

Expansión de tripletes repetidos en enfermedades neurodegenerativas hereditarias

Iván Peñuelas^a, Carlos de Miguel^a y Arturo Gullón^b

Departamentos de ^aBioquímica y Biología Molecular y ^bGenética Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

mutaciones genéticas, enfermedades hereditarias, síndrome del cromosoma X frágil, distrofia miotónica, atrofia muscular espinal, ataxia, enfermedad de Huntington

En función de la tasa de mutación –que en el genoma humano es muy variable– se pueden distinguir dos tipos de mutaciones¹: mutaciones estáticas y mutaciones dinámicas. En las primeras, la tasa de mutación es la misma tanto para la secuencia originada tras la mutación como para la secuencia predecesora. Sin embargo, las mutaciones dinámicas, que ocurren en secuencias de ADN repetitivo, se caracterizan por un tipo muy particular de mutación: la variación en el número de copias. En este caso, la tasa de mutación depende del número de copias, por lo que la mutabilidad de una nueva secuencia originada por mutación es diferente de la de la secuencia de la que proviene.

Se ha demostrado que las mutaciones dinámicas que originan un aumento en el número de repeticiones en secuencias polimórficas de tripletes repetidos constituyen un nuevo mecanismo de mutación que conduce finalmente a diversas enfermedades neurológicas hereditarias.

El objeto de esta revisión es la exposición de diversas características clínicas y genéticas de seis trastornos cuya causa primaria subyacente es la expansión de tripletes repetidos en el ADN. Estas enfermedades son el síndrome del cromosoma X frágil (FRAX), la distrofia miotónica (DM), la enfermedad de Huntington (EH), la enfermedad de Kennedy (atrofia muscular espinobulbar, SBMA), la ataxia espinocerebelosa de tipo I (SCA1) y la atrofia dentadorrubropalidolusiana (DRPLA) (tabla 1). Se discutirán, así mismo, los mecanismos propuestos como responsables de la amplificación, los métodos de diagnóstico mediante técnicas de biología molecular y las perspectivas de tratamiento.

Muchas características destacables (y previamente inexplicadas) de estas enfermedades se han podido comprender sobre la base del peculiar tipo de mutaciones que las originan. Entre éstas cabe citar los fenómenos de la anticipación, la dominancia, la variabilidad en la penetrancia y manifestación de la enfermedad y su herencia diferencial en función del sexo.

El síndrome del cromosoma X frágil

El FRAX, asociado a un extraño punto de fragilidad cromosómica en Xq27.3, es probablemente la causa más frecuente de retraso mental después del síndrome de Down y, sin duda, la forma más frecuente de retraso mental hereditario, con una incidencia de 1/1.500 varones y 1/2.500 mujeres. Fenotípicamente, los individuos afectados presentan una dismorfia facial inespecífica (orejas largas, cara estrecha y

alargada, distancia interocular reducida, macrocefalia, frente grande, mandíbula prominente, paladar ojival, incisivos largos, etc.) y macroorquidia que se observa frecuentemente después de la pubertad y que no es esencial para el diagnóstico clínico.

El FRAX presenta un singular patrón de herencia: aproximadamente el 20% de los varones que poseen un cromosoma X con el punto de fragilidad citado, son fenotípicamente normales, mientras que más del 30% de las mujeres que lo poseen muestran cierto grado de retraso mental. Estos varones, llamados *normal transmitting males (ntm)*, pasan el alelo mutado a sus hijas, que no se ven afectadas, pero sus nietos suelen verse severamente afectados. En esta inusual herencia ligada al sexo, es incluso más curioso el hecho de que la penetrancia de la enfermedad es reducida en los hermanos de los *ntm*, mientras que es muy elevada en los hermanos de los varones afectados. Por lo tanto, el riesgo de retraso mental en familias que sufren el síndrome FRAX depende de la posición de los individuos en los árboles genealógicos. Este extraño hecho se ha denominado la paradoja de Sherman.

El lugar de mutación en el síndrome FRAX presenta una longitud variable en diferentes individuos, está comprendido en una isla CpG y contiene una secuencia repetida (CGG)_n cuya longitud se ve extraordinariamente aumentada en los individuos afectados. Se ha identificado un gen (FMR-1)⁵ en el locus del cromosoma X frágil que comprende la secuencia CGG repetida, lo que sugiere la implicación de este gen en el síndrome. La expresión del gen FMR-1 no se limita al tejido nervioso, aunque los mayores niveles de expresión se encuentran en cerebro y testículos⁶. Se ha demostrado la ausencia del ARNm de FMR-1 en varones afectados, mientras que el gen se expresa tanto en varones normales como en portadores no afectados, y existe una correlación completa entre la metilación de la isla CpG situada en el extre-

TABLA 1

Enfermedades neurodegenerativas hereditarias originadas por la expansión de tripletes repetidos

	1	2	3	4
Síndrome del cromosoma X frágil	Xq27.3	CGG	5-45	50 → 1.000
Distrofia miotónica	19q13.3	CTG	5-27	50 → 1.000
Enfermedad de Huntington	4p16.3	CAG	10-29	36-121
Atrofia muscular espinobulbar	Xq11	CAG	17-26	40-52
Atrofia dentadorrubropalidolusiana	12p	CAG	7-23	53-88
Ataxia espinocerebelosa de tipo I	6p22-p23	CAG	6-39	41-59
Enfermedad de Machado-Joseph	14q-32.1	CAG	12-37	62-84

1: localización cromosómica de la repetición; 2: secuencia del triplete repetido; 3: número de repeticiones en individuos no afectados; 4: número de repeticiones en individuos afectados.

Correspondencia: Dr. I. Peñuelas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Navarra. Irunlarrea, s/n. 31080 Pamplona.

Manuscrito aceptado el 5-3-1996

Med Clin (Barc) 1997; 108: 542-548

mo 5' de la secuencia CGG repetida y la ausencia de expresión del gen FMR-1⁷. Por lo tanto, parece que la mutación da lugar de algún modo a la metilación de la región que regula la expresión del gen, lo que finalmente resulta en la ausencia de la proteína codificada por FMR-1, denominada FMRP, que es una proteína de unión al ARN que se encuentra en el citosol⁸.

Se considera probado que la mutación responsable del FRAX es el aumento en el número de repeticiones CGG en el extremo 5' del gen FMR-1, de tal forma que mientras que en la población normal el número de repeticiones varía entre 5 y alrededor de 45, en las familias afectadas está en el rango de 50 a 1.000 repeticiones e incluso más⁹⁻¹¹.

De acuerdo al tamaño de la amplificación, su estabilidad en células somáticas y el estado de metilación de los sitios de restricción cercanos al punto de mutación, las mutaciones en el locus del cromosoma X frágil se han clasificado en dos categorías: premutaciones y mutaciones completas¹². Las premutaciones se caracterizan por una amplificación de entre 70 y 500 pares de bases (bp), no se observa apenas variabilidad en células somáticas y los sitios de restricción citados no están metilados en los varones ni en el cromosoma X activo de las mujeres. Las mutaciones completas comprenden elongaciones de más de 600 bp y a menudo muestran inestabilidad mitótica en células somáticas, estando además metilados los sitios de restricción referidos tanto en los cromosomas X activos como en los inactivos.

La transición de premutación a mutación completa depende del tamaño de aquella^{10,12} pudiendo acarrear pequeñas premutaciones durante muchas generaciones antes de que se produzca la mutación completa¹³. Durante la ovogénesis, el riesgo de expansión hasta alcanzar las características de una mutación completa asociada con retraso mental aumenta con el número de repeticiones, de tal forma que esta variación en el riesgo explicaría la paradoja de Sherman^{4,14}.

Distrofia miotónica

La DM es una enfermedad neuromuscular de herencia autosómica dominante con una incidencia estimada de 1/7.500, siendo la forma más común de distrofia muscular en adultos.

El cuadro clínico de los pacientes afectados de DM es muy variable, y aunque son características la miotonía y la progresiva debilidad consecuentemente, también se ven afectados otros sistemas, produciéndose defectos en la conducción cardíaca, cataratas, hipersomnia, atrofia testicular y calvicie prematura en los varones. Esta extraordinaria variación fenotípica, que tiene lugar tanto entre las distintas familias afectadas como entre los individuos de una misma familia, es una de las características más notables de la DM. El fenómeno de la anticipación (la enfermedad se manifiesta en edades cada vez más tempranas en generaciones sucesivas, presentando además síntomas más severos) junto con el grado variable de penetrancia, son otras características destacables de la DM.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes se clasifican en tres categorías principales de acuerdo con la edad de manifestación de la enfermedad y la expresión fenotípica de la misma:

1. De manifestación tardía. En muchos casos es difícil de diagnosticar por el ligero grado de afectación que muestran los pacientes.
2. De manifestación en adultos.
3. De manifestación temprana, que es la forma más severa de la enfermedad y se ve frecuentemente asociada con un profundo retraso mental neonatal.

Los estudios de ligamiento genético con marcadores polimórficos demostraron que la enfermedad segregaba como un locus único en el brazo largo del cromosoma 19. Estudios de desequilibrio de ligamiento precisaron la localización cromosómica de la enfermedad, reducida a una región de unas 700 kb en la región 19q13.3.

En esta zona se ha identificado un fragmento de ADN inestable en individuos afectados por la distrofia miotónica¹⁵⁻¹⁸. El tamaño de este fragmento varía entre individuos de la misma familia, produciéndose además un aumento de la longitud de esa región de ADN en las generaciones sucesivas. Este incremento va asociado a un agravamiento de la enfermedad.

El defecto molecular subyacente a la DM se ha identificado finalmente como un fragmento de ADN inestable que contiene repeticiones de triplete (CTG)_n y que sufre expansión en los pacientes afectados por la enfermedad¹⁹. El número de repeticiones del triplete (CTG)_n es muy variable en la población normal, oscilando entre 5 y 27 repeticiones; los pacientes mínimamente afectados tienen al menos 50 repeticiones, mientras que los individuos más severamente afectados portan expansiones de dicha secuencia con cientos e incluso miles de repeticiones.

El triplete CTG no se encuentra en la región codificadora de ningún gen, sino que se localiza en el extremo 3' no traducido del ARNm de la proteína quinasa de la miotonina (MDPK). El gen MDPK contiene 15 exones que se extienden aproximadamente 13 kb, produciendo finalmente un polipéptido de 524 aminoácidos²⁰.

Con los datos aportados, es evidente la correlación existente entre el número de repeticiones y la gravedad de la enfermedad. Por otra parte, la inestabilidad del fragmento de ADN, capaz de sufrir expansión en generaciones sucesivas, sería una explicación plausible del fenómeno de la anticipación²¹. Una vez identificada la amplificación en el número de repeticiones CTG como la base genética de la DM, se ha realizado un gran esfuerzo para desentrañar cómo la expansión podría producir la enfermedad.

Carango et al²² han demostrado que en células en cultivo, la expansión del número de tripletes conduce a la ausencia del ARNm de la proteína MDPK.

El mecanismo molecular responsable de este hecho se desconoce, aunque se cree que un elevado número de repeticiones CTG en el extremo 3' del gen podría de algún modo producir una disminución en la tasa de síntesis o de procesamiento del ARNm correspondiente. Otros autores no descartan que la causa de la enfermedad pueda deberse a la sobreexpresión del gen MDPK, lo que se vería apoyado por la herencia dominante de la enfermedad.

Atrofia muscular espinobulbar

También conocida como enfermedad de Kennedy, la atrofia muscular espinobulbar es un trastorno de las motoneuronas con herencia ligada al cromosoma X. Se caracteriza por una debilidad muscular progresiva, atrofia y fasciculaciones de la musculatura proximal y bulbar por afectación de la motoneurona bulbar y espinal. En los varones afectados son habituales la ginecomastia y la fertilidad reducida, mientras que las mujeres portadoras no tienen síntoma alguno.

Estos datos, junto con los de la característica insensibilidad a los andrógenos de los pacientes con enfermedad de Kennedy, llevaron a un estudio detallado de la región del cromosoma X en la que previamente se había localizado el gen del receptor de andrógenos (AR), Xq11.

En los pacientes con SBMA, el número de repeticiones de un triplete CAG altamente polimórfico presente en el gen

AR, era aproximadamente el doble del valor encontrado en individuos no afectados²³; mientras que en éstos el número de repeticiones variaba entre 17 y 26, en los enfermos de SBMA alcanzaba valores entre 40 y 52.

Comparado con el síndrome del cromosoma X frágil y la distrofia miotónica, la inestabilidad del alelo enfermo con SBMA es mucho más limitada, puesto que no se han observado grandes expansiones de la repetición en generaciones sucesivas²⁴.

El triplete CAG se encuentra en este caso en el primer exón del gen AR, siendo traducido a una serie de glutaminas que corresponden al dominio de transactivación de la proteína AR, un factor de transcripción dependiente de ligando de la familia de los receptores esteroides^{25,26}. Puesto que esta región del AR no está implicada en la unión de la proteína al ADN, o a la hormona, la anomalía encontrada en el AR en pacientes SBMA, no daría lugar a un cambio en la unión de la proteína al ADN o a los andrógenos de suficiente entidad como para producir feminización testicular –como ocurre en otros síndromes originados por ausencia del receptor de andrógenos–. En cualquier caso, el incremento en el número de residuos de glutamina presentes en el AR en los pacientes afectados debe ser suficiente para alterar la función del receptor en las motoneuronas.

Estas repeticiones CAG se han identificado en otros loci regulados durante el desarrollo, tanto en *Drosophila*²⁷ como en el ratón²⁸, aunque su función se desconoce.

De todas formas, los dominios proteicos ricos en residuos de glutamina son importantes para la función de varios factores de transcripción, como Sp1, antennapedia y TFIID. Por lo tanto, el mayor número de residuos de glutamina en el AR en los enfermos de Kennedy podría producir una alteración en las interacciones del AR con otras proteínas de la maquinaria transcripcional, probablemente de modo específico en distintos tipos celulares, y este hecho podría ser el responsable de la patología de la enfermedad.

Atrofia dentatorrubropalidoluysiana

La atrofia dentatorrubropalidoluysiana (DRPLA) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante caracterizada por la degeneración combinada de las vías dantodofugales y rubrofugales.

Aunque este trastorno se ha descrito en muchas ocasiones en Japón, en Europa se han comunicado muy pocos casos, probablemente por confusión con la enfermedad de Huntington²⁹.

El cuadro clínico de la DRPLA muestra una combinación variable de mioclonía, epilepsia, ataxia cerebelosa, coreoatetosis y demencia.

Se ha encontrado que los pacientes afectados presentan la expansión del trinucleótido CAG en un gen situado en el brazo corto del cromosoma 12³⁰. El número de repeticiones varía entre 7 y 23 en los individuos normales, mientras que en los enfermos oscila entre 53 y 88.

Al igual que en otras enfermedades originadas por la expansión de tripletes repetidos, existe una buena correlación entre el tamaño de la repetición CAG y la edad de manifestación de la enfermedad³¹. Por otra parte, parece que el sexo del progenitor que transmite el alelo mutado tiene un efecto notable en el mecanismo de la anticipación.

Ataxia espinocerebelosa de tipo 1

Las ataxias espinocerebelosas hereditarias son trastornos neurológicos progresivos caracterizados por la degeneración del cerebelo, la médula y el tronco del encéfalo.

Las ataxias hereditarias se agrupan tradicionalmente en dos categorías en función de su herencia autosómica recesiva o dominante. La ataxia de Friedreich es un trastorno autosómico recesivo que se ha localizado en el cromosoma 9 en la región 9q13-q21³².

Las ataxias espinocerebelosas hereditarias son clínica y genéticamente heterogéneas³³. Desde el punto de vista clínico, los individuos afectados sufren ataxia y disartria severas, así como grados variables de neuropatía y trastornos motores. Los síntomas comienzan a manifestarse generalmente en la segunda década de vida, conduciendo a una discapacidad total –o a la muerte– en un período que puede prolongarse entre 10 y 20 años.

Se han identificado al menos cuatro formas genéticamente distintas de ataxia espinocerebelosa dominante, y los loci correspondientes se han localizado en tres cromosomas distintos: SCA1 en 6p22-p23³⁴⁻³⁶, SCA2 en 12q23-24.1^{37,38} y SCA3 y la enfermedad de Machado-Joseph en 14q24.3-q32³⁹. La enfermedad de Machado-Joseph se caracteriza clínicamente por una ataxia cerebelosa con signos piramidales y extrapiramidales, polineuropatía, oftalmoplejía externa progresiva, fasciculaciones en la cara y la lengua y ojos saltones. Clínicamente, el diagnóstico es difícil debido a la variedad fenotípica y al solapamiento con otras formas de ataxia dominante. En el caso de SCA1 se han clonado 1,2 Mb de la región 6p22-p23⁴⁰, y estudios subsiguientes con esta zona del ADN han llevado al descubrimiento de que la mutación responsable de la enfermedad es la expansión de un triplete CAG inestable⁴¹. En los individuos afectados el número de repeticiones varía entre 41 y 59, mientras que en la población normal estos valores son inferiores: 6-39⁴². Los varones afectados transmiten el gen SCA1 mutado a sus hijos con mayores incrementos en el número de repeticiones de lo que lo hacen las madres afectadas; por otra parte, la edad en la que la enfermedad se manifiesta se correlaciona de modo inverso con el número de repeticiones CAG^{43,44}.

La enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva con herencia dominante y penetrancia completa. Los síntomas comprenden anomalías motoras (con los arquetípicos movimientos coreicos) y deterioro intelectual a menudo acompañado de severas manifestaciones psiquiátricas –cambios de personalidad, pérdidas cognitivas y depresión severa–. La enfermedad comienza habitualmente en la cuarta o quinta década de vida, produciéndose un agravamiento progresivo que finalmente conduce a la muerte varios años más tarde.

En ocasiones, la EH ocurre en niños o adolescentes con manifestaciones mucho más severas y un curso más rápido. El desencadenamiento juvenil de la enfermedad y la tendencia a la anticipación se observan más frecuentemente cuando el transmisor del gen enfermo es el padre.

Los estudios neuropatológicos han demostrado que la muerte neuronal prematura es más marcada en los ganglios basales. Aunque a nivel bioquímico las causas de la muerte neuronal permanecen sin aclarar, a nivel celular se han explicado los síntomas de la enfermedad por la muerte selectiva de neuronas específicas⁴⁵.

La EH fue la primera enfermedad genética cuyo locus se localizó utilizando únicamente estudios de ligamiento a marcadores polimórficos del ADN⁴⁶. Estudios genéticos más detallados precisaron la localización cromosómica del gen a 4p16.3⁴⁷, y mediante la combinación de datos de desequilibrio de ligamiento con estudios de recombinación seleccio-

nados se delimitó una región de tan sólo 500 kb en esa zona del cromosoma^{48,49}.

Este fragmento se ha clonado en cromosomas artificiales de levadura y finalmente se ha identificado el gen de la enfermedad⁵⁰. El gen, llamado IT-15, se extiende 210 kb dando lugar a un ADNc de 10.366 bp con un marco de lectura abierto de 9.432 bp. El producto del gen es un polipéptido de 3.144 aminoácidos con un peso molecular estimado de 348 kD que se ha denominado huntingtina. Esta proteína se expresa en muchos tejidos aunque la muerte celular en la EH se restringe a neuronas específicas de regiones cerebrales muy concretas.

Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado la localización citoplasmática de la huntingtina en varios tipos celulares incluyendo las neuronas, aunque en éstas la proteína también está presente en el núcleo⁵¹.

A pesar de que se ha buscado insistentemente en bancos de datos de secuencias polipeptídicas, no se han podido encontrar similitudes significativas de ninguna proteína conocida con la huntingtina, lo que dificulta la asignación de una posible función a esta última.

En cuanto a la causa de la enfermedad en el ADN, se ha encontrado que en el extremo 5' del gen IT-15 existe un triplete CAG altamente polimórfico⁵⁰. Un estudio mundial de la mutación del HD con más de 1.000 pacientes ha mostrado que el número de repeticiones en los individuos enfermos oscila entre 36 y 121 (media, 44), mientras que en personas no afectadas varía entre 10 y 29 (media, 18)⁵². Una vez más se ha puesto de manifiesto la correlación entre la longitud de la secuencia amplificada y la edad de manifestación de la enfermedad^{50,53,54}.

Sin embargo, se ha clonado el homólogo murino del gen de Huntington, que muestra una similitud de más del 90% (a nivel de aminoácidos) con el producto del gen humano⁵⁵. La inactivación del gen de ratón, denominado Hdh, mediante disrupción génica dirigida en ratones transgénicos⁵⁶, ha permitido concluir que la huntingtina es una proteína crítica en el desarrollo embrionario temprano, puesto que los homocigotos Hdh⁻Hdh⁻ mueren en los primeros estadios del desarrollo, antes incluso de la formación del tubo neural. Dado que la inactivación completa de Hdh no origina un fenotipo similar al de la EH, parece más plausible un modelo de la enfermedad en el que la mutación origine una ganancia de función en la proteína mutada. Por lo tanto, la expansión de la secuencia del trinucleótido CAG en el extremo 5' del gen IT-15, con el consiguiente incremento en la longitud de la serie de residuos de glutamina en el extremo aminoterminal de la proteína, confiere a la huntingtina una nueva propiedad que finalmente origina la enfermedad. Nasir et al⁵⁷, en experimentos de inactivación génica similares a los descritos, pero dirigidos a una región distinta del gen Hdh, han encontrado también que la mutación en homocigosis es letal en los primeros estadios del desarrollo. Sin embargo, los heterocigotos mostraban en este caso trastornos cognitivos acusados, junto con un núcleo subtalámico de reducido tamaño. Estos son, sin duda, descubrimientos importantes, puesto que un modelo animal de la enfermedad tendría un valor incalculable para aportar datos sobre la patogenia molecular de la enfermedad y abriría las puertas a su futuro tratamiento.

Mutaciones fundadoras

Aunque no está inequívocamente establecido en todos los casos, las enfermedades descritas en este trabajo probablemente se han originado a partir de un número muy pequeño de mutaciones fundadoras (quizá tan sólo una). Si esto

fuese así, se habría producido una amplificación puntual primitiva, de tal forma que debido a la particular naturaleza de las expansiones de tripletes repetidos, el número de individuos afectados en la población iría aumentando a medida que se incrementase el número de generaciones.

En el caso de la SBMA, el número de repeticiones en los individuos afectados varía entre 40 y 52 en múltiples grupos étnicos. El hecho de que el margen del número de repeticiones asociado a la enfermedad sea muy estrecho, junto con otras características tales como los haplotipos de los cromosomas SBMA y la ausencia de nuevas mutaciones, sugieren que para esta enfermedad podría existir un único ancestro común. Sin embargo, la inusual variabilidad étnica del polimorfismo CAG en el gen AR en la población normal⁵⁸, así como estudios de ligamiento con diversos marcadores cercanos, aportan indicios en contra de dicha interpretación.

En la distrofia miotónica, las mutaciones están en completo desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo bialélico adyacente⁵⁹, lo que induce a pensar que una mutación primigenia que ocurrió quizá sólo una vez en la historia de la humanidad, es responsable del riesgo de sufrir expansiones ulteriores de esta secuencia preamplificada y, por lo tanto, de desarrollar la enfermedad.

En la EH, los estudios de desequilibrio de ligamiento indican la existencia de distintos haplotipos asociados con la enfermedad, aunque al menos la tercera parte de los cromosomas mutados podrían derivarse de un único ancestro⁴⁹. Por otra parte, en el caso de la EH no se ha podido demostrar la existencia de variaciones interétnicas significativas⁵².

Para el caso del síndrome del cromosoma X frágil, Oudet et al⁶⁰ han propuesto un esquema con no más de seis cromosomas fundadores. Éstos habrían podido tener un número de repeticiones CGG en el rango normal-alto, que por expansiones recurrentes en varios pasos habrían originado finalmente el síndrome.

Variabilidad en el número de repeticiones

Las enfermedades asociadas con expansiones en tripletes CAG (EH, SBMA, DRPLA y SCA1) muestran una variación en el número de repeticiones mucho menor que FRAX y DM, en las que se han detectado expansiones de varios cientos e incluso miles de repeticiones. En estas dos últimas enfermedades, el número de copias varía virtualmente en cada meiosis, esto es, la tasa de mutación alcanza el valor 1 tanto para el alelo mutado como para la premutación. En contraposición, la tasa de mutación en estos dos loci en los cromosomas de individuos no afectados no difiere de la de cualquier otra región similar del genoma. Esta es la razón más probable por la que no se han detectado nuevas mutaciones en cromosomas normales hasta la fecha.

Además, en individuos portadores de alelos premutados o con la mutación completa, la inestabilidad de la secuencia amplificada no es sólo meiótica, sino también mitótica^{9,10,20}. La inestabilidad mitótica produce variación somática (mosaicismo) y es más frecuente en individuos afectados que en los transmisores fenotípicamente normales.

Las mutaciones dinámicas como las referidas implican habitualmente un incremento en el número de repeticiones, aunque en algunas familias se han podido identificar mutaciones que llevaban a una reducción en el número de copias^{10,19,50,61}. Este hecho, si bien es inusual, es extremadamente interesante, puesto que sugiere la posibilidad de perder la mutación.

Por otra parte, la extrema inestabilidad de algunas de estas regiones mutadas hace su clonado en vectores práctica-

mente imposible¹¹, ya que por su propia naturaleza inducen deleciones que conducen a su desaparición. Este hecho debe considerarse cuando se trabaje con células o líneas celulares derivadas de pacientes o de individuos de riesgo.

Posición de los tripletes repetidos en los genes

Las consecuencias habitualmente fatales de las enfermedades descritas demuestran sin duda el potencial efecto deletéreo de las repeticiones inestables de trinucleótidos. Parece, por tanto, lógico inferir que la presencia y el mantenimiento de estas secuencias en el genoma han de tener alguna significación funcional. En las regiones codificadoras las repeticiones podrían ser necesarias si la proteína correspondiente requiriese algún tipo de homopolímero para su función. Sin embargo, debido a la inestabilidad de las repeticiones de tripletes, parece lógico pensar que se verían favorecidas las mutaciones tendentes a eliminar la naturaleza repetitiva de la secuencia, pero que mantuviesen la misma capacidad de codificar el homopolímero necesario.

La presencia de secuencias repetitivas en zonas no traducidas –y putativamente reguladoras– sugiere otra restricción funcional capaz de inducir al mantenimiento de las repeticiones en el genoma.

Sin embargo, cuando los tripletes repetidos son no codificadores, se permiten mayores expansiones de la secuencia (como ocurre en FRAX y DM), mientras que si la repetición se localiza en una región codificadora, ampliaciones muy grandes conducirían a una proteína completamente anormal, incompatible con la vida. Esta afirmación podría explicar el limitado número de repeticiones observado en la enfermedad de Kennedy y en la EH y podría sugerir un papel esencial en alguna función o en el desarrollo del organismo para las correspondientes proteínas codificadas por esos genes, lo que en el caso de la enfermedad de Huntington ha quedado demostrado mediante los experimentos de *knock-out* en ratones transgénicos^{56,57}.

Mecanismo de la expansión de tripletes

Todavía no se comprende totalmente el mecanismo subyacente a estas ampliaciones, aunque se han propuesto diversas hipótesis.

Algunos genes (p. ej., el de resistencia múltiple a fármacos [MDR] o el de la dihidrofolato reductasa) sufren ampliaciones de varios millares de veces a partir de secuencias de copia única. Sin embargo, es difícil comprender cómo podría tener lugar la ampliación específica de una secuencia repetida, ya que las secuencias inmediatamente adyacentes a ésta no son amplificadas y, por otra parte, la ampliación de tripletes ocurre únicamente en el locus del gen correspondiente, y no en otros loci.

El intercambio desigual de cromátidas hermanas durante los sobrecruzamientos meióticos puede seguramente descartarse como mecanismo inicial, ya que los marcadores que flanquean las secuencias repetidas no presentan recombinación¹⁹. Es además difícil considerar un fenómeno de recombinación que pueda expandir las repeticiones de tripletes 20 o 50 veces en una sola generación.

El modelo más ampliamente aceptado se fundamenta en la dificultad de la replicación en secuencias ricas en guanina y citosina. Este modelo de deslizamiento en los emparejamientos durante la replicación del ADN, se basa en la desigual tasa de síntesis de ADN en regiones ricas en G + C, y su consecuencia inmediata es la existencia de múltiples cadenas de hebra sencilla de secuencias complementarias. El intercambio de hebras durante la replicación entre múltiples

hebras adelantadas y retrasadas, estaría seguido de la resolución de los extremos libres por un mecanismo de reparación de errores. Este modelo predice que las secuencias con repeticiones de mayor longitud serían más susceptibles de generar cadenas incompletas (y, por lo tanto, mayor cantidad de extremos libres), por lo que en una única replicación podrían sufrir ampliaciones mayores explicando la mayor tasa de mutación observada en las secuencias con un elevado número de repeticiones.

Los experimentos *in vitro* con oligonucleótidos sintéticos (CGG)₁₇ o (CAG)₁₇ han demostrado que éstos pueden amplificarse en ausencia de ADN patrón, tanto en una reacción de RCP con Taq ADN polimerasa como con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I a 37 °C⁶².

No se han encontrado diferencias en las secuencias que flanquean las mutaciones entre individuos afectados y normales, por lo que no existe evidencia experimental alguna que sugiera la implicación de dichas secuencias en el mecanismo mutacional. En consecuencia, la inestabilidad de la secuencia mutada vendría dada por la propia secuencia y su naturaleza repetitiva.

Los alelos normales –con un número reducido de repeticiones– podrían no ser susceptibles al mecanismo señalado anteriormente, pero una vez que el número de repeticiones se hubiera incrementado por encima de un valor crítico, se verían favorecidas las ampliaciones subsiguientes. Las mutaciones fundadoras aparecerían muy raramente, tanto por un incremento inusual en el número de copias de una secuencia con una repetición perfecta, como por una mutación en la secuencia de separación de una repetición en tándem que daría lugar a una repetición perfecta de longitud inestable.

Como posible mecanismo para limitar la mutabilidad de las secuencias repetidas en tándem, éstas suelen encontrarse interrumpidas por una imperfección en la repetición. Esta observación podría suponer un soporte adicional para la teoría de mutación previamente expuesta.

Diagnóstico y perspectivas de tratamiento

La secuenciación directa del producto amplificado es sin duda la mejor forma para determinar el número de repeticiones en la región mutada, aunque no puede aplicarse cuando el número de repeticiones implica a más de 300-350 pb.

Sin duda alguna, en la mayoría de las ocasiones, los métodos diagnósticos basados en la RCP son los mejores para las enfermedades que implican la ampliación de secuencias de tripletes repetidos.

Se han desarrollado diversos tests basados en la RCP, algunos de los cuales podrían ser usados en el diagnóstico clínico.

Básicamente, se eligen cebadores de secuencias de ADN genómico que flanquean la región mutada y se lleva a cabo la reacción de RCP en presencia de (α -³²P)dCTP. Los productos se separan en un gel desnaturizante de poliacrilamida y se calcula el tamaño de los alelos utilizando una escalera de secuenciación como estándar. Debido al elevado porcentaje de G + C en la región ampliada, se necesitan condiciones especiales de RCP, generalmente incluyendo un 10% de dimetilsulfóxido y hasta un 75% de 7-deazadGTP. En cualquier caso, cuando la expansión es de varios cientos o incluso miles de nucleótidos, no se puede obtener producto alguno tras la reacción de RCP. En estos casos, es necesario llevar a cabo análisis mediante Southern blot, a pesar de que la estimación del tamaño del alelo expandido no puede hacerse con gran precisión con esta técnica. Sin

embargo, se han descrito sistemas de RCP en los que mediante la adición de un 100% de 7-deaza-dGTP en la reacción de RCP, seguida de la detección con sondas de oligodeoxirribonucleótidos sintéticos específicos, se consiguen detectar ampliificaciones de tripletes CGG de varias kb⁶³.

Los rápidos avances en los protocolos de RCP, junto con la aplicación de técnicas no isotópicas para el marcaje y la detección eficiente de productos específicos de RCP, permitirán sin duda resolver la problemática amplificación de las secuencias ricas en GC de mayor longitud, y en un futuro cercano estarán disponibles equipos de diagnóstico rápidos y de fácil aplicación para su uso clínico rutinario.

El análisis molecular de la longitud de las repeticiones es una forma precisa y eficiente de identificar la mutación y confirmar un diagnóstico clínico, lo que sería de un valor incalculable en el diagnóstico de individuos con síntomas equívocos.

Tanto para la EH, como para la distrofia miotónica y el síndrome del cromosoma X frágil, se ha encontrado una estrecha correlación entre la longitud de las repeticiones y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, el análisis molecular no debería utilizarse como único indicador de la gravedad, a pesar de que tomado en consideración junto a datos clínicos, podría ser útil para el diseño de una estrategia adecuada de evaluación y seguimiento de la enfermedad en cada paciente. En cualquier caso, se necesitan estudios más profundos antes de que el tamaño de la región de tripletes repetidos pueda utilizarse para aportar información pronóstica en individuos de riesgo.

Conclusiones

La expansión de tripletes repetidos se ha revelado como el defecto genético subyacente en varias enfermedades neurológicas hereditarias. Una vez más, la tecnología del ADN recombinante ha demostrado su inestimable valor en el descubrimiento de los defectos genéticos que originan estas enfermedades fatales.

Desde el punto de vista del diagnóstico clínico, el descubrimiento de los defectos en el ADN que originan estas enfermedades, ha sido un paso importantísimo en el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas basadas en la tecnología del ADN recombinante; estos tests pueden aplicarse al diagnóstico clínico sin la necesidad de llevar a cabo complejos estudios de ligamiento genético.

En este momento se necesita un esfuerzo coordinado para desentrañar el fundamento bioquímico de la muerte neuronal selectiva que finalmente da lugar a los síntomas clínicos observados.

En cualquier caso, el análisis detallado tanto de los genes que contienen la mutación, como de las proteínas que codifican, abrirá sin duda prometedoras perspectivas para el desarrollo de modelos animales y de futuros protocolos de tratamiento, incluyendo la terapia génica, para estas enfermedades para las que hasta la fecha no existe tratamiento alguno eficiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Richards RI, Sutherland GR. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell* 1992; 70: 709-712.
- Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* 1984; 48: 21-37.
- Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenins V, Howard-Peebles PN, Nielsen KB et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 69: 3.289-3.299.
- Ying-Hui F, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1.047-1.058.
- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.
- Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, Fenwick RG, Nelson D. Triple repeat mutations in human disease. *Science* 1992; 256: 784-789.
- Pieretti M, Zhang F, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66: 817-822.
- Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 1994; 271: 536-542.
- Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1.097-1.102.
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E et al. Fragile X syndrome genotype characterised by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252: 1.179-1.181.
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E et al. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p (CGG)_n. *Science* 1991; 252: 1.711-1.714.
- Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutations is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet* 1992; 29: 794-801.
- Smits A, Smeets D, Hamel B, Dreesen J, Van Oost B. High prevalence of the Fra (X) syndrome cannot be explained by a high mutation rate. *Am J Med Genet* 1992; 43: 345-352.
- Yu S, Mullery J, Loesch D, Turner G, Donnelly A, Gedeon A et al. Fragile-X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 968-980.
- Brook D, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; 68: 799-808.
- Aslanidis C, Jansen G, Amemiya C, Shuttler G, Mahadevan M, Tsifidias C et al. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature (Lond)* 1992; 355: 548-549.
- Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Van Tongeren T, Aslanidis C et al. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individual with myotonic dystrophy. *Nature (Lond)* 1992; 355: 547-548.
- Mahadevan M, Tsifidias C, Sabourin L, Shuttler G, Amemiya C, Jansen G et al. Myotonic Dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992; 255: 1.253-1.254.
- Fu Y-H, Pizzuti A, Fenwick RG, King J Jr, Rajnarayan S, Dunne PW et al. An unstable triple repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992; 255: 1.256-1.259.
- Shaw DJ, McCurrach M, Rundle SA, Harley HG, Crow SR, Sohn R et al. Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus. *Genomics* 1993; 18: 673-679.
- Hunter A, Tsifidias C, Mettler G, Jacob P, Mahadevan M, Surh L, Korneluk RH. The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J Med Genet* 1992; 29: 774-779.
- Carango P, Noble JE, Marks HG, Funanage VL. Absence of myotonic dystrophy protein kinase (MDPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* 1993; 18: 340-348.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fishbeck H. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and muscular atrophy. *Nature (Lond)* 1991; 352: 77-79.
- Biancalana V, Serville F, Pommier J, Julien J, Hanauer A, Mandel JL. Moderate instability of the trinucleotide repeat in spino-bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 255-258.
- Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; 56: 335-344.
- Evans RM. The steroid ant thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
- Wharton KA, Yedvobnick B, Finnerty VG, Artavanis-Tsakonas S. opa: a novel family of transcribed repeats shared by the notch locus and other developmentally regulated loci in *D melanogaster*. *Cell* 1985; 40: 55-62.
- Duboule D, Haemlin M, Galliot B, Mohier E. DNA sequences homologous to the *Drosophila* opa repeat are present in murine messenger RNA species that are differentially expressed in fetuses and adult tissues. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2.003-2.006.
- Warner TT, Lennox CG, Janota Y, Harding AE. Autosomal dominant dentatorubro-pallidolusian in the United Kingdom. *Mov Disord* 1994; 9: 289-296.
- Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, Shirayama T, Ohsaki E, Bundo M. Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nat Genet* 1994; 6: 14-18.
- Komure O, Sano A, Nishino N, Yamauchi N, Heno S, Kondoh K et al. DNA analysis in hereditary dentatorubro-pallidolusian atrophy: correlation between CAG repeat length and phenotypic variation and the molecular basis of anticipation. *Neurology* 1995; 45: 143-149.
- Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat Genet* 1994; 6: 9-13.
- Hanauer A, Chery M, Fujita R, Driessel AJ, Gilgenkrantz S, Mandel JL.

- The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 133-137.
34. Rosenberg RN. Autosomal dominant cerebellar phenotypes: the genotype has settled the issue. *Neurology* 1995 45: 1-5.
 35. Ranum LPW, Duvick L, Rich SS, Schut LJ, Litt M, Orr HT. Localisation of the autosomal dominant HLA-linked spinocerebellar ataxia (SCA1) locus, in two kindreds, within an 8-cM subregion of chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 31-41.
 36. Zoghbi HY, Jodice C, Sandkuij LA, Kwiatkoeski TJ Jr, McCall AE, Huntoon SA et al. The gene for autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA1) maps telomeric to the HLA complex and is closely linked to the D6S89 locus in three large kindreds. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 23-30.
 37. Carson WJ, Radvany J, Farrer LA, Vincent D, Rosenberg RN, MacLeod PM et al. The Machado-Joseph disease locus is different from the spinocerebellar ataxia locus (SCA1). *Genomics* 1992; 13: 852-855.
 38. Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L et al. Chromosomal assignment of a second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. *Nat Genet* 1993; 4: 295-299.
 39. Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamo H, Harube Y et al. The gene for Machado-Joseph disease is mapped to human chromosome 14q. *Nat Genet* 1993; 4: 300-304.
 40. Banfi S. Mapping and cloning of the critical region for the spinocerebellar ataxia type 1 gene (SCA1) in a YAC contig spanning 1.2 Mb. *Genomics* 1993; 18: 627-635.
 41. Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Servadio A, Baudet AL et al. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 1993; 4: 221-226.
 42. Matilla T, Volpini V, Genis D, Rosell J, Corral J, Davalos A et al. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 123-2.128.
 43. Dubourg O, Durr A, Cancel G, Stevanin G, Chnweiss H, Penet C et al. Analysis of the SCA1 CAG repeat in a large number of families with dominant ataxia. Clinical and molecular correlations. *Ann Neurol* 1995; 37: 176-180.
 44. Genis D, Matilla T, Valpini V, Rosell J, Davalos A, Ferrer Y et al. Clinical, neuropathologic, and genetic studies of a large spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) kindred: (CAG)*n* expansion and early premonitory signs and symptoms. *Neurology* 1995; 45: 24-30.
 45. Goodfellow PN. Planting alfalfa and cloning the Huntington's disease gene. *Cell* 1993; 72: 817-818.
 46. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature (Lond)* 1983; 306: 234-238.
 47. MacDonald ME, Anderson MA, Gilliam TC, Tranejaerg L, Carpenter NU, Magenis E et al. A somatic cell hybrid panel for localizing DNA segments near the Huntington's disease gene. *Genomics* 1987; 1: 29-34.
 48. MacDonald ME, Lin C, Srinidhi L, Bates G, Altherr M, Whaley WL et al. Complex patterns of linkage disequilibrium in the Huntington disease region. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 723-734.
 49. MacDonald ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G et al. Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nat Genet* 1992; 1: 99-103.
 50. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-983.
 51. Hoogeveen AT, Willemsen R, De Rooij KE, Roos RA, Van Omman GJ, Galjaard H. Characterisation and localisation of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2.069-2.073.
 52. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilman J, Telenius H, Zeisler J et al. A worldwide study of Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 1994; 330: 1.401-1.406.
 53. Norremole A, Riess O, Epplen JT, Fenger K, Hasholt L, Sorensen SA. Trinucleotide repeat elongation in the huntingtin gene in Huntington disease patients from 71 Danish families. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1.475-1.476.
 54. Rubinsztein DC, Barton DE, Davison BC, Ferguson-Smith MA. Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1.713-1.715.
 55. Lin B, Nasir J, MacDonald H, Hutchinson G, Graham RK, Rommens JM, Hayden MR. Sequence of the murine Huntington disease gene: evidence for conservation and polymorphism in a triplet (CCG) repeat alternate splicing. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 85-92.
 56. Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM et al. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 1995; 269: 407-410.
 57. Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J et al. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 1995; 81: 811-817.
 58. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Charkraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-243.
 59. Harley HG, Brook JD, Rundle SA, Crow S, Reardo W, Buckler AJ et al. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature (Lond)* 1992; 355: 545-546.
 60. Oudet C, Mornet E, Serre JL, Thomas L, Lentès-Zengerling S, Kretz C et al. Linkage disequilibrium between the fragile X mutation and two closely linked CA repeats suggests that fragile X chromosomes are derived from a small number of founder chromosomes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 297-304.
 61. Bruner HG, Jansen G, Nillesen W, Nelen MR, DeDie CEM, Howeller CJ et al. Reverse mutation in myotonic dystrophy. *N Engl J Med* 1993; 328: 476-480.
 62. Behn-Krappa A, Doerfler W. Enzymatic amplification of synthetic oligodeoxyribonucleotides: implications for triplet repeat expansions in the human genome. *Hum Mutat* 1994; 3: 19-24.
 63. Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown T. Detection of full fragile X mutation. *Lancet* 1992; 339: 271-274.