Justificación

2.2. Objetivos y búsqueda de la información

2.3. Organización de la investigación

2.4. Análisis de la información

3. Resultados

3.1. Edición genómica con CRISPR/Cas9

3.2. Bloqueo DNA metiltransferasa

3.3. Modificaciones en las histonas

4. Discusión

5. Conclusiones

6. Bibliografía

RESUMEN

El Síndrome X Frágil es la principal causa hereditaria de discapacidad intelectual y la principal causa monogénica de autismo. Se trata de una enfermedad de herencia dominante ligada al cromosoma X. Se produce por una mutación dinámica con expansión de tripletes CGG en el gen FMR1, que cuando sobrepasan las 200 copias, detonan la inactivación epigenética del gen. Las modificaciones epigenéticas principales son la metilación del promotor y las modificaciones de las histonas H3 y H4.

A día de hoy se ha demostrado la posibilidad de reactivar parcialmente el gen FMR1 mediante tres vías de actuación. En primer lugar, mediante la inactivación con 5-azadC de la enzima DNA metiltransferasa, se inhibe la metilación del promotor. En segundo lugar, se revierten las modificaciones de las histonas y se consigue el estado de eucromatina, utilizando fármacos como el butirato, el 4-fenilbutirato, el ácido valproico, la L-acetilcarnitina y la tricostatina A. Por último, aplicando la técnica de edición genómica CRISPR/Cas9 para escindir el exceso de trinucleótidos, se consiguen resultados prometedores.

Palabras clave: X Frágil, reactivación, epigenética, tratamiento, 5-azadC, CRISPR/Cas9, *X Fragile*, *Reversion*, *Reactivation*, *Histone acetylation*, *DNA methyltransferase*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Qué es el Síndrome del X Frágil

El síndrome del X Frágil (SXF) es la causa más común de discapacidad intelectual hereditaria y la principal causa monogénica de autismo y trastornos del espectro autista. Se le atribuye el 1 – 2% de todas las discapacidades intelectuales y del 2 – 5% de los trastornos de espectro autista. Tiene una prevalencia estimada de 1/4000 varones y 1/7000 mujeres.^{1,2}

Se trata de una enfermedad con herencia dominante ligada al cromosoma X, que afecta al gen FMR1 (Fragile Mental Retardation gen ligado al sitio frágil 1), precursor de la proteína FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein).

Los trastornos asociados al X frágil (TASXF) constituyen un grupo de enfermedades causadas por alteraciones en el gen FMR1. Éstas enfermedades son el Síndrome de X Frágil (SXF) propiamente dicho, la insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FXPOI) y el síndrome de ataxia asociado al X frágil (FXTAS).^{1,2}

1.1.1 Historia

EL síndrome del X frágil fue descrito por primera vez en 1943 por Martin JP & Bell J, tras estudiar una familia con varios varones que tenían en común discapacidad intelectual, facies característica y macroorquidismo. En 1969 Lubs asocia como marcador citogenético a este síndrome la existencia de un punto frágil (FRAXA) en el extremo del brazo largo del cromosoma X (Xq27.3), dándole el nombre de “Síndrome X Frágil”. En 1991 se consigue clonar el gen FMR1, describiéndose por primera vez un nuevo tipo de mutación, la mutación dinámica por expansión de tripletes, en éste caso CGG. En 1999 se asocia a la alteración del gen FMR1 una alta incidencia de fallo ovárico precoz (FOP) y en 2001 se relaciona el Síndrome de temblor – ataxia asociado al X frágil (FXTAS). Desde 2007 se han conseguido cada vez más datos sobre la enfermedad, dirigiendo la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.²

1.1.2 Herencia

En la actualidad, el 98% de los casos de SXF se atribuyen a un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X con penetrancia incompleta en mujeres. Se trata de una mutación dinámica en el gen FMR1, localizado en el cromosoma Xq27.3. Este gen posee una zona inestable en la que puede variar el número de repeticiones CGG al ser transmitido en herencia. Como consecuencia de dicha mutación se produce un déficit de FMRP.¹

La expansión del número de repeticiones hasta el rango patológico ocurre exclusivamente durante la meiosis materna. Los varones transmiten su mismo número de repeticiones. Ésta mutación dinámica presenta fenómeno de anticipación, es decir, la clínica suele ser más precoz y severa en las nuevas generaciones.^{1,2}

En función del número de repeticiones podemos clasificar los alelos como normales, intermedios, premutados y con mutación completa.

- Entre 6 – 44 repeticiones de CGG: Alelo normal con transmisión estable.
- Entre 45 – 54 repeticiones de CGG: Zona gris. Alelo intermedio que pueden ser estables o ligeramente inestables. Puede expandirse en la herencia formando alelos premutados.
- Entre 55 – 200 repeticiones de CGG: Alelos premutados. La prevalencia de alelos premutados en mujeres es entre 1/151 y 1/259, mientras que en los varones es menor, entre 1/468 y 1/813.
- Mayor de 200 repeticiones: Alelo con mutación completa. No se expresa proteína FMRP. Todos los varones estarán afectados de SXF mientras que solo el 30 – 50% de las mujeres estarán afectadas debido al fenómeno de inactivación del cromosoma X.

Más del 25% de los pacientes presentan mosaicismo con alelos premutados y alelos con mutación completa debido a la inestabilidad somática en la embriogénesis temprana. Si añadimos la inactivación al azar de uno de los cromosomas X en la mujer, se explica así la penetrancia incompleta y los distintos fenotipos existentes.^{1,2}

Tan solo un 1 – 2% de los casos podría atribuirse a mutaciones puntuales o deleciones en el gen FMR1, pudiendo ser *de novo* o heredadas de una madre portadora. ¹

1.1.3 Fenotipo

El fenotipo depende principalmente del número de repeticiones CGG, es decir, de qué alelo posea el cromosoma X y de si se trata de un varón o una mujer.

En individuos con alelos normales e intermedios no se produce ninguna alteración en la producción de FMRP. ¹

En individuos con alelos premutados, la expresión de la proteína FMRP no se afecta significativamente, pero sí aumenta la expresión del mRNA que codifica el gen FMR1, tóxico para las células. Estos individuos son asintomáticos para SXF, pero pueden desarrollar insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (20% de las mujeres) y síndrome de tremor-ataxia asociado al X frágil (FXTAS) hasta en un 50% de los individuos. Además, existe mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes como hipotiroidismo y fibromialgia. ^{1, 2}

Los individuos con mutación completa presentan Síndrome X Frágil. No aparece ni el mRNA ni la proteína FMRP en los genes con >200 copias. Entre las manifestaciones cabe destacar una baja capacidad intelectual con un promedio de IQ de 40 – 50 en varones y algo mayor en mujeres. Alteraciones de la memoria de trabajo y del procesamiento de la información, déficit de atención e hiperactividad, impulsividad, ansiedad, labilidad emocional, trastornos y conductas del espectro autista, alteraciones del desarrollo del lenguaje y epilepsia. En cuanto a las manifestaciones físicas, se puede encontrar entre otras, macroorquidismo, mandíbula alargada, estrabismo, orejas grandes evertidas, macrocefalia y alteraciones de tejido conectivo como prolapso de la válvula mitral, pies planos, articulaciones hiperextensibles y piel suave. ²

En las mujeres, la sintomatología suele ser algo más leve debido a la inactivación que ocurre al azar de uno de los dos cromosomas sexuales X, el normal o mutado. ^{1,2}

1.2 Gen FMR1

El gen FMR1 se localiza en la posición Xq27.3 del cromosoma sexual X. Ocupa 40Kb y se compone de 17 exones y 16 intrones. ^{1,2}

El triplete polimórfico CGG que causa el SXF se localiza en la secuencia 5'UTR (5' untranslated región) del primer exón. Este exón actúa como regulador de la expresión del promotor. Entre las repeticiones periódicas CGGn, existen interrupciones AGG, que estabilizan la secuencia de DNA; en la población normal se presentan cada 9 – 10 tripletes CGG. Disminuyen el riesgo de expansión de los alelos intermedios o premutados. Cuando estas secuencias AGG desaparecen la secuencia torna inestable y aumenta el riesgo de expansión. En función del número de repeticiones aparecen los alelos descritos previamente en el apartado 1.1.2. ^{1,2}

La expansión de tripletes CGG se produce por un inadecuado apareamiento de bases de las cadenas de DNA durante la replicación o durante la reparación del DNA mal copiado por la polimerasa. La probabilidad de que la mutación ocurra depende de la edad materna, del número de repeticiones previo y del número de interrupciones AGG presentes en el gen FMR1. ¹

1.3 Silenciamiento del gen FMR1

El silenciamiento del gen FMR1 responde a modificaciones epigenéticas, que pueden ser debidas a una hipermetilación o alteraciones de la acetilación de las histonas H3 y H4. Cuando el número de repeticiones del CGG es >200 (mutación completa), se hipermetilan las citosinas en el promotor del gen FMR1, inhibiéndose su expresión. Estos cambios epigenéticos, hipermetilación y desacetilación, junto con los producidos por la expansión de tripletes en el promotor, provocan que el DNA se mantenga en estado heterocromático. De esta manera, tanto los factores de transcripción como la polimerasa, no se pueden unir a la secuencia de DNA, no produciéndose mRNA y por lo tanto silenciando el gen FMR1. ^{1,2}

Pueden existir casos con un mosaico de metilación que permite que algunas células, pese a poseer un alelo con mutación completa, expresen FMRP. Estos individuos son varones generalmente y presentan un fenotipo menos severo. ^{1,2}

La expansión de trinucleótidos que da paso de alelo premutado a alelo con mutación completa ocurre en la meiosis materna, mientras que la hipermetilación, desacetilación e inactivación del gen FMR1 se produce tras la fecundación en etapas precoces del desarrollo embrionario. ¹

En un pequeño porcentaje de casos, 1 – 2%, el silenciamiento del gen FMR1 se produce por mutaciones puntuales o deleciones. ¹

1.4 Proteína FMRP

El gen FMR1 posee 17 exones y expresa un mRNA de 3.9 Kb, que tiene *splicing* alternativos, principalmente a nivel de los exones 12, 14, 15 y 17, dando lugar a 12 isoformas de FMRP. La proteína FMRP está compuesta por 632 aminoácidos que contienen múltiples sitios de interacción proteína – proteína y sitios de unión para RNAs codificantes y no codificantes.

En cuanto a la expresión de FMRP en el organismo presenta elevados niveles en el sistema nervioso central y periférico (hipocampo, corteza, motoneuronas, células Purkinje del cerebelo), testículos, ovarios, timo, esófago y bazo. Moderados niveles en riñones, hígado, colon, útero, tiroides y pulmón. No se expresa en músculo, corazón ni aorta. ²

En el sistema nervioso central, la FMRP es la principal proteína reguladora de traducción de hasta un tercio de los RNAs que codifican proteínas pre y postsinápticas. Tiene función de transporte desde el núcleo hasta el soma y las dendritas, y de regulación de traducción de mRNAs a su proteína funcional. Es esencial su correcto funcionamiento y producción para el modelado de la plasticidad sináptica, la sinapsis, el desarrollo normal de las espinas dendríticas y por lo tanto, el correcto funcionamiento cognitivo del individuo. ^{1,2}

Cuando se pierde la función reguladora de la FMRP, se produce un desequilibrio entre vías de neurotransmisión excitatoria e inhibitoria y

alteraciones de la señalización intracelular. Las principales alteraciones conocidas a nivel neuronal por el déficit de FMRP se relacionan con los receptores de glutamato (mGluR), los receptores de N-metil-D-aspartico (NMDAR), el receptor AMPA (AMPA), los receptores de cannabinoides (CBR), la sintasa quinasa glucogénica 3 (GSK3), los inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRI), el receptor GABA tipo A (GABAR-A), rutas de señalización intracelular y los niveles de la matriz de metalopeptidasa-9 (MMP9).^{1,2}

1.5. Líneas terapéuticas en el X Frágil

En la actualidad se plantean dos vías principales para el tratamiento del Síndrome X Frágil. En primer lugar, la focalizada en reactivar el gen FMR1, tema principal de éste Trabajo de Fin de Grado (TFG).

En segundo lugar, los tratamientos orientados a suplir el déficit de la proteína FMRP y sus consecuencias.^{1,2} Para estos se utilizan terapias farmacológicas orientadas al control de los síntomas neuro-psiquiátricos y a la actuación sobre la base fisiopatológica de la enfermedad.^{1, 2, 4}

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este Trabajo de Fin de Grado se lleva a cabo una actualización de la información existente sobre el Síndrome X Frágil y su tratamiento genético. En primer lugar, se lleva a cabo una búsqueda sistemática de las publicaciones y ensayos a propósito del tema, realizando por último un análisis crítico de los resultados obtenidos.

2.1. Justificación

El Síndrome X Frágil se considera una enfermedad rara, con una incidencia menor a 5/10.000 personas. En los últimos años el estudio de su etiología y fisiopatogenia ha motivado la búsqueda de nuevos tratamientos específicos. Con éste TFG se pretende realizar una revisión bibliográfica de la información existente. Para ello se lleva a cabo una búsqueda sistemática de información en bases de datos de relevante reconocimiento científico.

2.2. Objetivos y búsqueda de la información

En primer lugar, se decide los objetivos de la búsqueda. Se pretende recopilar información sobre la etiología, la etiopatogenia y especialmente sobre la reactivación del gen del Síndrome X Frágil.

Nuestro tutor, Juan José Tellería Orriols, nos facilita en septiembre de 2017 el borrador de un artículo¹ no publicado a esa fecha, que se utiliza como referencia a la hora de dirigir la búsqueda de información. Durante el proceso de realización del TFG el artículo es publicado.

Antes de iniciar la búsqueda se fijan criterios para acotar la actualidad y accesibilidad de la información.

- Criterios de inclusión:
 - Publicado en los últimos 5 años
 - Estudio con material humano o animal
 - Información relevante sobre los objetivos establecidos
- Criterios de exclusión
 - Idioma distinto al español o inglés
 - Artículos sin acceso gratuito al texto completo

Tras fijar éstos criterios se inicia la búsqueda dirigida en Octubre del 2017. Se utiliza como bases de datos y motores de búsqueda PubMed, Cochrane, Clinical Trials, Elsevier, Google y Google académico.

A continuación, se expone los términos de búsqueda utilizados y los resultados obtenidos en cada base de datos. Así mismo, se expone el número de artículos aceptado debido a su relevancia tras la lectura crítica del *abstract* o resumen. Se mantienen los criterios de búsqueda establecidos, y en Cochrane, Clinicaltrials y Elsevier, con el objetivo de dirigir la búsqueda, se añaden nuevos filtros facilitados por la opción de búsqueda avanzada.

PubMed

A continuación, y apoyándonos en la tabla adjunta, se explican la búsqueda realizada en la base de datos PubMed. Durante la búsqueda, en ocasiones se

obtienen los mismos artículos al utilizar diferentes términos. Se decide citar los artículos en todos los apartados en los que aparecen.

TÉRMINO	BOOLEANO	TÉRMINO	RESULTADOS	VÁLIDOS
<i>X Fragile</i>	AND	<i>Reactivation</i>	9	7
		<i>Histone acetylation</i>	2	2
		<i>DNA methyltransferase</i>	3	0
		<i>CRISPR/Cas9</i>	3	3
		<i>Reversion</i>	2	1
		<i>DNA methylation editing</i>	2	2

Como término principal de búsqueda se utiliza “*X Fragile*”, añadiendo como segundos términos los siguientes.

- Con el término de búsqueda “*reactivation*”, se obtienen 9 resultados, considerándose 7 de ellos relevantes. ^{6, 8, 9, 11, 12, 13, 14}
- Con los términos de búsqueda “*Histone acetylation*”, se obtienen 2 resultados, siendo ambos relevantes. ^{10, 11}
- Con los términos de búsqueda “*DNA methyltransferase*”, se obtienen 3 resultados, ninguno con relevancia.
- Con el término de búsqueda “*CRISPR/Cas9*”, se obtienen 3 resultados, siendo los tres relevantes. ^{13, 14, 15}
- Con el término de búsqueda “*reversion*”, se obtienen dos resultados, tomando uno como relevante. ¹⁵
- Con los términos “*DNA methylation editing*”, se obtienen dos resultados, siendo ambos relevantes. ^{14, 15}

Al utilizar el término “*epigenetic*”, se obtienen 54 artículos sin especificidad por los objetivos establecidos. Se decide, por lo tanto, restringir la búsqueda a los términos previamente descritos.

Elsevier

Término de búsqueda: “X Frágil”. Filtros añadidos: “revistas de ciencias de la salud”, área de conocimiento, “Medicina”, especialidad, “Neurología”. Se obtiene como resultado 11 artículos, considerándose relevantes dos. ^{4, 5}

Google académico

Término de búsqueda: “Mecanismos epigenéticos Síndrome X Frágil”. No se añaden nuevos filtros. Se selecciona un artículo relevante.³

FRAXA Research Fundation

Se trata de la página web de la Fundación FRAXA, asociación internacional sin ánimo de lucro que participa en la búsqueda activa de tratamientos para el Síndrome X Frágil. Se busca en su base de datos de ensayos clínicos aquellos dirigidos a la reactivación del gen, sin encontrar ningún resultado.

Cochrane

Términos de búsqueda: “*reactivation X fragile*”. Filtros añadidos: “*genetics disorders*”, “*neurology*”. Se obtiene un único resultado, considerándose relevante.¹⁸

Clinical Trials

Se utiliza como términos de búsqueda principal “*X fragile Syndrome*” y como filtro añadido el término de búsqueda secundario “*reactivation*”. No se obtiene ningún resultado.

Google

Al realizar la búsqueda con los términos “Reactivación X Frágil”, “Epigenética X Frágil”, “Tratamiento X Frágil” y “nuevas terapias X Frágil” se encuentran varios artículos con relevancia. Estos artículos pertenecen a las páginas web de la Universidad de Málaga², Universidad del Valle Colombia Médica¹⁶, la revista de *Neurologia.com*, el Instituto de Tecnología de Massachusetts¹⁷, la *American Journal of Medical Genetics*⁷, *Human Molecular Genetics (Oxford Academy)* y *Cell Reports*¹⁵.

Tras realizar un control del correcto cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionan los cinco artículos ya citados.^{2, 7, 15, 16, 17}

2.3. Organización de la información

Se utiliza el *software* Zotero como gestor de la información. Se trata de un programa ampliamente conocido y de acceso gratuito, que permite la descarga

de los artículos preseleccionados y la presentación de la bibliografía en estilo Vancouver.

2.4. Análisis de la información

Una vez definidos los objetivos del trabajo tras la lectura del artículo proporcionado por el tutor ¹, se fijan los criterios de inclusión y exclusión para acotar la búsqueda. Se utilizan los términos definidos en el apartado 2.2 para dirigir la búsqueda a los objetivos establecidos. Tras una lectura crítica y comprensiva de los *abstracts*, se seleccionan los artículos considerados relevantes. Durante la búsqueda se añaden los artículos seleccionados a Zotero. Finalmente, se realiza un análisis exhaustivo de toda la información recopilada.

3. RESULTADOS

En el locus FMR1 podemos encontrar, de 5' a 3', el promotor, con islas CpG, y la secuencia transcrita de FMRP, que incluye la secuencia variable de repetición de tripletes CGG localizada en la región no codificante 5'UTR del primer exón. Cuando el número de copias excede las 200 repeticiones se produce el silenciamiento del gen FMR1, provocando el Síndrome X Frágil. ⁶ Éste número de repeticiones actúa por lo tanto como detonante de los cambios epigenéticos, que en conjunto, provocan la inactivación del gen FMR1. ¹⁴

Se producen principalmente dos modificaciones epigenéticas. En primer lugar, la hipermetilación de las citosinas de la secuencia expandida de tripletes CGG y de las islas CpG del promotor, que inhiben su expresión. En segundo lugar, la desacetilación de las histonas H3 y H4, la desmetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), la metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9), la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) y la metilación de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20), que confieren al DNA estado de heterocromatina que imposibilita su transcripción. ⁷

Al estudiar los diferentes fenotipos de familias afectadas por el Síndrome X Frágil, se identificaron varones con inteligencia normal pese a ser hijos de madres afectas de la que habían heredado el alelo con mutación completa.

Este hallazgo motivó el estudio del funcionamiento del gen FMR1 en estos individuos. Como resultado se obtiene un nuevo tipo de alelo que presenta mutación completa (>200 copias), sin hipermetilación del promotor ni de los tripletes CGG, denominándose *Unmethylated full mutation* (UFM). Estos individuos, al no presentar el gen completamente silenciado, producen FMRP en menor cantidad que un individuo sano, pero suficiente como para tener una inteligencia dentro del rango normal. Tras este descubrimiento se abre una nueva ventana en el estudio de las distintas combinaciones que podrían llevar a cabo una reactivación del gen, ya sea rescindiendo tripletes o modulando las modificaciones epigenéticas.^{1,6,7}

El uso de ratones para los ensayos relacionados con las modificaciones epigenéticas, queda imposibilitado al no poseer los mismos mecanismos de silenciamiento que el ser humano.¹³ Por lo tanto, los estudios de los que se va a hablar a continuación, han sido realizados *in vitro*, a partir de células madre embrionarias y de linfoblastos y fibroblastos humanos modificados para obtener células madres pluripotentes inducidas (*induced, Pluripotent Stem Cell*, iPSCs). Se toman líneas celulares de pacientes con alelos normales (control), con mutación completa y con mutación completa no metilada (UFM). De cada grupo de pacientes se estudia el número de repeticiones CGG, el estado de metilación, las modificaciones en las histonas y la expresión de FMRP.¹⁰

3.1 Edición genómica con CRISPR/Cas9

La CRISPR/Cas9 es una herramienta de edición genómica derivada de un sistema de defensa inmune bacteriano. Su actuación se basa en la posibilidad de escindir secuencias de nucleótidos prefijadas gracias a la endonucleasa Cas9. Esta nucleasa es guiada hasta su secuencia de DNA diana por una sonda única dirigida de RNA (sgRNA) complementaria. La sigla CRISPR corresponde a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.^{1,14,15}

Como ya ha sido mencionado, la expansión de CGG en la mutación completa, provoca la inactivación del gen FMR1. Diversos estudios fijan como objetivo

demostrar que al escindir mediante CRISPR/Cas9 el exceso de tripletes, se consigue restaurar la función del gen.^{13, 14,15}

Los estudios seleccionados evidencian que, tras la correcta escisión de las repeticiones CGG, algunas de las líneas celulares muestran reactivación tanto de la transcripción como de la traducción. Al analizar las variaciones epigenéticas producidas tras la escisión, se observa una drástica desmetilación de las islas CpG del promotor, tornando éste en activo, y un cambio en la estructura de la cromatina. El paso de heterocromatina a eucromatina se debe a la acetilación de la histona H3, la metilación de la lisina 4 de la H3 y la desmetilación de la lisina 9 de la H3.^{13, 14,15}

CRISPR/Cas9 muestra un correcto funcionamiento en la reactivación de FMR1, abriendo las puertas a un futuro prometedor. No se consigue el mismo resultado en todas las estirpes estudiadas, planteando la necesidad de profundizar en el estudio del silenciamiento del promotor y de las modificaciones de las histonas.^{14, 15, 17}

3.2 Bloqueo DNA metiltransferasa

La DNA metiltransferasa es la enzima encargada de añadir grupos metilo. En el caso de los alelos con mutación completa, la DNA metiltransferasa metila las citosinas de las islas CpG del promotor y de la propia expansión de trinucleótidos. Mecanismo epigenético que interviene en el silenciamiento del gen FMR1.^{6, 11}

Se propone como posible mecanismo de reactivación del gen el uso de agentes hipometilantes como 5-azaC (5-azacytidine) y 5-azadC (5-aza-2-deoxycytidine). Estos compuestos farmacológicos se unen irreversiblemente a la DNA metiltransferasa inhibiendo su función. Aparentemente, para que el tratamiento sea efectivo es necesaria la división celular, permitiendo el bloqueo de la DNA metiltransferasa previo a su actuación.^{1, 6, 9, 11}

Se demuestra que el 5-azadC produce una reactivación parcial y transitoria del gen FMR1. Se observa que, tras 7 días de tratamiento, la reactivación se mantiene en torno a un mes, con valores máximos de transcripción entorno a los 10 – 15 días tras la última dosis. Para valorar la especificidad del 5-azadC

por el promotor del gen FMR1 se utiliza dos loci control conocidos, PWS/AS y BWS/SRS, en los que no se demuestra cambios significativos en su estado de metilación.¹¹ Al estudiar el estado de las histonas tras el uso de 5-azadC, se aprecian modificaciones en la histona H3, de las que se hablará en el apartado 3.3.^{8, 11}

Los obstáculos encontrados en el uso del 5-azadC radican en la falta de reactivación completa y mantenida del FMR1, la toxicidad producida, el desconocimiento de los efectos a largo plazo y la necesidad de división celular.^{1, 6, 7, 11, 13}

Debido a la toxicidad asociada al uso de 5-azadC, se estudia la acción de otros agentes hipometilantes como el metotrexato (MTX), antagonista del folato. Se consigue la transcripción parcial del FMR1, pero sin expresar FMRP. Se propone el estudio del efecto del MTX en pacientes con artritis reumatoide y síndrome de X frágil, pendiente de realización.¹²

3.3 Modificaciones en las histonas

La mutación completa del gen provoca la desacetilación de las histonas H3 y H4, la desmetilación de la lisina 4 de la histona 3(H3K4), la metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9), la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) y la metilación de la lisina 20 en la histona 4(H4K20). Estas modificaciones confieren al DNA estado de heterocromatina que imposibilita su transcripción.^{1, 8}

Para reactivar el gen FMR1, se utilizan fármacos inhibidores de la histona – deacetilasa (HDAC), tales como butirato, 4-fenibutirato, trichostatina A, ácido valproico y L- acetilcarnitina. Con dichos fármacos se observa un aumento de la acetilación en las histonas H3 y H4, que permite una modesta transcripción sin alterar el estado de metilación del gen.^{1,6, 7,16} Tanto el ácido valproico como la L- acetilcarnitina, han demostrado disminuir los síntomas de hiperactividad asociados al Síndrome de X Frágil.^{1, 6, 18}

Al utilizar el agente 5-azadC para revertir la metilación del promotor, se observan también modificaciones en las histonas que favorecen el estado de

euromatina. Previo a la desmetilación del DNA, la acetilación de las histonas H3 y H4, junto con la metilación de H3K4, favorecen la transcripción de FMR1. Al mismo tiempo se demuestra que la trimetilación de la histona H3K27 actúa como factor favorecedor del re-silenciamiento.^{8, 9, 11} El mRNA producido tras la reactivación posee el mismo número de repeticiones que el alelo mutado, adoptando una conformación anómala en horquilla. Esta estructura actúa como análogo para el reclutamiento de la enzima histona-lisina metiltransferasa (EZH2), encargada de la trimetilación la histona H3K27, que provoca estado de heterocromatina y favorece la re-metilación. El propio mRNA, por lo tanto, actúa como represor de su transcripción, sugiriendo un mecanismo de *feed-back* negativo.^{7, 8, 9}

Al utilizar 5-azadC junto con inhibidores de la EZH2, se aprecia un ligero aumento de la transcripción y un descenso en la metilación de H3K27, H3K9 y H4K20. Así, se consigue retrasar el re-silenciamiento del gen, pero sin prevenir su re-metilación.^{8, 9} Finalmente se establece que la transcripción actúa como propio precursor del re-silenciamiento del gen FMR1.⁸

El efecto de los inhibidores de HDAC y EZH2 se potencia al ser utilizado en células ya tratadas con 5-azadC, al igual que el efecto de 5-azadC mejora cuando se añaden inhibidores de histonas.^{5, 8, 9, 11, 16}

Se propone que la metilación del gen FMR1 es consecuencia de una alteración previa de las histonas. Se demuestra que la reactivación del gen puede ocurrir pese a la presencia de éstas alteraciones represoras, y se sugiere que son necesarias para el silenciamiento del gen FMR1 aunque no suficientes.⁹ Pese a estas demostraciones, se confiere a la metilación del DNA una función dominante sobre la modificación de las histonas a la hora de determinar la inactivación transcripcional.¹¹

4. DISCUSIÓN

El Síndrome X Frágil es la principal causa de discapacidad intelectual hereditaria y la principal causa monogénica de autismo. Es una enfermedad producida por la expansión de trinucleótidos CGG, con herencia dominante ligada al cromosoma X.

La expansión de tripletes desencadena cambios epigenéticos que silencia el gen, siendo estos la hipermetilación del promotor, y las modificaciones de las histonas, que confieren una conformación en heterocromatina.

En la actualidad existen dos estrategias terapéuticas.

En primer lugar, la enfocada a paliar los síntomas del SXF. Se está tratando de desarrollar una terapia dirigida a contrarrestar las alteraciones fisiopatológicas de la enfermedad, pero aún no se dispone de ningún fármaco con especificidad para este síndrome.

En segundo lugar, la terapia dirigida a reactivar el gen FMR1. Encontramos dos líneas de investigación. Por una parte, el uso de CRISPR/Cas9 para reducir el tamaño de la expansión de tripletes. Por otra parte, la actuación sobre los mecanismos de silenciamiento epigenético. Se han utilizado agentes hipometilantes para revertir la metilación del promotor, e inhibidores de enzimas de modificación de histonas para revertir sus cambios.

Todas las vertientes terapéuticas están siendo estudiadas en la actualidad. Queda un amplio camino por recorrer hasta conseguir un tratamiento efectivo para el Síndrome X Frágil. Se están encontrando obstáculos en el camino, como la toxicidad generada por algunos compuestos, el desconocimiento de efectos secundarios, la imposibilidad de disponer de un modelo murino para estudiar las modificaciones epigenéticas.

A día de hoy, la restauración de la función de FMR1 plantea diversos retos a superar. La reactivación de un alelo mutado, mediante técnicas de modificación epigenética, produce un mRNA anómalo con el mismo exceso de tripletes, que favorece su propio re-silenciamiento.

Pese a la búsqueda exhaustiva realizada, no se ha encontrado ningún estudio o ensayo que combine las tres técnicas de modificación genética. Sería conveniente estudiar el resultado conjunto del uso de CRISPR/Cas9, 5-azadC y los inhibidores de enzimas de modificación de histonas. Hay evidencia de que el uso combinado de 5-azadC y los modificadores de las histonas actúan sinérgicamente.

5. CONCLUSIONES

1. El síndrome del X Frágil es la causa más común de discapacidad intelectual hereditaria y la principal causa monogénica de autismo. Se trata de una enfermedad por expansión de tripletes CGG dominante ligada al cromosoma X. ^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18}
2. El silenciamiento del gen FMR1 se produce por modificaciones epigenéticas potencialmente reversibles. ^{1, 2, 6}
3. Existen individuos con mutación completa que producen FMRP al encontrarse el promotor del gen FMR1 desmetilado. ^{1, 2, 6, 7, 8, 10, 11, 12}
4. La reactivación de FMR1 puede ocurrir pese a la presencia de alteraciones represoras de las histonas. Se sugiere que son necesarias para el silenciamiento del gen FMR1 aunque no suficientes. ⁹
5. Se confiere a la metilación del DNA una función dominante sobre la modificación de las histonas a la hora de determinar la inactivación transcripcional. ¹¹
6. Se consigue la reactivación parcial y transitoria del gen FMR1 utilizando 5-azadC como agente inhibidor la DNA metiltransferasa. ^{6, 7, 8, 9, 11}
7. Se ha establecido la especificidad de 5-azadC por la DNA metiltransferasa del gen FMR1. ¹¹
8. El mRNA producido tras la reactivación del gen con mutación completa reprime su propia transcripción mediante la trimetilación de la histona H3K27. ^{8, 9}
9. Se consigue la reactivación parcial del gen FMR1 con mutación completa al utilizar CRISPR/Cas9 para escindir la secuencia expandida. ^{1, 14, 15, 17}
10. Pese a los avances conseguidos hasta la fecha, es necesario ampliar el estudio etiología, fisiopatología y tratamiento del Síndrome X Frágil. ^{1, 6, 7, 11, 12, 13, 15, 16}

6. BIBLIOGRAFIA

1. Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clin Genet.* febrero de 2018;93(2):197-205.
2. Guirado FMG. Estrés oxidativo como diana de tratamiento experimental del Síndrome X Frágil. *Málaga 2015* :237.
3. Michelena Q de, Isabel M. Apuntes sobre el Síndrome de X-Frágil. *Revista Medica Herediana.* octubre de 2013;24(4):267-8.
4. Pugin A, Faundes V, Santa María L, Curotto B, Aliaga S, Salas I, et al. Aspectos clínicos, moleculares y farmacológicos en los trastornos asociados a gen 1 del retraso mental del X frágil. *Neurologia.* :241-52.
5. Rosales-Reynoso MA, Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Barros-Núñez P. Mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la memoria y su implicación en algunas enfermedades neurológicas. *Neurologia.* :628-38.
6. Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, Neri G. Transcriptional Reactivation of the FMR1 Gene. A Possible Approach to the Treatment of the Fragile X Syndrome. *Genes (Basel)* [Internet]. 17 de agosto de 2016 [citado 21 de abril de 2018];7(8).
7. Tabolacci E, Chiurazzi P. Epigenetics, fragile X syndrome and transcriptional therapy. *Am J Med Genet A.* noviembre de 2013;161A(11):2797-808.
8. Kumari D, Usdin K. Sustained expression of FMR1 mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3K27. *Hum Mol Genet.* 01 de 2016;25(17):3689-98.
9. Kumari D, Usdin K. Polycomb group complexes are recruited to reactivated FMR1 alleles in Fragile X syndrome in response to FMR1 transcription. *Hum Mol Genet.* 15 de diciembre de 2014;23(24):6575-83.
10. de Esch CEF, Ghazvini M, Loos F, Schelling-Kazaryan N, Widagdo W, Munshi ST, et al. Epigenetic characterization of the FMR1 promoter in induced pluripotent stem cells from human fibroblasts carrying an

- unmethylated full mutation. *Stem Cell Reports*. 14 de octubre de 2014;3(4):548-55.
11. Tabolacci E, Mancano G, Lanni S, Palumbo F, Goracci M, Ferrè F, et al. Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells. *Epigenetics Chromatin* [Internet]. 24 de marzo de 2016 [citado 21 de abril de 2018];9.
 12. Brendel C, Mielke B, Hillebrand M, Gärtner J, Huppke P. Methotrexate treatment of FraX fibroblasts results in FMR1 transcription but not in detectable FMR1 protein levels. *J Neurodev Disord*. 10 de septiembre de 2013;5(1):23.
 13. Li M, Zhao H, Ananiev GE, Musser MT, Ness KH, Maglaque DL, et al. Establishment of Reporter Lines for Detecting Fragile X Mental Retardation (FMR1) Gene Reactivation in Human Neural Cells. *Stem Cells*. 2017;35(1):158-69.
 14. Xie N, Gong H, Suhl JA, Chopra P, Wang T, Warren ST. Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of the Expanded CGG-Repeat of the Fragile X Chromosome. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0165499.
 15. Park C-Y, Halevy T, Lee DR, Sung JJ, Lee JS, Yanuka O, et al. Reversion of FMR1 Methylation and Silencing by Editing the Triplet Repeats in Fragile X iPSC-Derived Neurons. *Cell Rep*. 13 de octubre de 2015;13(2):234-41.
 16. Saldarriaga W, Tassone F, González-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, Hagerman R. Fragile X Syndrome. *Colombia Médica*. 30 de diciembre de 2014;45(4):190-8.
 17. Study: Fragile X syndrome neurons can be restored [Internet]. MIT News. [citado 29 de abril de 2018]. Disponible en: <http://news.mit.edu/2018/mit-whitehead-fragile-x-syndrome-neurons-restored-crispr-0215>
 18. Rueda J-R, Guillén V, Ballesteros J, Tejada M-I, Solà I. L-acetylcarnitine for treating fragile X syndrome. 2015 [citado 1 de mayo de 2018]; Disponible en: <http://www.readcube.com/articles/10.1002/14651858.CD010012.pub2>



ACTUALIZACIONES EN LA TERAPIA GÉNICA DEL SÍNDROME X FRÁGIL



Alumnas: Bartolomé Morate, María y Castro Marchán, Elena
Tutor: Tellería Orriols, Juan José
Facultad de Medicina de Valladolid

INTRODUCCIÓN

El Síndrome X Frágil es la principal causa hereditaria de discapacidad intelectual y la principal causa monogénica de autismo. Se trata de una enfermedad de herencia dominante ligada al cromosoma X. Se produce por una mutación dinámica con expansión de tripletes CGG en el gen FMR1, que cuando sobrepasan las 200 copias, detonan la inactivación epigenética del gen. Las modificaciones epigenéticas principales son la metilación del promotor y las modificaciones de las histonas H3 y H4.

Se ha demostrado la posibilidad de reactivar parcialmente el gen FMR1 mediante tres vías de actuación. La edición genómica con CRISPR/Cas9, la inactivación de la DNA metiltransferasa y la modificación del estado de las histonas.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El Síndrome X Frágil se considera una enfermedad rara, con una incidencia menor de 5/10.000 personas. En los últimos años el estudio de su etiología y fisiopatología ha motivado la búsqueda de nuevos tratamientos específicos.

Con éste TFG se ha realizado una revisión bibliográfica de la información existente sobre el Síndrome X Frágil, profundizando en los tratamientos centrados en la reactivación del gen FMR1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza una búsqueda sistemática de información en PubMed, Cochrane, Clinical Trials, Elsevier, Google y Google académico.

Se utilizan como criterios de inclusión:

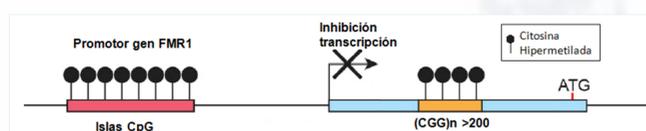
- Publicado en los últimos 5 años
- Información relevante sobre los objetivos establecidos

Criterios de exclusión:

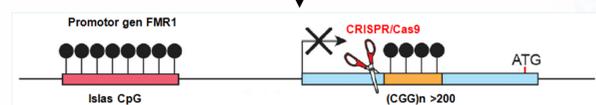
- Idioma distinto al español o inglés
- Artículos sin acceso gratuito al texto completo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

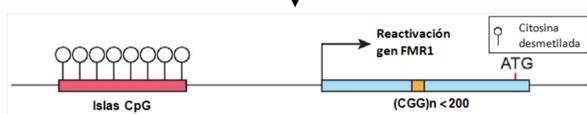
Edición CRISPR/Cas9



La mutación completa del gen FMR1 provoca la hipermetilación del promotor y de la expansión de tripletes inhibiendo la transcripción.



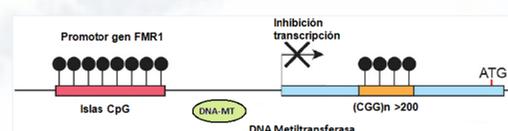
CRISPR/Cas9 escinde el exceso de tripletes CGG.



La desmetilación del promotor permite la transcripción y traducción.

Se favorece la conformación de eucromatina con la acetilación de H3, metilación H3K4, y desmetilación de H3K9.

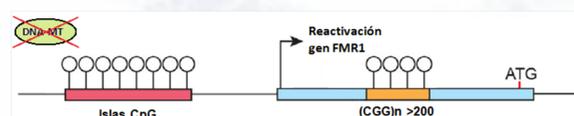
Inhibición DNA metiltransferasa



DNA-MT metila las citosinas del promotor y de la expansión CGG, silenciando el gen.



El agente 5-azadC inhibe la DNA metiltransferasa
Agentes hipometilantes: metotrexato y antagonistas del folato

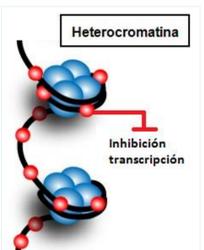


5-azadC consigue una reactivación parcial y transitoria de la transcripción de FMR1.
No se consigue reactivación con los agentes hipometilantes.

Modificación de histonas

Modificaciones silenciadoras

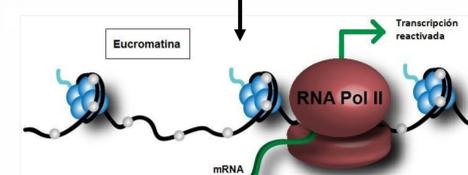
- Desacetilaciones en H3 y H4
- Desmetilación de H3K4
- Metilación de H3K9
- Metilación de H4K20
- Trimetilación de H3K27



Butirato, trichostatina A y ácido valproico favorecen la re-acetilación de las histonas H3 y H4.

5-azadC favorece la re-acetilación de H3 y H4, y la modificación en las metilaciones puntuales de H3K4, H3K9 y H4K20.

Inhibidores de la enzima que trimetila H3K27, (EZH2).



Al utilizar 5-azadC junto con inhibidores de la EZH2, se consigue retrasar el re-silenciamiento del gen, pero sin prevenir la re-metilación.

CONCLUSIONES

1. El silenciamiento del gen FMR1 se produce por modificaciones epigenéticas potencialmente reversibles.
2. Se consigue la reactivación parcial del gen FMR1 con mutación completa al utilizar CRISPR/Cas9 para escindir la secuencia expandida.
3. Se consigue la reactivación parcial y transitoria del gen FMR1 utilizando 5-azadC como agente inhibidor la DNA metiltransferasa.
4. El mRNA producido tras la reactivación del gen con mutación completa reprime su propia transcripción mediante la trimetilación de H3K27.

BIBLIOGRAFÍA. 1) Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodríguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. Clin Genet. febrero de 2018;93(2):197-205.. 2) Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, Neri G. Transcriptional Reactivation of the FMR1 Gene. A Possible Approach to the Treatment of the Fragile X Syndrome. Genes (Basel) [Internet]. 17 de agosto de 2016 [citado 21 de abril de 2018];7(8).. 3) Tabolacci E, Mancano G, Lanni S, Palumbo F, Goracci M, Ferrè F, et al. Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells. Epigenetics Chromatin [Internet]. 24 de marzo de 2016 [citado 21 de abril de 2018];9.