



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



Trabajo Final de Graduación

Práctica Dirigida para optar por la Licenciatura de Genética Humana

**“Búsqueda de modificadores genéticos en una enfermedad  
causada por mutaciones inestables:  
Distrofia miotónica tipo 1”**

Adriana Ma. Guillén Zúñiga

**Comité:**

**Tutor:** Dr. Fernando Morales Montero

**Lectora :** Dra. Patricia Cuenca Berger

**Lectora:** M.Sc. Melissa Vásquez Cerdas

**Lectora:** M. Sc. Henriette Raventós Vorst

## **DEDICATORIA**

**A mis padres, hermanos  
Y a mi familia,  
por ser la mayor motivación que Dios me haya dado...**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Morales por su apoyo, su confianza y por enseñarme que para lograr ser una buena profesional se requiere exigencia y empeño.

A la Dra Patricia Cuenca por haberme dado la oportunidad de integrarme al equipo de trabajo del laboratorio y por ser más que una jefe una buena amiga.

A la M.Sc. Melissa Vásquez, por haber confiado en mi trabajo desde que me integré al laboratorio, gracias por haberme transmitido toda su experiencia, por sus buenos consejos y por estar siempre pendiente del desarrollo de esta práctica. Y principalmente por haberme brindado su amistad.

A la M.Sc. Henriette Raventós por sus comentarios y aportes para la realización de esta práctica, y por haber aumentado mi interés en el área de neurociencias.

Al Dr. Domingo Campos por todo su apoyo, por su paciencia al enseñarme a utilizar los programas estadísticos para el análisis de los resultados; y por todos sus consejos.

A Don William Araya por su disposición y apoyo en el laboratorio, y porque además de ser un gran compañero es un gran amigo!!

A Eyleen Corrales por su apoyo en el laboratorio, sus ideas, consejos, su paciencia al escucharme durante todo este proceso, y por su impulso para lograr el balance en el diario vivir.

A todos mis compañeros y compañeras del laboratorio porque han hecho de este camino una de las mejores experiencias de mi vida, y porque aparte de ser compañeros se han convertido en otra familia para mí.

A mis amigos: Laura García, Vicky Sánchez, Alejandra Mora, Wendy Malespín, Nela Quesada, David Castillo y Marco Díaz, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada paso que he dado a lo largo de mi carrera.

Al personal administrativo del INISA, al Dr. Jaime Fornaguera y a la Srta. Melissa Rivera del Programa de Neurociencias, quienes directa o indirectamente permitieron que yo realizara la práctica en el laboratorio de forma satisfactoria.

A mi familia, porque siempre han confiado en las decisiones que he tomado, por su amor y su apoyo incondicional.

Y a Dios porque sin duda ha permitido que todos mis anhelos se estén cumpliendo, y es la fortaleza de mi vida.

## APROBACIÓN DEL COMITÉ ASESOR

---

Dr. Fernando Morales Montero  
Tutor

---

Dra. Patricia Cuenca Berger  
Lectora

---

M. Sc. Melissa Vásquez Cerdas  
Lectora

---

M. Sc. Henriette Raventós Vorst  
Lectora

---

Dr. Erick Fuchs Castillo  
Lector externo

---

Dra. Virginia Solís  
Decana Facultad de Ciencias

---

Sustentante:  
Adriana Ma. Guillén Zúñiga

Escuela de Biología, UCR  
2009

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Hoja de aprobación Comité Asesor	IV
Índice General	V
Resumen	VI
Lista de cuadros	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de abreviaciones	X
Introducción	1
Justificación	16
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Materiales y métodos	19
Limitaciones	28
Resultados y discusión	29
Conclusiones y recomendaciones	40
Bibliografía	41
Apéndice	51

## RESUMEN

**Palabras clave:** MMR, mutaciones inestables, DM, microsatélites, polimorfismos, tamaño del alelo progenitor, variación somática, edad de inicio de la enfermedad.

La participación del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) en la inestabilidad microsatelítica (MSI), ha generado interés en el análisis de su contribución en la inestabilidad de trinucleótidos repetidos en enfermedades neurodegenerativas, como la distrofia miotónica tipo I (DM1) y enfermedad de Huntington (HD).

La implicación del sistema MMR en enfermedades causadas por expansiones de nucleótidos, ha sido estudiada ampliamente en modelos de ratones transgénicos de HD y DM1, donde hay datos que involucran a genes de este sistema con el mecanismo de expansión y se ha especulado que en humanos los polimorfismos en esos genes, son excelentes candidatos genéticos *trans*-modificadores tanto de la inestabilidad somática como germinal.

En este sentido, esta práctica dirigida se enfocó en la búsqueda de modificadores genéticos que pudieran estar involucrados en el mecanismo de expansión de tripletas inestables. Este análisis constituye el primer estudio que se realiza en el país para analizar si existe asociación entre polimorfismos en los genes de reparación y la variación residual de la edad de inicio de la enfermedad y la variación residual de la variación somática en los pacientes afectados por DM1.

Con ese propósito, se analizaron tres polimorfismos de dos genes del sistema MMR: el rs1805321:C>T y el rs2228006:A>G en el gen *PMS2* y el rs1382543:G>A en el gen *MSH3* en muestras de 148 pacientes con DM1 originarios de Costa Rica, Texas, Escocia y Uruguay. Se calcularon las frecuencias alélicas de cada polimorfismo, las cuales resultaron ser muy similares a las reportadas para la población mundial.

Los análisis de los datos revelaron que la variante rs2228006:A>G no está en equilibrio Hardy- Weinberg (HWE) para la muestra de Costa Rica, Texas y Escocia. Se realizaron análisis de regresión lineal para la obtención de los residuos de la variación somática y su posterior asociación con los SNPs mencionados. Al depurar la base de datos para tener resultados estadísticos más robustos sólo el polimorfismo rs2228006:A>G

mostró una tendencia significativa a contribuir con la variación somática residual- que se ha visto contribuye con la edad de inicio y progresión de la enfermedad-por lo que podría estar actuando como un modificador genético en la distrofia miotónica tipo 1. Por eso se recomienda aumentar la muestra de análisis de pacientes con DM, evaluar otros polimorfismos en el gen *PMS2* y otros genes del MMR para comprobar que efectivamente podrían estar actuando como *trans* modificadores en enfermedades causadas por mutaciones inestables.

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Resumen de condiciones óptimas para el análisis molecular de los 3 polimorfismos	20
<b>Cuadro 2.</b> Frecuencias alélicas de 3 polimorfismos del sistema de reparación MMR, de pacientes con distrofia miotónica tipo I según el país de origen.	30
<b>Cuadro 3.</b> Frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados, en una muestra de la población mundial (Adaptado del NCBI).	31
<b>Cuadro 4.</b> Resumen del análisis de correlación entre PAL, AatS, SV y AofO por país y para la muestra agregada.	34

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de los principales componentes del sistema de reparación de apareamientos erróneos.	12
<b>Figura 2.</b> Gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Análisis de restricción con <i>Bgl</i> II del polimorfismo rs1805321:C>T	22
<b>Figura 3.</b> Gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio, para visualizar la amplificación de la PCR alelo específico del polimorfismo rs2228006:A>G	24
<b>Figura 4.</b> Gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Análisis de restricción con <i>Sat</i> I del polimorfismo rs1382543:G>A	26
<b>Figura 5.</b> Correlación entre tamaño del alelo progenitor y la edad de inicio de la enfermedad, para el caso de Costa Rica.	35
<b>Figura 6.</b> Modelo que explica el aporte de las diferentes variables sobre la edad de inicio de la distrofia miotónica tipo 1, en la submuestra costarricense.	36
<b>Figura 7.</b> Modelo que explica el aporte del tamaño del alelo progenitor y los residuos de la variación somática sobre la edad de inicio de la distrofia miotónica tipo 1 en la submuestra costarricense.	37

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>MMR</b>	Sistema de reparación de apareamientos erróneos
<b>DM1</b>	Distrofia Miotónica tipo 1
<b>HD</b>	Enfermedad de Huntington
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismo de un solo nucleótido
<b>3'UTR</b>	Región 3' no codificante de un gen
<b>5'UTR</b>	Región 5' no codificante de un gen
<b>ADN</b>	Àcido desoxirribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CTG</b>	Citosina, timina, guanina
<b>CAG</b>	Citosina, adenina, guanina
<b>IDLs</b>	Asas de inserción/delección
<b>HNPCC</b>	Carcinoma colorectal hereditario no poliposo
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Iones magnesio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>BrEt</b>	Bromuro de Etidio
<b>PAL</b>	Tamaño del alelo progenitor
<b>SV/VS</b>	Variación somática
<b>AofO</b>	Edad de inicio del trastorno
<b>AatS</b>	Edad de toma de muestra
<b>CR</b>	Costa Rica
<b>TX</b>	Texas-USA
<b>URU</b>	Uruguay
<b>SCO</b>	Escocia

## INTRODUCCIÓN

En los seres humanos, como en los demás eucariotas, el ADN presenta una organización sumamente compleja. Dentro de esa organización se distingue aproximadamente un 3% del ADN que codifica para proteínas y que es altamente conservado; un porcentaje significativo corresponde a heterocromatina constitutiva no codificante y cerca de 45-50% a secuencias repetitivas de ADN (Bickmore 2001, Kass & Batzer 2004, Strachan & Read 2004). Las secuencias codificantes usualmente pertenecen a familias de secuencias relacionadas que se organizan en grupos dentro de un cromosoma o bien se encuentran dispersas en varios cromosomas. Estas secuencias duplicadas han surgido mediante mecanismos de duplicación de genes a lo largo de la evolución, y han generado la aparición de otras secuencias sin función conocida que incluyen pseudogenes y fragmentos de genes. Por otra parte, las regiones no codificantes para proteínas, que abarcan gran parte del genoma, se organizan en tándem o bien actúan como regiones interespaciadoras (Strachan & Read 2004).

Las regiones del ADN altamente repetitivas se presentan en arreglos o bloques de repeticiones en tándem de una secuencia que puede ir desde uno a cientos de nucleótidos (Strachan & Read 2004). Esta categoría de ADN repetitivo comprende cerca del 45% del genoma (Lander *et al.* 2001) e incluye secuencias repetidas en tándem como los micro- y minisatélites y los retroelementos, que comprenden regiones de menos de 350 pares de bases (pb) hasta más de 1000pb (como en el cromosoma Y), regiones de hasta más de 1000 pares de bases y secuencias de hasta 300 nucleótidos respectivamente. Dichas secuencias son muy útiles para investigar aspectos relacionados a la historia de la población, la estructura de la misma, eventos como la migración y flujo génico, entre otros fenómenos, esto debido a las altas tasas de mutación que tienen asociadas (Rubicz *et al.* 2007: Crawford 2007).

Una de esas secuencias repetidas y dispersas en todo el genoma, son los minisatélites (VNTRs- por sus siglas en inglés). Éstos se caracterizan por ser polimorfismos de repeticiones en tándem de número variable, que consisten en unidades de repeticiones que pueden ir desde las 10 a 100 pares de bases y juntas alcanzar un tamaño de hasta 1000 pb. Son regiones ricas en bases G-C, con una tasa de mutación de  $10^{-2}$  a  $10^{-1}$  por locus por

generación. También se caracterizan por exhibir una alta variación tanto a nivel de secuencia como en el número de repeticiones entre individuos, por lo que son muy útiles en estudios forenses (Rubicz *et al.* 2007: Crawford 2007).

Otra de las secuencias repetidas y dispersas en todo el genoma son los microsatélites (STRs-por sus siglas en inglés). Estos se caracterizan por ser repeticiones en tándem de motivos cortos de ADN, que pueden ir de 1 a 6 pares de bases (ejemplo: CA-, CAT-, CCG-, CAG-). Los microsatélites están presentes aproximadamente cada 6 a 10 kilobases, los cuales, por su propia naturaleza y estructura, pueden volverse muy inestables (Rubicz *et al.* 2007: Crawford 2007). La tasa de mutación entre los STRs es variable, debido particularmente al tamaño y composición de la unidad repetitiva y al número de repeticiones. Así, alelos con un gran número de repeticiones tienden a mutar más rápido que aquellos alelos que presentan un número reducido, lo que podría causar que lleguen a ser muy inestables hasta que alcanzan un umbral, a partir del cual se podrían manifestar distintas enfermedades (Rubicz *et al.* 2007: Crawford 2007).

Se considera que los microsatélites están involucrados en diferentes procesos celulares entre los que se encuentran: la organización de la cromatina, ya que algunas secuencias microsateliticas se encuentran flanqueando los centrómeros, lo que sugiere una función en la cohesión de las cromátidas hermanas o bien en la formación y funcionamiento del cinetocoro (Fernández 2004).

También se encuentran implicados en la regulación de la actividad génica y la regulación de procesos metabólicos del ADN tales como la duplicación, la recombinación, el control del ciclo celular y el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR por sus siglas en inglés). Se ha demostrado que los microsatélites pueden interferir en el proceso de duplicación del ADN para lo cual varios investigadores han propuesto que los microsatélites podrían ser puntos calientes de recombinación; de forma que el tipo de secuencia repetida y el número de repeticiones pueden afectar este proceso. Los microsatélites también podrían afectar a las enzimas responsables del control celular, puesto que algunos de estos genes contienen pequeñas secuencias repetidas, que si varían en número, podrían codificar para productos truncados, lo que implicaría una pérdida de función de la proteína (Fernández 2004).

En cuanto a su efecto en la regulación génica, hay muchas evidencias de que los microsatélites localizados en las regiones promotoras y en intrones podrían afectar a la transcripción actuando como secuencias reguladoras (Fernández 2004) Por lo anterior, es que desde hace mucho tiempo, estos procesos han sido blanco de investigación relacionándola con la inestabilidad del ADN asociada principalmente con el desarrollo del cáncer (Alazzouzi 2006, Fernández 2004).

La inestabilidad del ADN, que empezó a estudiarse en la década de 1980 en *Saccharomyces cerevisiae*, se puede dividir en dos clases de acuerdo al tipo de evento estimulado: la inestabilidad cromosómica (CIN) y la inestabilidad micro- y minisatelítica (MSI y MIN, respectivamente) (Aguilera & Gómez 2008).

La inestabilidad de los microsatélites (MSI), identificada por primera vez en 1991 cuando se descubrió la mutación inestable en FRAXA, e identificada en 1993 mediante análisis de ligamiento en familias con cáncer colorrectal hereditario no polipósico o HNPCC (Boland *et al.* 1998); es un fenómeno caracterizado por la pérdida o ganancia de unidades repetidas dentro de las secuencias repetitivas cortas del genoma (STRs). Estos microsatélites tienden a formar bucles o asas de ADN (de pocas unidades repetidas) durante la duplicación del ADN o por eventos post-replicativos, que si no se reparan conllevan a la aparición de inserciones/deleciones (IDLS) dentro de las mismas secuencias (Alazzouzi 2006).

Por lo tanto, la así llamada inestabilidad microsatelítica, es el resultado de un mal funcionamiento o de una inactivación del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR por sus siglas en inglés) -encargado de corregir esas asas de ADN que se producen durante o después de la replicación- que no corrige los “loops” de inserción/ deleción que pueden ocurrir por el deslizamiento de la polimerasa (“slippage”), provocando así la ganancia o pérdida de unidades repetidas dentro del microsatélite. (Aguilera & Gómez 2008, McMurray 2008). Por tanto, la inestabilidad en ciertos microsatélites puede ser utilizada como un indicador de inestabilidad genómica provocada por defectos en el MMR (Harfe & Jinks-Robertson 2000). La inactivación del sistema MMR puede deberse tanto a mutaciones en los genes MMR como a silenciamiento epigenético de los genes *hMLH1* y *hMSH2* a través de la metilación de su promotor (Aquilina & Bignami 2001, Morak *et al.* 2008).

Varios estudios sugieren que la pérdida de MMR es un suceso temprano en el desarrollo tumoral en pacientes con cáncer colorectal hereditario no poliposo (HNPCC). El HNPCC se ha asociado con mutaciones germinales en las proteínas MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 y PMS2 del sistema MMR; siendo las más frecuentes las que afectan los genes MLH1 y MSH2. A partir de esto se ha logrado establecer que la inestabilidad genómica, detectada mediante MSI, es frecuente en ciertos tipos de cáncer, entre los que sobresale el HNPCC -donde se observa en más del 80% de los casos; cáncer colorrectal esporádico y cáncer gástrico en alrededor del 10-15% de los casos (Alazzouzi 2006).

Aunque la inestabilidad de los microsatélites se ha relacionado con defectos en el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR), existen indicios de la implicación de otros factores tales como la fidelidad de las polimerasas durante la duplicación de ADN y la inestabilidad propia de las secuencias repetitivas (Alazzouzi 2006).

Por otro lado, en 1991 se describió la base genética de una serie de enfermedades genéticas hereditarias asociadas con inestabilidad microsatelítica, en donde los pacientes afectados o portadores presentaban un incremento en el número de repeticiones de secuencias de ADN en comparación con las personas sanas. Estas regiones son altamente polimórficas y estables en la población general, sin embargo, a partir de un número de repeticiones la secuencia tiende a la inestabilidad, tanto en la línea germinal como somática. Estas repeticiones de ADN parecen estar predisuestas a la expansión porque tienen características estructurales inusuales que irrumpen en la duplicación celular, la maquinaria de reparación y recombinación (Mirkin 2007, Fernández 2004).

Al presente, estas mutaciones dinámicas están implicadas en cerca de 15 enfermedades hereditarias, entre las que se encuentran: la enfermedad de Huntington (HD), la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2), el síndrome del cromosoma X frágil (FRAXA), las cuales son causadas por la expansión de trinucleótidos inestables CAG, CTG/ CCTG o CGG, respectivamente, además de un grupo de ataxias espino cerebelosas (SCAs). El efecto de estas repeticiones expandidas en sus genes respectivos es variable, ya que pueden provocar la síntesis de un producto proteico con una ganancia de función, alteraciones en el metabolismo del ARN o inactivación génica, lo cual lleva a defectos en

las funciones neurológicas del organismo (Cuenca & Morales 1999, Mirkin 2007, Rao 2007).

Una de estas enfermedades es la DM tipo 1, también conocida como enfermedad de Steinert. La DM1 es una enfermedad neuromuscular degenerativa, progresiva, multisistémica, con manifestaciones en músculo, cerebro, corazón, ojos, tracto gastrointestinal, glándulas endocrinas y esqueleto. Su base genética es una expansión del trinucleótido inestable CTG que se localiza en el extremo 3' no codificante (UTR) del gen *DMPK* en el cromosoma 19q13.3 (Mahadevan *et al.* 1992, Fu *et al.* 1992, Brook *et al.* 1992). Esta enfermedad presenta un patrón de herencia autosómico dominante pero con expresión variable y penetrancia incompleta. Se caracteriza por presentar anticipación génica, fenómeno donde los síntomas se manifiestan a edades más tempranas y en forma más severa conforme pasan las generaciones en una familia; y además, presenta inestabilidad tanto en la línea germinal como somática, poniéndose esto en evidencia al ver que el número de repeticiones que se hereda es diferente en cada uno de los hijos, y al ver que el número de repeticiones es diferente dentro del mismo tejido y entre diferentes tejidos del mismo individuo, además de que el tamaño de la mutación incrementa con la edad (Waring & Korneluk 1998, Wells & Warren 1998, Cuenca & Morales 1999).

Otra de estas enfermedades es la enfermedad de Huntington, la cual se caracteriza por afectar áreas específicas del cerebro, a saber, la corteza cerebral y el estriado, regiones cerebrales donde las neuronas se van degenerando. Entre los síntomas principales de esta enfermedad se encuentran los movimientos coreicos rápidos e involuntarios, que pueden comenzar como pequeñas fasciculaciones de los dedos o músculos faciales y conforme progresa la enfermedad involucran movimientos de las extremidades y del tronco; lentitud para moverse, rigidez y la distonía que es una de las características predominante en estados avanzados de la enfermedad (Hayden 2000). La base genética de la enfermedad de Huntington es una expansión de la repetición inestable CAG en la región codificante del gen *IT15* localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (Myers *et al.* 1999; Warren *et al.* 1999). La HD presenta un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia completa y al igual que la DM, presenta el fenómeno de anticipación génica (Cuenca & Morales 1999, Vázquez *et al.* 2008).

Con respecto a estas enfermedades, actualmente se están investigando factores tales como la función de las proteínas, el o los mecanismos involucrados en la expansión de las tripletas, factores involucrados en la inestabilidad de la repetición, el mosaicismo somático y su contribución con la edad de inicio y la progresión de la enfermedad, entre otros aspectos. Aunque el mecanismo que provoca la mutación no se conoce, la observación de que nuevos alelos con un número incrementado de tripletas se acumula en tejidos no mitóticos y de que la inestabilidad se encuentra alterada en varios tejidos de ratón deficientes en la reparación, apoyan la participación de varios procesos de reparación de ADN en el mecanismo de la inestabilidad de las repeticiones (Cleary & Pearson 2003).

Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar como ocurren las expansiones están: 1. Entrecruzamiento desigual (Jakupciak & Wells 1999); 2. Intercambio desigual de cromátidas hermanas; 3. Deslizamiento de la doble hélice o lo que se conoce como *slippage* en la hebra naciente (Pearson & Sinden 1996, Mirkin 2007); o bien a la formación de horquillas por parte de los fragmentos de Okazaki durante la duplicación del ADN (Petruska *et al.* 1998). No obstante, el mecanismo exacto no es conocido, y más bien, las horquillas podrían ser el resultado de una combinación de estos mecanismos, los cuales no son mutuamente excluyentes.

Un modelo atractivo de expansión propone un defecto en el procesamiento de “hydrogen-bonded loops”, de forma que durante la duplicación, las tripletas repetidas (TNR, por sus siglas en inglés) pueden aparearse erróneamente produciendo una horquilla extrahelical de ADN que, de no repararse, aumentaría el tamaño de las repeticiones si ocurre en la hebra hija, pero lo disminuiría si ocurre en la hebra molde. Sin embargo, varios ensayos *in vitro* han mostrado que ambas repeticiones 5-CAG y 5-CTG inhiben la progresión de la polimerasa, por lo que el deslizamiento puede ocurrir tanto en la hebra hija como en la hebra molde; no obstante se ha visto que esto va a depender de la ubicación de la tripleta y la estabilidad que confiera según se encuentre en la hebra molde o en la hija (McMurray 2008).

Desde hace unos años se ha propuesto también, que en el proceso de expansión de las tripletas repetidas, pueden estar involucrados otros factores como los sistemas de reparación del ADN. Existen una serie de mecanismos que podrían estar involucrados en la generación de expansiones, entre ellos: la reparación por recombinación (incluyendo

“nonhomologous end joining), reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER) (incluyendo “transcription- coupled repair”) y el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR, por *Mismatch Repair*) (Arheim & Shibata 1997, Chow *et al.* 2004, Rao 2007, de Souza- Pinto *et al.* 2008).

El sistema MMR es un mecanismo de reparación postduplicativo que corrige errores base-base y las asas de inserción/delección (IDLs) que ocurren en las regiones repetitivas del ADN, mientras que el NER remueve dímeros de pirimidina y otras lesiones que distorsionan la hélice (Kirkpatrick & Petes 1997).

El sistema de reparación de apareamientos erróneos, conocido por sus siglas en inglés como MMR, juega un papel fundamental en dos procesos celulares importantes: 1) la reparación de errores generados durante la duplicación de la molécula de ADN o como resultado de daños químicos a los que se expone la molécula y/o sus precursores; 2) en el procesamiento de tractos heteroduplex durante la recombinación, así como la inhibición de recombinación entre secuencias divergentes (Kolodner 1996, Hsieh 2001, Wu & Vásquez 2008).

Varios estudios sugieren además, que las proteínas del sistema MMR, de forma individual, tal como la MSH2, juega un papel importante en la regulación de las “Holliday junctions” y también que participa en el control del ciclo celular al reconocer daños en el ADN (tales como daño UV y alquilación) y al disparar la detención del mismo u otra respuesta cuando la cantidad de ADN dañado sobrepasa la capacidad de reparación (Kolodner 1996, Bertrand *et al.* 1998, Buermeyer *et al.* 1999). En mamíferos, otras proteínas del sistema MMR, como las proteínas MSH4 y MSH5 controlan varios aspectos del apareamiento de cromosomas durante la meiosis y la recombinación en la gametogénesis (Baarends 2001).

### **Bioquímica y genética del MMR**

Las proteínas del sistema de reparación de apareamientos erróneos fueron identificadas por primera vez en *S. Pneumoniae* (Yang 2000), pero el sistema es mejor caracterizado y entendido en organismos procariontes, tal como el sistema MutHLS de *Escherichia coli*, encargado de reparar un amplio espectro de bases mal apareadas. Este

sistema se ha venido estudiando desde hace ya varias décadas (alrededor de la década de 1960), y con él se demostró que la inactivación de la vía de reparación incrementa la tasa de mutación espontánea (Modrich & Lahue 1996, Yang 2000).

En general, pueden ocurrir dos tipos de apareamientos erróneos en el ADN: el primero consiste en la yuxtaposición no complementaria de bases y se refiere generalmente al apareamiento erróneo base-base (base-base mispairing o “mismatching”) que puede ocurrir entre purina-purina (G-G, A-A o G-A), purina-pirimidina (G-T, T-G o A-C) o bien entre pirimidina-pirimidina (C-T, T-T, T-C) (Kao *et. al.* 2005). El segundo tipo de apareamiento erróneo ocurre en regiones repetidas en tándem y surge como consecuencia de un mal alineamiento de las dos hebras complementarias simples en una doble hebra de ADN, lo que puede generar la formación de un “loop” u horquilla de más de un par de bases mal apareadas en un dúplex de ADN; estos son los llamados loops o bucles de inserción-delección o IDLs. Si ambos tipos de apareamientos no son corregidos por la ADN polimerasa, entonces son detectados y corregidos por el sistema MMR (Marra & Schär 1999, Iyer *et al.* 2006).

En bacterias, se requiere de tres proteínas para detectar y marcar el error en la hebra específica, a saber, MutS, MutL y MutH. Posteriormente MutH rompe la hebra hija, la ADN helicasa separa las dos hebras y las exonucleasas remueven el “mismatch”. Finalmente la ADN polimerasa holoenzima III asistida por proteínas SSB (single-stranded DNA binding proteins, por sus siglas en inglés) rellenan el sitio escindido y la ADN ligasa termina la unión de los nucleótidos (Modrich & Lahue 1999, Yang 2000, Aquilina & Bignami 2001).

#### - **Sistema de reparación de apareamientos erróneos en *Escherichia coli***

##### **Características y funciones.**

En *Escherichia coli*, el MMR se encarga de reconocer y reparar las bases individuales mal apareadas, con excepción de C·C; y también repara pequeñas asas de inserción/delección; sin embargo no reconoce eficientemente aquellas inserciones/delecciones de más de 4 pares de bases (Modrich & Lahue 1996, Kolodner 1996).

Para que se de la reparación del daño, la proteína MutS se encarga del reconocimiento inicial de los apareamientos erróneos en la molécula de ADN. La función

de la proteína MutL no está lo suficientemente clara, sin embargo se sabe que interactúa con MutS en el sitio de reconocimiento de ésta, y es requerida para la activación de la proteína MutH. MutH es una endonucleasa que corta la molécula de ADN hemimetilada (la nueva cadena de ADN que está siendo sintetizada está sin metilar) en la hebra sin metilar una vez que se da la interacción MutS-MutL. MutH se une a sitios palindrómicos GATC hemimetilados, sin embargo en presencia de un “nick” pre-existente en la cadena de ADN la intervención de MutH se hace innecesaria (Kolodner 1996).

La reacción de reparación puede utilizar sitios hemimetilados que pueden estar 5' o 3' del sitio erróneo. La escisión del segmento por reparar requiere de UvrD (Helicasa II), la exonucleasa-Exo I (exonucleasa 3'), Exo VII (exonucleasa 3' y 5') o la proteína RecJ (5' exonucleasa) para hebra simple de ADN, dependiendo del sitio donde esté el “nick”, ya sea si se ubica a 5' o 3' del sitio del error. Una vez que se da la escisión, tanto la holoenzima ADN polimerasa III como la SSB y la ADN ligasa median la resíntesis en el sitio del “nick” (Kolodner 1996, Min- Li 2008).

## - **Sistema de reparación de apareamientos erróneos en eucariotas**

### ***S. Cerevisiae* y humanos**

#### **Características y funciones**

Se sabe también que los eucariotas cuentan con un sistema de reparación de apareamientos erróneos que tiene al menos varios componentes muy relacionados con componentes clave del sistema MTHLS de bacterias, lo cual refleja lo conservado que es el proceso de reparación, así como lo especializadas y traslapadas que pueden ser las funciones de los productos génicos del sistema MMR (Kolodner 1996, Buermeyer *et al.* 1999). A pesar de que la señal de discriminación de la hebra con el error no es conservada entre el MMR de *E. coli* y MMR de eucariotas, ambos sistemas son capaces de discriminar entre la hebra líder y la hebra hija, usando el corte específico de banda (Nick-directed strand specificity) (Min Li 2008).

Dentro de los organismos eucariotas se ha demostrado que existen al menos seis proteínas homólogas a MutS en *S. cerevisiae* y otros eucariotas, a saber MSH1, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 y MSH6; así como también productos génicos muy similares a los de la vía MutL, a saber MLH1, MLH3, PMS1 y PMS2. A diferencia del sistema MMR

procariota, en eucariotas el sistema MMR funciona en heterodímeros complejos MSH2-dependientes, entre los que se encuentran dos claramente diferenciados: MSH2-MSH3 (complejo MutS $\beta$ ) que reconoce algunos apareamientos erróneos base-base, pero parece tener una mayor afinidad por los bucles de inserción/delección de ADN (IDL) compuestos de 2-12 bases. Otro heterodímero es el MutS $\alpha$  formado por las proteínas MSH2 y MSH6 (homóloga de la proteína GTBPIpIGO en humanos) (Drummond *et al.* 1995, Palombo *et al.* 1995); que reconoce errores de una sola base o IDLs de muy pocas bases (Min Li 2008, Owen *et al.* 2009).

Las investigaciones sugieren que hay redundancia en las funciones de MutS $\alpha$  y MutS $\beta$  para reconocer y procesar los errores IDLs, pero también que hay complementariedad dependiente del tamaño de los IDLs (Modrich 1997).

La proteína MSH1 de levaduras, es una proteína mitocondrial que protege al genoma de la mitocondria de la sustitución de bases. En mamíferos aún no se han identificado homólogos de esta proteína (Wei *et al.* 2002).

En *S. cerevisiae* el complejo MLH1-PMS1 interactúa con MSH2 que se une a la base mal apareada, lo que es consistente con la idea de que el complejo MLH1-PMS1 (PMS2 en humanos) juega el mismo papel que el cumplido por MutL en el sistema MMR de bacterias.

Es importante mencionar, y con el fin de evitar confusiones con otros procesos, que el nombre de PMS1 proviene de las iniciales PMS de “post-meiotic segregation”, porque la enzima participa en ese proceso celular además de participar en el mecanismo de reparación (Baarends 2001). Los actuales nombres de los homólogos de MutS corresponden a las designaciones que se le dieron inicialmente a las proteínas de levadura, no obstante MSH6 de humanos se conoció primero como p160 o GTBP (G/T mismatch binding protein) por su función bioquímica (Harfe & Robertson 2000).

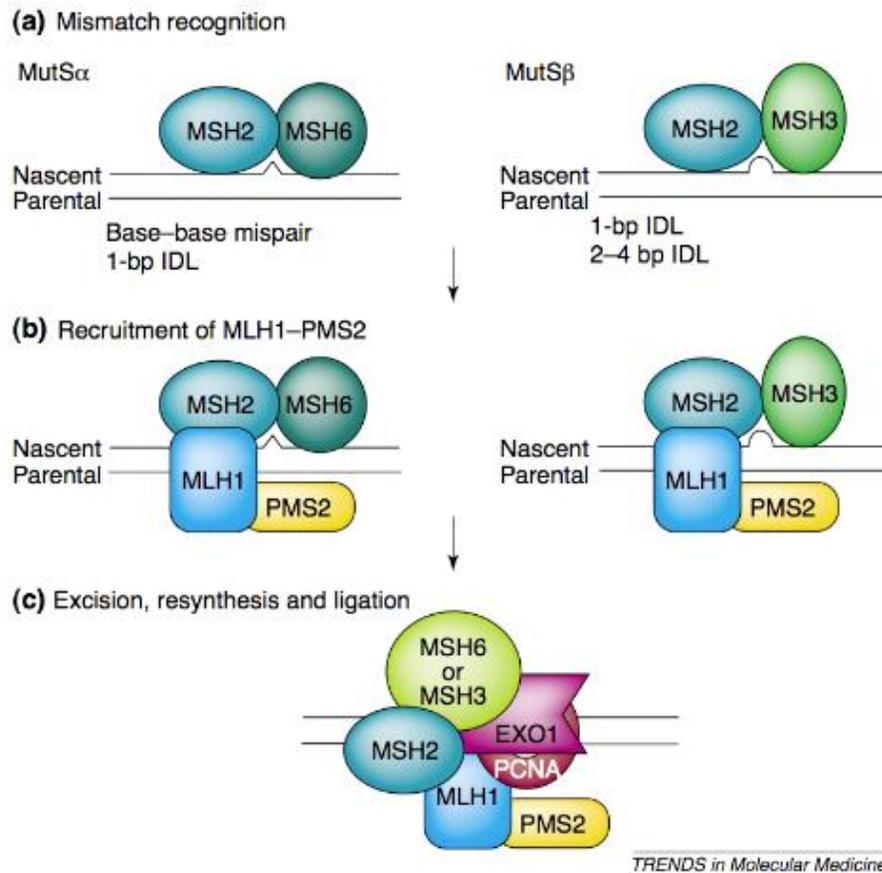
La diferencia más notable en cuanto a la especificidad entre el sistema de reparación humano y el de bacteria, es que el MMR humano es capaz de reparar transversiones erróneas C-C (Modrich & Lahue 1996). La reacción de reparación en humanos es dependiente de ATP, de los cuatro dinucleótidos y de un catión divalente (Modrich 1997). Un rompimiento de cadena simple a una distancia de un kilobase del apareamiento erróneo es capaz de dirigir la reparación, sin embargo se ha visto que la eficacia de la reparación

disminuye conforme aumenta la distancia en un rango de 100 a 1000 pares de bases; no obstante el funcionamiento del sistema es independiente de la orientación 3' o 5' del "nick" (Modrich & Lahue 1996).

Se ha visto que, además de la inactivación funcional del sistema MMR por mecanismos genéticos y epigenéticos, este sistema puede resultar defectuoso por sobreexpresión de la proteína MSH3, la cual secuestra las proteínas MSH2, inhibiendo así la formación del complejo MSH2-MSH6, lo que sería equivalente a un mutante *MSH6* (Harfe & Robertson 2000).

Como homólogos de MutL, MLH1 y PMS2 constituyen el complejo MutLa encargado de regular la terminación de la escisión provocada. Este complejo posee actividad endonucleasa dependiente de PCNA/RFC. La función del complejo hMutLβ (MLH1-PMS1) es aún desconocida mientras que se sabe que hMutLγ (MLH1-MLH3) está involucrado en el ciclo de meiosis (Min Li 2008).

Otras proteínas involucradas en MMR son la PCNA (proliferating celular nuclear antigen) requerida en los primeros pasos del proceso MMR, antes o durante la escisión y también en la resíntesis, al igual que para distinguir entre las hebras nacientes y las hebras molde (Buermeyer *et.al* 1999, Harfe & Robertson 2000, Schofield & Hsieh 2003, Kunkel & Eri 2005). También la EXO1 que por su actividad exonucleasa 5'-3' está involucrada en ambos sentidos de reparación, por lo que permite así la escisión de dsADN (ADN doble hebra). (Min Li 2008). Y las proteínas RPA (single-strand DNA-binding protein), RFC, HMGB1 y la ADN polimerasa involucradas en la escisión y síntesis de ADN (Min Li 2008) (Fig.1).



**Figura 1.** Esquema de los principales componentes del sistema de reparación de apareamientos erróneos. (a) Complejo MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ ) reconoce apareamientos erróneos base-base y pequeños IDLs (de uno o dos nucleótidos) y MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ) se une preferentemente a grandes IDLs de hasta 12 nucleótidos. (b), (c) La interacción MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ ) activa eventos de reparación siguientes que facilitan la escisión del daño, así como su resíntesis y ligación. Tomado de Wei *et al.* 2002.

### Relación del Sistema MMR con las mutaciones inestables

La participación del sistema MMR en aquellas enfermedades causadas por expansiones de nucleótidos, como las SCAs, DM1, la HD, ha sido estudiada ampliamente en modelos de ratones transgénicos con HD y DM, donde hay datos que involucran este sistema con el mecanismo de expansión (Owen *et al.* 2005, Mirkin 2007, McMurray 2008). Asimismo se ha visto que el sistema MMR es importante para la estabilización de

las repeticiones imperfectas de trinucleótidos en *S. cerevisiae* y se presume que se logra a través de la vía de reparación de la recombinación (Schofield & Hsieh 2003).

De manera paradójica, en células germinales de ratón, se ha visto que un Msh2 funcional contribuye con la expansión de las tripletas (Schofield & Hsieh 2003, Mirkin 2007, Aguilera & Gómez 2008), y en ensayos *in vitro* con el sistema MMR humano, se ha visto que el complejo MSH2-MSH3 está involucrado en el proceso de expansión del trinucleótido CNG más que en su reparación (Owen *et al.* 2005, Min Li 2008).

En un modelo de ratón transgénico para el gen *HD* humano se evaluó la actividad de las proteínas MMR, y se observó que la unión de Msh2-Msh3 al CAG-hairpin inhibe la actividad ATPasa de Msh2-Msh3 alterando tanto la afinidad nucleotídica como las interfases de unión entre las proteínas y el ADN (Owen *et al.* 2005). Estos cambios en la función del complejo Msh2-Msh3 dependen de la presencia de bases mal apareadas A-A y la estructura de la horquilla per se. Aunque aún la función del complejo Msh2-Msh3 no se ha caracterizado lo suficiente en este proceso de expansión de nucleótidos, se ha demostrado, en otros modelos de ratón, que es un componente clave en la expansión del trinucleótido CTG en el gen asociado con la distrofia miotónica y también en la expansión del trinucleótido CAG en HD, lo que indica que el complejo funciona independientemente de la composición de bases de la tripleta y de la posición de la repetición, en área codificante o no codificante (Manley 2002, Van den Broek 2002, Owen *et al.* 2005).

La frecuencia de grandes expansiones CAG disminuyen en aquellos ratones deficientes en Msh2, Msh3 y Pms2, lo que indica que las proteínas MMR contribuyen activamente en la formación de las expansiones, posiblemente de una manera independiente de la duplicación que puede ser modulada por agentes genotóxicos (Kunkel & Eri 2005).

Experimentos *in vitro* también han mostrado evidencia que las tripletas repetidas forman estructuras secundarias que se cree podrían bloquear la reparación normal de las repeticiones en el locus afectado. Esto sugiere un modelo de expansión en el que la horquilla CAG que se forma, contiene múltiples bases mal apareadas, secuestrando así el complejo proteico MSH2-MSH3 alterando la afinidad nucleotídica y la actividad enzimática, e inhibiendo con esto el reconocimiento de los errores y su subsecuente reparación. De esta forma, el ADN que forma la horquilla se puede incorporar dentro del genoma, causando la expansión (Owen *et al.* 2005).

En condiciones fisiológicas, la estabilidad de esas horquillas decrece de acuerdo a la secuencia de la tripleta en el orden CGG>CTG>CAG=CCG, como consecuencia de la contribución energética de los apareamientos erróneos. Se considera además, que como la maquinaria del MMR opera en la cadena de ADN naciente, las horquillas repetitivas presentes en estas hebras se estabilizan preferentemente sobre las estructuras repetitivas que se generan en las cadenas molde, cambiando el equilibrio hacia la expansión de las repeticiones (Mirkin 2007).

No obstante, el papel preciso del sistema MMR en la inestabilidad de las TNR es bastante controvertido. Como se mencionó anteriormente, en ratones transgénicos el sistema MMR contribuye preferencialmente con la generación de expansiones. En bacterias y levaduras, hay datos contradictorios al respecto. Por un lado, se ha visto una frecuencia incrementada de pequeñas expansiones y contracciones cuando el sistema MMR se inactiva tanto en bacterias como en levadura (Parniewski *et al.* 2000, Rolfsmeier *et al.* 2000, Schmidt *et al.* 2000). Por otro lado, otros datos obtenidos con los mismos organismos, indican que la frecuencia de expansiones y contracciones se incrementan cuando el sistema MMR está activo (Jaworski *et al.* 1995, Schweitzer & Livingston 1997, Schumacher *et al.* 1998). Estas diferencias podrían deberse a diferentes características experimentales, tales como el tamaño de la repetición, el tipo de plásmido y las cepas de bacterias utilizadas (Jaworski *et al.* 1995, Schweitzer & Livingston 1997; Schumacher *et al.* 1998, Wells *et al.* 1998, Parniewski *et al.* 2000, Rolfsmeier *et al.* 2000, Hashem *et al.* 2002). Sin embargo, el rol preciso del sistema MMR en la inestabilidad de trinucleótidos y las enfermedades asociadas a ésta, no se comprende con exactitud.

Estudios *in vitro* y datos obtenidos utilizando modelos de bacterias, levaduras y ratones, indican que algunas proteínas involucradas en la duplicación y reparación del ADN pueden actuar como modificadores genéticos en *trans* de la inestabilidad de las secuencias repetidas en tándem (Richards 2001, Cleary & Pearson 2003). Es probable entonces que la dinámica mutacional de las repeticiones inestables pueda ser modificada por factores genéticos específicos o ambientales. Tales factores modificadores en *trans* podrían incluir variantes de genes de reparación o agentes genotóxicos ambientales (Gomes-Pereira *et al.* 2001, Martorell *et al.* 2004). La influencia de factores ambientales en la dinámica mutacional de la repetición CTG asociada con DM1 ha sido estudiada por dos grupos de

investigadores, quienes demostraron que los agentes genotóxicos pueden modular *in vitro* la dinámica de la repetición por aumento o disminución de la frecuencia de las expansiones o las contracciones (Yang *et al.* 2003, Gomes-Pereira & Monckton 2004). No obstante, la influencia de polimorfismos en los genes del sistema de reparación MMR no ha sido analizada apropiadamente.

### **Condiciones en Costa Rica:**

Esta práctica dirigida es un proyecto piloto que tiene como fin estandarizar y poner en práctica técnicas moleculares para determinar si alguno de los genes del sistema MMR tiene efecto sobre la variación residual de la edad de inicio y la variación residual del grado de variación somática de la enfermedad DM1, en Costa Rica. De encontrarse un efecto sería evidencia de que ese gen o genes estarían actuando como modificadores genéticos en *trans* de la distrofia miotónica, lo que podría utilizarse como complemento a la información pronóstica que se le brinda al paciente portador de la mutación DM1.

## JUSTIFICACIÓN

Desde hace varias décadas se ha venido acumulando evidencia que indica que la inestabilidad del genoma, específicamente la inestabilidad de los microsatélites (MSI), se encuentra asociada con el proceso de tumorigénesis. Se ha visto que defectos o mutaciones en genes del sistema de reparación se encuentran asociados con la susceptibilidad a varios tipos de cáncer hereditarios y de tipo esporádico, lo que ha generado un considerable interés en los productos génicos que funcionan en el sistema MMR en eucariotas.

Dado que se ha comprobado la participación del sistema de reparación en la inestabilidad de los microsatélites (MSI), desde hace unos años también se ha analizado su contribución en la inestabilidad de las TNR en enfermedades neurodegenerativas, como la DM, HD y FRAXA, puesto que estas enfermedades son causadas por microsatélites inestables; esto a través de modelos animales en los que se están analizando los diferentes mecanismos de acción bajo los que podría estar actuando el sistema de reparación.

Se ha especulado que genes del sistema MMR podrían afectar de algún modo la estabilidad de las repeticiones de trinucleótidos que se asocian con enfermedades humanas, sin embargo, el papel preciso del MMR en el proceso de inestabilidad es controversial y no se comprende con exactitud (Lahue & Slater 2003, Pearson *et al.* 2005). Datos recientes señalan la participación de los componentes del sistema MMR en la modificación de la dinámica de las repeticiones en modelos de ratón y se ha planteado que polimorfismos en esos genes en humanos son excelentes candidatos *trans*-modificadores tanto de la inestabilidad somática como de la inestabilidad que se presenta en la línea germinal (Martorell *et al.* 2004, Foiry *et al.* 2006).

Se sabe que las correlaciones clínicas de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas causadas por mutaciones inestables no son del todo precisas. En vista de esto, el grupo de investigadores del INISA se han dado a la tarea de analizar, entre otros aspectos, la contribución que tiene el mosaicismo somático en la edad de inicio y progresión temprana de algunas de estas enfermedades. Datos preliminares del grupo de investigación indican que el mosaicismo somático en la DM1 contribuye con la edad de inicio y progresión de la enfermedad. Por lo tanto, es probable que modificadores de la variación somática también sean modificadores de la severidad de la enfermedad. Estos

modificadores podrían contribuir a explicar por qué en algunos pacientes la enfermedad progresa de una manera más rápida que en otros pacientes, aún cuando poseen el mismo tamaño de la mutación.

En este sentido esta práctica dirigida está enfocada en la búsqueda de modificadores genéticos que pudieran estar involucrados en el mecanismo de expansión de tripletas repetidas, siendo el primer estudio en el país realizado para analizar si existe asociación entre polimorfismos en los genes de reparación y la variación residual de la edad de inicio de la enfermedad y del grado de variación somática en los pacientes afectados por DM1.

Además, la búsqueda de factores ambientales y genéticos modificadores de la edad de inicio y la variación somática en trastornos causados por mutaciones inestables, podrían llevar al desarrollo de terapias que inhiban en parte su acción dentro de los mecanismos de expansión de las repeticiones, con la esperanza de retardar la edad de inicio y progresión de los síntomas en los pacientes afectados (Gomes-Pereira & Monckton 2006). De esta forma si se halla asociación entre polimorfismos en los genes del sistema MMR y la variación somática residual de pacientes con DM, y asociación con la variación residual de la edad de inicio en DM y HD, o se logra realizar un modelo que logre explicar cómo otros factores afectan la inestabilidad de estas enfermedades, estos modificadores genéticos podrían utilizarse como blancos terapéuticos que permitan retardar la edad de inicio y progresión de la enfermedad principalmente en aquellos pacientes en que las repeticiones aumentan con mayor rapidez que el promedio. Bajo esta perspectiva, algunos polimorfismos en genes MMR también podrían vislumbrarse como posibles blancos terapéuticos en lo que respecta a la inestabilidad de microsatélites en cáncer (Peltomaki 2003).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación entre tres polimorfismos en los genes del sistema MMR y la distrofia miotónica, causada por mutaciones inestables; con el fin de identificar modificadores genéticos del mecanismo de inestabilidad.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para tres polimorfismos que se van a estudiar en algunos de los genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) en pacientes con distrofia miotónica (DM1).
- 2.** Estandarizar el análisis de restricción para determinar el genotipo de pacientes con DM1, para los tres polimorfismos a estudiar.
- 3.** Encontrar la posible asociación entre los genes de reparación y la varianza residual para una enfermedad causada por mutaciones inestables, distrofia miotónica tipo 1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta práctica dirigida se llevó a cabo como parte del proyecto de investigación 742-A7-034, “Polimorfismos en los genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) y su relación con las mutaciones inestables” que fue aprobado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica el 6 de diciembre de 2006. Los métodos moleculares se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular Humana del Instituto en Investigaciones en Salud (INISA), durante el primer y segundo semestre de 2009.

### **Polimorfismos analizados:**

Se analizaron tres polimorfismos de dos genes del sistema de reparación MMR (*MSH3* y *PMS2*) en muestras de ADN genómico de 148 pacientes diagnosticados con distrofia miotónica tipo 1 (DM1) de Costa Rica, Estados Unidos, Escocia y Uruguay. Las muestras de Estados Unidos fueron facilitadas por el investigador Tetsuo Ashizawa, las de Escocia por Douglas y Alison Wilcox y las de Uruguay por Claudia Braidá.

Los polimorfismos que se analizaron fueron: el rs1805321:C>T y el rs2228006:A>G, los cuales son no-sinónimos localizados en el exón 11 del gen *PMS2*; y el rs1382543:G>A, localizado en el intrón 2 del gen *MSH3*. El primero produce un cambio de citosina por timina (P470S), el rs2228006 un cambio de adenina por guanina (K541E); mientras que el rs1382543 un cambio G>A en -7pb del extremo 5' del exón 3. Los dos primeros podrían modificar la función de la proteína mientras que el último podría afectar la eficiencia del procesamiento.

Para seleccionar los polimorfismos se hizo una búsqueda en bases de datos públicas del genoma humano disponibles en la Web (Ensembl Database, HapMap y National Center for Biotechnology Information), escogiéndose polimorfismos de aquellos genes analizados en investigaciones previas con modelos animales de ratón para DM1 y HD; así como aquellos con alta frecuencia en la población. Una vez seleccionados se procedió a diseñar los iniciadores (primers), con el programa Oligo 4.0, que se utilizaron para el análisis de PCR (Cuadro 1).

Cuadro 1. *Resumen de condiciones óptimas para el análisis molecular de los 3 polimorfismos.*

<b>Polimorfismo</b>	<b>Secuencia del iniciador</b>	<b>Temperatura de alineación</b>	<b>Producto PCR (pb)</b>	<b>Condiciones PCR Ciclos</b>
rs1805321:C>T, en <i>PMS2</i>	<b>F</b> 5'-GGACAGAAAAGGGGTATGCT-3' <b>R</b> 5'-CGCTTTGTGTTTGGGGTTGC-3'	57°C	392	30X
rs2228006:A>G, en <i>PMS2</i>	<b>A-F</b> 5'-CTCAGGAGAAAGCGCCTAAA-3' <b>G-F</b> 5'-CTCAGGAGAAAGCGCCTG-3' <b>R</b> 5'-CGCTTTGTGTTTGGGGTTGC-3'	65°C	134	20X
rs1382543:G>A, en <i>MSH3</i>	<b>F</b> 5'-CCATCTTTACCCTGAACCCA-3' <b>R</b> 5'-AGGGCAGAATCGCAGCAGA-3'	63,1°C	252	30X

## Análisis molecular de los polimorfismos estudiados

### Análisis del polimorfismo rs1805321:C>T

#### **1- Reacción en cadena de la polimerasa**

Para el análisis molecular de este SNP se realizó una PCR a partir de ADN genómico siguiendo las condiciones estándar. En breve, 10-100ng de ADN genómico se amplificaron usando: buffer 11X (45mM Tris-HCl pH: 8.8, 11mM sulfato de amonio, 8.0mM MgCl<sub>2</sub>, 4.4μM de EDTA, 10% mercaptoetanol y 1mM de cada dNTP), DMSO al 10%, 1μM de cada uno de los iniciadores, agua destilada y 0.5U Taq polimerasa, para un volumen final de 10μL. Cada vez que se hizo una PCR se incluyó un blanco para descartar contaminación. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems) y/o Bio Rad, con el siguiente perfil: 30 ciclos de 96°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundos y una extensión de 2 minutos a 72°C; un ciclo de un minuto a 60°C y finalmente un período de extensión final a 70°C por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a 4°C.

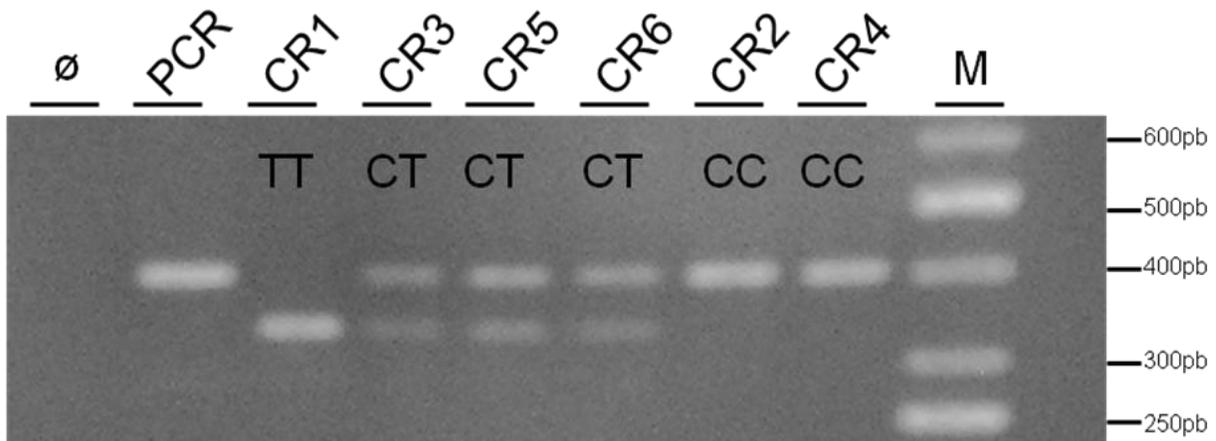
## 2- Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa (TopVision LEGQ/Fermentas) al 1,50% teñido con bromuro de etidio (BrEt), en buffer TBE 0,5X. Para esto, 2  $\mu$ L del producto de PCR se mezclaron con 3  $\mu$ L de azul de bromofenol y se agregaron en el gel colocado en la cámara de electroforesis y se corrieron durante 1h a 90V, 250W y 150 mA. Posteriormente se observó el gel al transiluminador para verificar la amplificación.

## 3- Genotipo del polimorfismo analizado

El SNP rs1805321:C>T crea un sitio de restricción para la enzima *Bgl* II, por lo tanto, para obtener el genotipo de cada muestra, los productos de PCR se sometieron a una digestión con la enzima *Bgl* II (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de 20 $\mu$ L. Este polimorfismo es detectado debido a que la enzima reconoce la presencia de una T (timina) en el sitio de restricción, por lo tanto va a digerir el producto de PCR. Dependiendo del genotipo de la muestra, se obtuvieron productos de PCR digeridos y no digeridos, por lo tanto, el genotipo se estableció basado en el patrón de bandas que presentó cada muestra. Los individuos homocigotos (CC) presentan una banda de 392pb, los heterocigotos (CT) bandas de 392pb, 328pb y 64pb y los homocigotos (TT) bandas de 328pb y 64pb. Cada vez que se realizó una digestión, también se digirió el producto de PCR correspondiente al blanco.

Para el análisis, se preparó un gel de agarosa Nusieve (Cambrex) 2%- Agarosa (TopVision LEGQ/Fermentas) 1%. Además, se le agregó 1  $\mu$ L de EtBr (10mg/mL), este último para teñir los fragmentos y hacerlos visibles en el transiluminador. Diez microlitros del producto digerido fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa para lograr la separación de las bandas. Se usó un voltaje de 100V por un tiempo de 2 horas. En cada electroforesis, además de las muestras a analizar, se incluyó un producto de PCR sin digerir, la digestión del blanco y un marcador de peso molecular de 50pb (Fermentas). Los geles se visualizaron usando un transiluminador y también fueron fotografiados (Fig.2).



**Figura 2.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Análisis de restricción con *Bgl* II del polimorfismo rs1805321:C>T. En los carriles 3-8 se observan los productos de PCR digerido con *Bgl*II para 6 muestras de pacientes con DM1. Los genotipos de cada una de esas muestras se observa en cada carril. En el carril 2 se observa el control, producto de PCR (392 pb) sin digerir. El carril uno corresponde al blanco. El carril M corresponde al marcador de peso molecular.

### Análisis del polimorfismo rs2228006: A>G

Este SNP se analizó a través de una PCR anidada alelo específica, esto debido a que el polimorfismo no crea ni elimina un sitio de restricción específico para alguna endonucleasa de restricción.

Para analizar este polimorfismo se hicieron diluciones de los productos de PCR que amplificaron para el polimorfismo rs1805321:C>T. Se agregó una alícuota de 1  $\mu$ L del producto de PCR en volúmenes de agua libre de ADNasas determinados de acuerdo a la intensidad de la banda, posteriormente se mezcló y centrifugó. Cada vez que se hacía una PCR se incluyó un blanco para descartar cualquier tipo de contaminación durante el procedimiento.

#### **1- Reacción en cadena de la polimerasa**

Para el análisis molecular de este SNP se realizó una PCR a partir de las diluciones de los productos de PCR amplificadas para el polimorfismo rs1805321:C>T, descritas

anteriormente. Se amplificó 1µL de la dilución usando: buffer 10X (+ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)-MgCl<sub>2</sub> /Fermentas), DMSO al 10%, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µM de cada uno de los iniciadores, agua destilada, 200 µM de dNTPs y 0.5U Taq polimerasa, para un volumen final de 10µL. Cada vez que se hizo una PCR se incluyó un blanco para descartar contaminación.

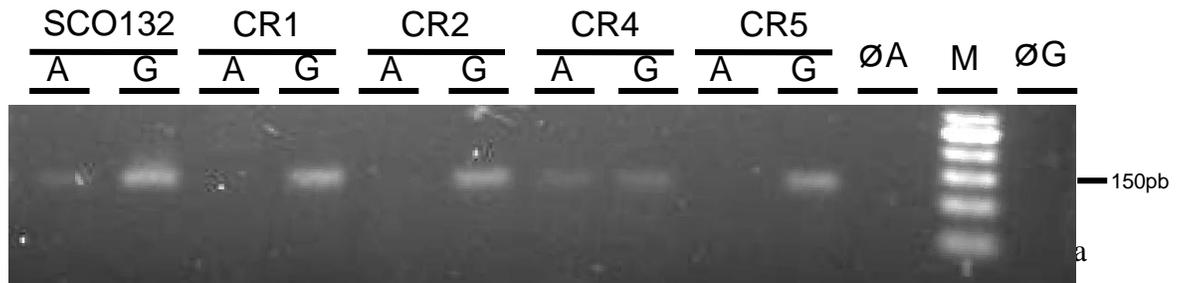
En este caso debían hacerse dos mezclas maestras, una que incluía el par de iniciadores PMS2-A-F y PMS2-1-R; y otro con el par PMS2-G-F y PMS2-1-R (Cuadro 1), posteriormente se distribuyeron 9,0 µL de cada master mix en los tubos de 0,2µL debidamente identificados con A o G, para cada muestra por analizar.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems) y/o Bio Rad, con el siguiente perfil: 20 ciclos de 96°C por 45 segundos, 65°C por 45 segundos y una extensión de 2 minutos a 70°C. Las muestras se almacenaron a 4°C.

## **2- Electroforesis en geles de agarosa y genotipo del polimorfismo analizado**

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa (TopVision LEGQ/Fermentas) al 1,50% teñido con bromuro de etidio (BrET), en buffer TBE 0,5X. Para esto 2 µL del producto de PCR se mezclaron con 3 µL de azul de bromofenol y se agregaron en el gel colocado en la cámara de electroforesis durante 50 min a 90V, 150mA y 250W.

Las muestras se colocaron en el orden XA- XG, y fueron observadas al transiluminador para determinar los genotipos GG, GA o AA, de acuerdo a si la muestra amplificó para uno de los dos pares de iniciadores o los dos, y tomando en cuenta la intensidad de las bandas para distinguir entre homocigotas y heterocigotas (Fig.3).



amplificación de la PCR alelo específico del polimorfismo rs2228006:A>G. El genotipo de las muestras SCO132, CR-1, CR-2 y CR-5 es G/G. Y el genotipo de la muestra CR-4 es G/A. Los carriles 11 y 13 corresponden a los respectivos blancos. El carril M corresponde al marcador de peso molecular.

### Análisis del polimorfismo rs1382543:G>A

#### 1- Reacción en cadena de la polimerasa

Para el análisis molecular de este SNP se realizó una PCR a partir de ADN genómico siguiendo las condiciones estándar. Se amplificaron 10-100ng de ADN genómico usando: buffer 11X (45mM Tris-HCl pH: 8.8, 11mM sulfato de amonio, 5.5mM MgCl<sub>2</sub>, 4.4μM de EDTA, 10% mercaptoetanol y 1mM de cada dNTP), 1μM de cada uno de los iniciadores, agua destilada y 0.5U Taq polimerasa, para un volumen final de 10μL. Cada vez que se hizo una PCR se incluyó un blanco para descartar contaminación. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems) y/o Bio Rad, con el siguiente perfil: 30 ciclos de 96°C por 45 segundos, 63.1°C por 45 segundos y una extensión de 2 minutos a 72°C; un ciclo de un minuto a 60°C y finalmente un período de extensión final a 70°C por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a 4°C.

#### 2- Electroforesis en geles de agarosa

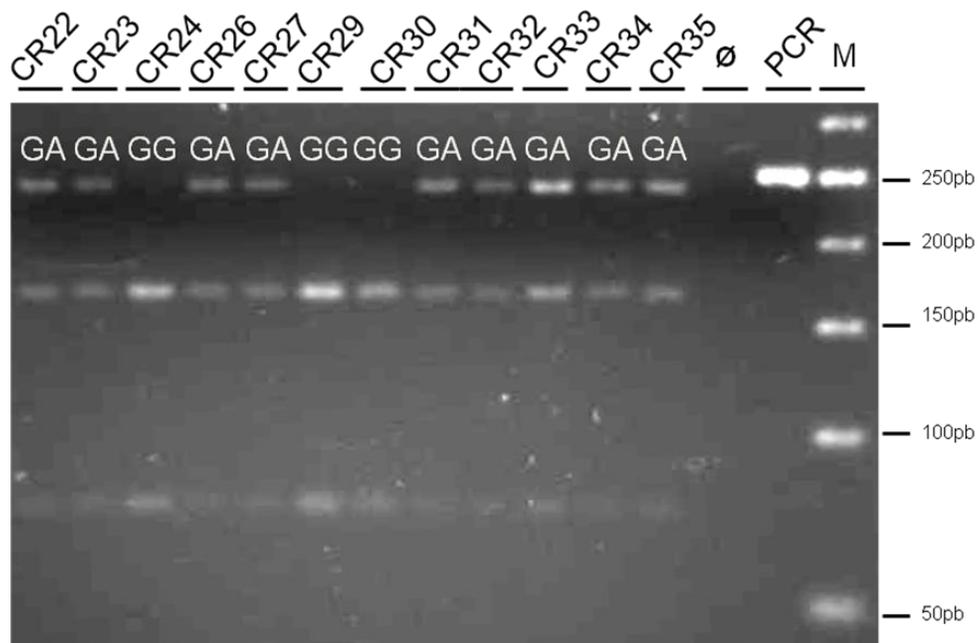
Los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa (TopVision LEGQ/Fermentas) al 1,50% teñidos con BrEt, en buffer TBE 0,5X. Para esto se mezclaron 2 μL del producto de PCR con 3 μL de azul de bromofenol y se agregaron en el gel colocado en la cámara de electroforesis durante 50min a 90V, 250W y 150mA.

Posteriormente se observó el gel al transiluminador para determinar si había amplificación del fragmento buscado.

### **3- Genotipo del polimorfismo analizado**

Este polimorfismo elimina un sitio de restricción para la enzima *Sat I*, por lo tanto una vez que se obtuvieron los productos de PCR se realizaron las digestiones con la enzima *Sat I* (*Fnu4HI*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este polimorfismo es detectado debido a que la enzima reconoce la presencia de una G (guanina) en el sitio de restricción, por lo tanto va a digerir el producto de PCR. Dependiendo del genotipo de la muestra, se obtendrán productos de PCR digeridos y no digeridos, por lo tanto el genotipo se estableció basándose en el patrón de bandas que presentaba cada muestra. Los individuos homocigotos (GG) presentan bandas de 165pb y 73pb, los heterocigotos bandas de 238pb, 165pb y 73pb, y los homocigotos (AA) fragmentos de 238pb. Los tres genotipos tienen un fragmento fijo de 14pb, por lo que sólo son determinantes para analizar el genotipo los tamaños mencionados anteriormente. El tamaño del producto de PCR sin digerir es de 252pb. Cada vez que se hacía una digestión se digería también un producto de PCR correspondiente al blanco, para garantizar que no había contaminación en el proceso.

Para el análisis, se preparó un gel de agarosa Nusieve (Cambrex) 2%- Agarosa (TopVision LEGQ/Fermentas) 1%. Además, se le agregó 1  $\mu$ L de EtBr (10mg/mL), este último para teñir los fragmentos y hacerlos visibles en el transiluminador. Diez microlitros del producto digerido fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa para lograr la separación de las bandas. Se usó un voltaje de 100V por un tiempo de 2 horas. En cada electroforesis, además de las muestras a analizar, se incluyó un producto de PCR sin digerir, la digestión del blanco y un marcador de peso molecular de 50pb (Fermentas). Los geles se visualizaron usando un transiluminador y también fueron fotografiados (Fig.4).



**Figura 4.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Análisis de restricción con *Sat* I del polimorfismo rs1382543:G>A. En los carriles 1- 12 se observan los productos de PCR digeridos con *Sat* I para 12 muestras de pacientes con DM1. Los genotipos de cada una de esas muestras se observan en cada carril. En el carril 13 hay un blanco de la PCR y en el carril 14 se observa un control, producto de PCR (252 pb) sin digerir. El carril M corresponde al marcador de peso molecular.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se realizaron varias pruebas, tomando en consideración las estimaciones previas de tamaño del alelo progenitor (PAL), la variación somática (SV), así como la edad del inicio del trastorno (AofO) obtenidos a través de varios años de investigación en la DM1.

Para determinar las frecuencias de los polimorfismos se utilizó el programa *GenAlEx 6.1* (Peakall & Smouse 2006) y se hizo una comparación con una tabla Chi-cuadrado o una prueba exacta de Fisher para la determinación del equilibrio Hardy Weinberg en cada uno de los loci estudiados. Todos los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando  $p < 0.05$ .

También se utilizó el programa SPSS versión 14.0 (McGraw Hill Companies 2006-2007) para realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov para *una muestra* para determinar si las distribuciones se ajustaban a la normalidad. En este caso se dice que la prueba es de *una muestra* porque se ve la distribución de todos los individuos agregados contra una eventual distribución normal.

Con el programa SPSS también se realizaron pruebas de colinealidad para determinar la asociación de las variables (PAL, AatS, SV y AofO) una vez que los datos fueron depurados. Posteriormente se realizaron regresiones lineares entre edad de manifestación, tamaño de la mutación y variación somática; de ese análisis se obtuvo el residuo -por residuo se entiende la diferencia entre el valor observado y el valor esperado según el modelo estadístico- y se volvió a analizar la asociación de esos residuos con los 3 SNPs analizados en esta práctica, esto con el fin de establecer un modelo con los principales predictores de la edad de inicio de la enfermedad.

## **Limitaciones de la práctica**

La mayor limitación de la práctica ha sido el tamaño de la muestra debido a que en un principio se realizaron los análisis moleculares para 148 sujetos, pero como no se contaba con información en algunas variables de 27 pacientes, quedaron un total de 121 individuos con información para las 4 variables antes mencionadas. En esta misma línea, el hecho de que se hayan analizado solamente 3 polimorfismos limita el establecimiento de haplotipos que podrían estar asociados con la inestabilidad de las tripletas en DM.

Otra limitante es el tamaño de muestra de pacientes con enfermedad de Huntington y la falta de suficiente información para medir las variables de VS y PAL; razón por la que sólo se pudo realizar el análisis de las muestras de pacientes con DM. No obstante, hay que recordar que el diagnóstico molecular de esta enfermedad en Costa Rica se empezó a realizar hasta hace alrededor de 5 años, por lo que hasta el momento sólo se tiene el diagnóstico confirmado de 27 sujetos, muchos de los cuales permanecen asintomáticos hasta la fecha.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis estadísticos para muestras de pacientes con distrofia miotónica

Fernández (2004), menciona dos visiones sobre el efecto de la reparación del ADN en la inestabilidad de las tripletas repetidas: la primera supone que en presencia de las estructuras secundarias que se forman por causa de las secuencias repetidas, aún en células con reparación normal, es inevitable la formación de expansiones o contracciones de las secuencias. La segunda visión, por su parte, sugiere que el mecanismo de reparación tiene un efecto promutagénico, y en lugar de corregir los errores más bien estabiliza la región de las repeticiones así como las estructuras secundarias que se forman (horquillas de cadena sencilla, cadena triple, deslizamiento entre las dos cadenas con la formación de bucles y/o horquillas) contribuyendo de alguna forma que todavía se desconoce, con las expansiones y contracciones. Datos obtenidos a partir de modelos de ratón han implicado a los genes *Msh3*, *Msh2* y *Pms2* en la generación de las expansiones somáticas (Van den Broek *et al.* 2002, Gomes-Pereira *et al.* 2004), involucrándolos en el mecanismo de expansión de repeticiones inestables en humanos. Por este motivo se considera que los polimorfismos rs1805321:C>T, rs1382543:G>A y rs2228006:A>G podrían estar actuando como modificadores genéticos en *trans* del mosaicismo somático y la severidad de la enfermedad en la distrofia miotónica tipo 1.

Para evaluar lo anterior, primero se obtuvo el genotipo de esos tres polimorfismos, los cuales se localizan en dos de los genes del sistema MMR (*MSH3* y *PMS2*), mediante el análisis molecular en 148 muestras de ADN de pacientes con DM1. Estos genes han sido implicados en el mecanismo mutacional de repeticiones inestables responsables de cerca de 15 enfermedades hereditarias, tales como la enfermedad de Huntington y distrofia miotónica. El análisis incluyó pacientes provenientes de cuatro países (72 pacientes de Costa Rica, 40 de Texas USA, 32 de Escocia y 4 pacientes de Uruguay) con una edad promedio de inicio para la muestra total de 24.69 años (desv. estándar 18.00). El análisis incluyó el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas, las cuales se muestran en el Cuadro 2.

El análisis de los datos revelan que sólo la variante rs2228006:A>G no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) en tres de las poblaciones: Costa Rica ( $\chi^2= 33.382$ ,  $gl=1$ ,  $p< 0.05$ ); Texas ( $\chi^2= 16.366$ ,  $gl=1$ ,  $p< 0.05$ ) y Escocia ( $\chi^2= 12.789$ ,  $gl=1$ ,  $p< 0.05$ ). El cálculo del equilibrio para la muestra de Uruguay no se ejecutó debido a la reducida cantidad de casos. El hecho de que el equilibrio no se esté cumpliendo en las 3 regiones podría deberse a que estén actuando algunas fuerzas tales como selección natural, apareamiento no aleatorio, deriva génica o migración -sin embargo esto no se evaluó en esta práctica- y otro factor que pudo incidir en este resultado es el tamaño de la muestra utilizada.

Cuadro 2. Frecuencias alélicas de 3 polimorfismos del sistema de reparación MMR, de pacientes con distrofia miotónica tipo I según el país de origen.

LOCUS	PAÍS	N	Frecuencia Alélica		Análisis de Hardy- Weinberg
			1	2	
<b>rs1805321:C&gt;T</b> <i>PMS2</i>			<b>C</b>	<b>T</b>	
					En equilibrio
	<b>Costa Rica</b>	72	0.681	0.319	
	<b>Texas-USA</b>	40	0.488	0.513	En equilibrio
	<b>Uruguay</b>	4	0.500	0.500	N.A.
	<b>Escocia</b>	32	0.609	0.391	En equilibrio
<b>rs1382543:G&gt;A</b> <i>MSH3</i>			<b>G</b>	<b>A</b>	
					En equilibrio
	<b>Costa Rica</b>	72	0.715	0.285	En equilibrio
	<b>Texas-USA</b>	40	0.475	0.525	En equilibrio
	<b>Uruguay</b>	4	1.000	0.000	N.A.
	<b>Escocia</b>	32	0.688	0.313	En equilibrio
<b>rs2228006:A&gt;G</b> <i>PMS2</i>			<b>A</b>	<b>G</b>	
					p< 0.001
	<b>Costa Rica</b>	72	0.188	0.813	p< 0.001
	<b>Texas-USA</b>	40	0.075	0.925	N.A.
	<b>Uruguay</b>	4	0.125	0.875	p< 0.001
	<b>Escocia</b>	32	0.094	0.906	

Como se aprecia en el Cuadro 3 las frecuencias obtenidas para los tres polimorfismos analizados son muy similares a las reportadas para otras poblaciones, aunque es importante aclarar que puede haber un sesgo en el cálculo de las frecuencias alélicas en este estudio, esto debido a que no se tomó en consideración de forma estricta la información familiar. No obstante, en vista de la similitud entre las frecuencias de este estudio y de otras poblaciones, los cálculos obtenidos en este trabajo puede que estén muy cerca de los reales.

Cuadro 3. *Frecuencias alélicas de los polimorfismos analizados, en una muestra de la población mundial (Adaptado del NCBI).*

PAÍS	LOCUS								
	rs1805321:C>T			rs1382543:G>A			rs2228006:A>G		
	N	1	2	N	1	2	N	1	2
		C	T		G	A		A	G
<b>Europeos</b>	120	1.000		120	0.767	0.233	120	0.133	0.867
<b>Asiáticos</b>	90	1.000		88	0.932	0.068	90	0.078	0.922
<b>Asiáticos</b>	88	1.000		90	0.978	0.022	88	0.045	0.955
<b>Sub-saharianos- Africanos</b>	118	1.000		120	0.642	0.358	120	0.017	0.983
<b>Costa Rica</b>	72	0.681	0.319	72	0.715	0.285	72	0.188	0.813
<b>Texas-USA</b>	40	0.488	0.513	40	0.475	0.525	40	0.075	0.925
<b>Uruguay</b>	4	0.500	0.500	4	1.000	0.000	4	0.125	0.875
<b>Escocia</b>	32	0.609	0.391	32	0.688	0.313	32	0.094	0.906

Debido a que anteriormente (Morales 2006), algunas de las mediciones de las variables a estudiar se hicieron de forma subjetiva (para el tamaño del alelo progenitor (PAL) y variación somática (SV) principalmente), a la necesidad de cumplir con los supuestos del análisis estadístico multivariado, así como para poder realizar los análisis

estadísticos requeridos para determinar si alguno (o todos) de los 3 polimorfismos pudieran estar actuando como modificadores en *trans* del mecanismo de inestabilidad en enfermedades causadas por mutaciones inestables; se requirió la depuración de la base de datos que se tiene para DM1. Como primer paso, debido al tamaño pequeño de la muestra de pacientes provenientes de Uruguay (cuatro sujetos), éstos se eliminaron de la base de datos para poder realizar los cálculos diferenciales siguientes. Para realizar los análisis que requerían la edad de inicio de la enfermedad (AofO), se excluyeron cinco sujetos que resultaron asintomáticos al momento de la toma de la muestra. Lo mismo sucedió al realizar análisis con la variación somática, ya que se excluyeron 13 individuos, correspondientes a 11 casos leves, uno clásico y uno pediátrico.

Por otro lado, se realizó un análisis de la distribución de los sujetos respecto a la edad de inicio para ver si correspondía a una distribución normal. Para este análisis, se excluyeron cinco sujetos cuya edad constituía un puntaje extremo o valor atípico (outlier) de la curva. Para un total de 121 individuos con información completa para las 4 variables de interés: PAL, SV, AatS y AofO. De esos 121 individuos 62 eran originarios de Costa Rica, 27 de Escocia y 32 de Texas.

En vista de que los análisis estadísticos multivariados se basan en supuestos de normalidad para generar resultados más robustos, el paso siguiente consistió en determinar si los datos de las variables a estudiar (PAL, SV, AofO y AatS (edad de muestreo)) se ajustaban a una curva normal, para lo cual se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov. El análisis de los datos mostró que todas las variables se ajustaban a la normalidad tanto para la muestra agregada como para el análisis de las distribuciones por país ( $p > 0.05$ ), por lo que en adelante los análisis se realizaron con los datos directos, sin hacer ningún tipo de transformación.

Para determinar si se presentaban diferencias significativas en las medias de las submuestras por países en los puntajes directos en las 4 variables de interés (PAL, SV, AofO y AatS) se realizó un análisis de varianza. Los resultados indicaron que no existe diferencia significativa en las medias para PAL ni SV ( $p > 0.05$ ), pero sí se observa una diferencia marginalmente significativa para la edad de inicio de la enfermedad ( $p = 0.057$ ,  $gl=2$ ) y la edad de muestreo ( $p = 0.02$ ,  $gl= 2$ ). Sin embargo, el análisis de contraste post hoc, según Scheffé, sólo reporta diferencias estadísticamente significativas en las medias de la

edad de muestreo de los sujetos, al 0.05, entre Costa Rica y Escocia ( $p= 0.02$ ). Costa Rica tiene una media de 30.21 años (DE 12.61) y para Escocia se reporta una media de 40.05 (DE 9.06); lo que indica que en promedio, la edad a la cual se tomó la muestra en los pacientes de Escocia fue de alrededor de unos 10 años mayor que para los costarricenses.

Una vez realizado el análisis de varianza, se procedió a realizar un análisis de correlación bivariada entre PAL, SV, AofO y AatS por país, para determinar si las variables independientes, en este caso PAL, VS y AatS, están altamente asociadas entre sí, esto es, si existe colinealidad entre ellas, a la hora de incluirlas en un modelo donde AofO se considera la variable dependiente (Cuadro 4). Para Costa Rica, se observa que SV y PAL probablemente se comportarían como buenos predictores sobre AofO ( $p < 0.05$ ), así, entre mayor el tamaño del alelo, la edad de inicio de la enfermedad es menor (Fig. 5); no obstante, es probable que se necesite regular la edad de muestreo que también resultó ser significativa. De igual forma se observó una alta correlación entre PAL y SV ( $p= 0.003$ ) y entre AatS y SV ( $p= 0.002$ ). Para el caso de Escocia, por el contrario los posibles predictores de la edad de inicio serían AatS ( $p= 0.02$ ) y PAL, aunque la significancia para esta última es marginalmente significativa ( $p= 0.058$ ); por lo que es probable que el tamaño de la muestra esté teniendo un efecto sobre este resultado. En Texas se observa una alta correlación negativa entre AofO con PAL ( $p= 0.004$ ). El análisis de los datos también muestra una correlación positiva entre AofO y AatS ( $p= 0.001$ ); una alta correlación positiva entre AatS y SV ( $p= 0.003$ ) y una correlación marginalmente significativa entre PAL y SV ( $p= 0.066$ ).

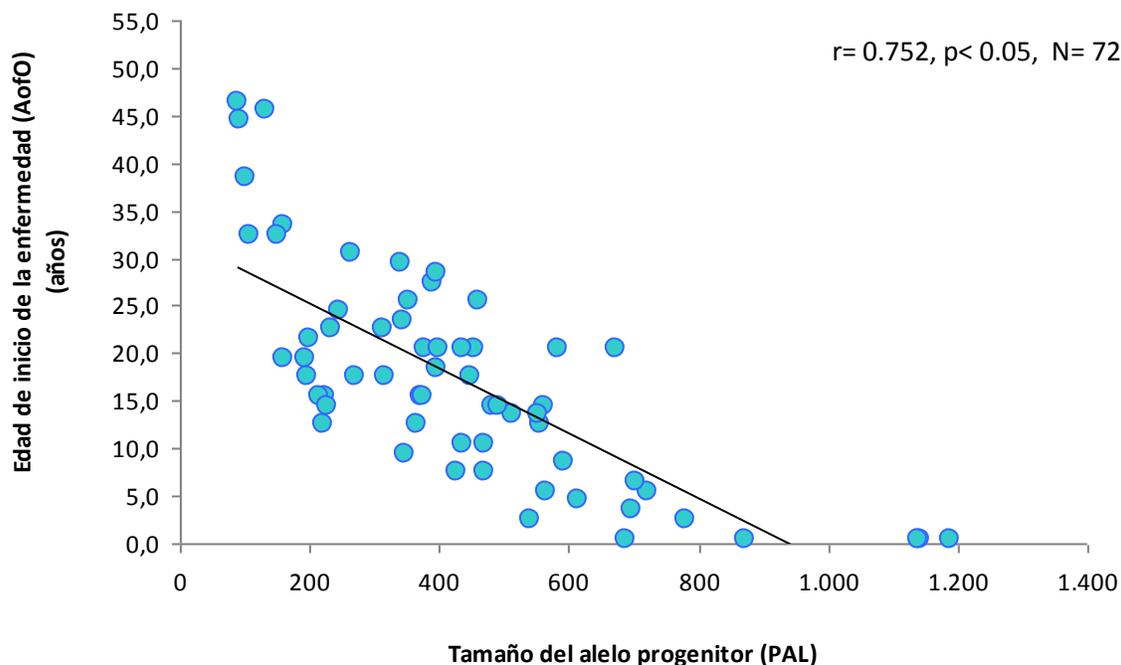
Estos datos por lo tanto, muestran que los principales modificadores de la variación somática son la edad y el tamaño del alelo progenitor.

Cuadro 4. *Resumen del análisis de correlación entre PAL, AatS, SV y AofO por país y de forma agregada.*

		País	PAL	AatS	SV	AofO
AatS	Correlación de Pearson	Costa Rica	<b>-.432(**)</b>			
		Escocia	-.097			
		Texas	-.325			
		Muestra agregada	<b>-.321(**)</b>			
SV	Correlación de Pearson	Costa Rica	<b>.371(**)</b>	<b>.391(**)</b>		
		Escocia	<b>.725(**)</b>	.291		
		Texas	.329	<b>.504(**)</b>		
		Muestra agregada	<b>.460(**)</b>	<b>.397(**)</b>		
AofO	Correlación de Pearson	Costa Rica	<b>-.752(**)</b>	<b>.604(**)</b>	<b>-.269(*)</b>	
		Escocia	-.369	<b>.444(*)</b>	-.219	
		Texas	<b>-.497(**)</b>	<b>.569(**)</b>	-.077	
		Muestra agregada	<b>-.594(**)</b>	<b>.589(**)</b>	<b>-.189(*)</b>	

\*\* La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

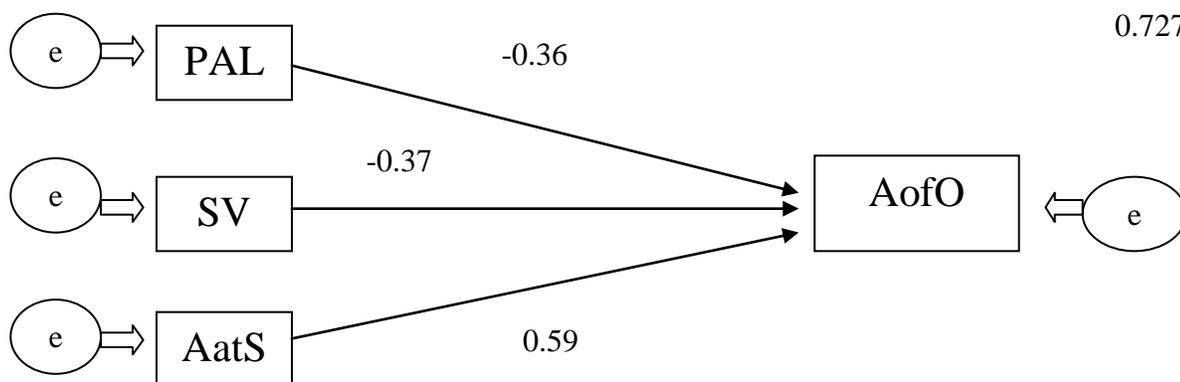


**Figura 5.** Correlación entre el tamaño del alelo progenitor y la edad de inicio de la enfermedad para el caso de Costa Rica. Se observa que cuanto mayor el tamaño del alelo progenitor la edad de manifestación de la enfermedad en los individuos es menor, respecto a aquellos con tamaños de alelo más pequeños.

Al analizar el comportamiento de estas variables de forma agregada, se observa que hay un comportamiento similar en los 3 países para la relación SV-AatS ( $p < 0.05$ ). Se observa que PAL correlaciona negativamente y de forma significativa con la edad de inicio de la enfermedad (AofO) ( $p < 0.05$ ), de forma significativa con la edad de muestreo y con SV ( $p < 0.05$ ). También se observa una correlación significativa entre AatS y AofO ( $p < 0.05$ ) y entre SV y AofO ( $p = 0.037$ ) (Cuadro 4).

Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal utilizando como variables predictoras los puntajes directos de PAL, SV y AatS, como variable dependiente o criterio AofO. Este primer modelo se puso a prueba tanto con los datos agregados como por país. Para los datos de Costa Rica este modelo explicó el 72,7% de la varianza en AofO, ( $r = 0.853$ ,  $p < 0.05$ ,  $gl = 3$ ), el valor beta estandarizado para PAL fue de -0.36, para SV de -

0.37 y para AatS de 0.59. Lo anterior quiere decir que un 27,3% de la variancia residual se puede explicar por otros factores, ya sean genéticos o ambientales (Fig. 6).



**Figura 6.** Modelo que explica el aporte de las diferentes variables sobre la edad de inicio de la distrofia miotónica tipo 1, en la submuestra costarricense.

Para el caso de Escocia, el modelo anterior se estableció, explicando el 33.4% de la varianza de AofO; sin embargo, las betas estandarizadas para PAL (-0.10) y VS (0.29) no son significativas ( $p > 0.05$ ); únicamente AatS presenta una beta estandarizada significativa de -0.52 ( $p < 0.05$ ). Debido a un eventual sesgo de indagación y la elevada correlación entre la AatS y AofO este modelo no es informativo en cuanto a la explicación de la edad de inicio de la enfermedad, pero si es informativo, en contraste con Costa Rica, en cuanto al comportamiento diferencial del potencial predictor de PAL y SV.

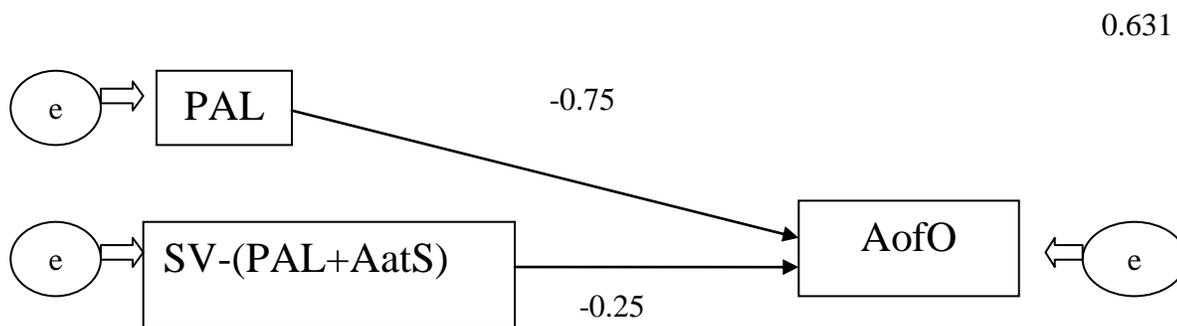
Para el caso de Texas, el modelo explica el 51.1% de la varianza en AofO, con una beta estandarizada para PAL (-0.12) no significativa ( $p > 0.05$ ), para SV (-0.40) significativa ( $p < 0.05$ ) y significativa ( $p < 0.05$ ) para AatS (0.73). Nuevamente nos encontramos con el efecto de indagación entre AatS y AofO, pero con una definición similar del poder predictivo de la variación somática al caso de Costa Rica.

El hecho de que Escocia presente tantas diferencias respecto a Costa Rica y Texas, puede deberse como ya se mencionó anteriormente al tamaño de la muestra analizada o a que estén involucrados otros factores modificadores, tanto genéticos, tales como componentes de los mecanismos involucrados en la duplicación y estabilidad del ADN; como ambientales, entre los que se puede mencionar la dieta de los pacientes entre otros factores (Piñeiro *et al.* 2003).

Como se mencionó anteriormente el modelo también se puso a prueba para los datos de forma agregada, sin embargo no resultó ser informativo porque el mayor peso estadístico lo aporta Costa Rica, y como se observó para el caso de Escocia y Texas no se pudo establecer un modelo informativo significativo, por lo cual en adelante los análisis se realizaron únicamente para las muestras de forma segregada.

Debido a que la forma como se calculó SV y PAL puede tener un efecto sobre este modelo, se hizo el mismo análisis de regresión para cada una de las muestras pero desprendiendo de la variación somática el efecto directo que tienen sobre su medida PAL y AtS (SV-(PAL+AtS)); es decir, se pasó a trabajar con PAL y los residuos obtenidos de quitarle a la SV los efectos de la edad de muestreo y el tamaño del alelo progenitor como variables predictoras de AofO.

Para el caso de Costa Rica, este nuevo modelo logra explicar el 63,1% de la varianza en la AofO con betas estandarizadas significativas ( $p < 0.05$ ) para PAL (-0.75) y Residuos-SV (-0.25) (Fig.7). Para el caso de Escocia el modelo no se establece ( $F = 2.38$ ,  $p > 0.05$ ). En tanto que para Texas, el modelo mejora, explicando un 32,4% de la varianza en AofO y una beta estandarizada significativa ( $p < 0.05$ ) para PAL (-0.49), pero no así para los Residuos-SV (-0.28,  $p > 0.05$ ).



**Figura 7.** Modelo que explica el aporte del tamaño del alelo progenitor (PAL) y los residuos de la variación somática (SV-(PAL+AatS)) sobre la edad de inicio (AofO) de la distrofia miotónica tipo 1 en la submuestra costarricense.

El paso siguiente en los análisis consistió en determinar si se puede obtener evidencia indirecta de que los polimorfismos del MMR se encuentran asociados con un comportamiento diferencial en el tamaño promedio de los residuos de la variación

somática, una vez que a ésta se le ha desagregado el efecto directo del tamaño del alelo progenitor y la edad de toma de muestra. Dado que no tenemos suficiente información para establecer un modelo de herencia que nos determine cuál de los alelos es dominante o recesivo, o bien si es codominante, se pone a prueba un modelo aditivo considerando a cada uno de los tres genotipos posibles como un grupo de contraste. El análisis ejecutado en todos los casos consistió en un contraste de medias para los residuos en la variación somática entre los tres grupos recurriendo al subprograma ONEWAY o análisis de varianza de un solo factor del programa SPSS-14. Los contrastes fueron ejecutados tanto para los datos agregados de los tres países como por país con un nivel alfa de significancia del 5%. Únicamente se presenta una diferencia marginalmente significativa ( $F= 2.85$ ,  $p= 0.086$ ) en el contraste de la muestra costarricense entre los tres posibles genotipos del polimorfismo en el polimorfismo rs2228006:A>G. Este resultado aporta evidencia indirecta de que este polimorfismo pueda actuar como un posible modificador genético de la variación somática residual, teniendo un posible efecto sobre la edad de inicio para el caso de la distrofia miotónica tipo 1. En vista de que la variación somática contribuye con la edad de inicio y progresión de la enfermedad en la DM, modificadores de esa variación somática también pueden ser considerados modificadores de la edad de inicio de la enfermedad, por lo tanto, este polimorfismo podría estar actuando como un modificador de la edad de inicio de la DM a través de su efecto sobre la variación somática residual.

Es necesario analizar otros polimorfismos dentro del mismo gen *PMS2* o bien en otros genes involucrados en el mecanismo de reparación; porque se ha confirmado en modelos de ratón que la deficiencia en *Pms2* estabiliza la repetición CTG, lo que indica que polimorfismos en este gen también podrían estar involucrados en la acumulación de repeticiones CTG en humanos (Gomes-Pereira et al. 2004). Además por la interacción entre *PMS2* y *MLH1* dentro del sistema de reparación es probable que también polimorfismos en el gen *MLH1* estén actuando como modificadores en *trans* del mecanismo de inestabilidad. Y de hecho el equipo de Gomes-Pereira et al. (2004) indica que debido a que también homólogos de MutL podrían estar involucrados en la expansión somática es posible que el sistema MMR completo sea requerido para generar las expansiones, no obstante es necesario seguir analizando tanto los diferentes polimorfismos como las posibles interacciones que se dan entre las proteínas del sistema y las repeticiones.

De hecho análisis realizados anteriormente arrojan evidencia de que también otros polimorfismos en el gen *MSH3* podrían estar involucrados en la variación somática residual que contribuye con la progresión de la enfermedad de DM1 (Morales 2006), pero debido a la ubicación de los polimorfismos en los diferentes genes, estarían contribuyendo de forma diferente a los polimorfismos analizados en esta práctica. De esta forma como rs1105524 y rs1105525 se ubican en la región UTR de *MSH3*, podrían estar afectando la afinidad por los factores de transcripción y por ende la expresión de la proteína MSH3. Así si hay menor expresión como se ha comprobado con modelos de ratón, habría más complejo MSH2-MSH6 por lo que las expansiones serían menores que si en el medio hubiera más MSH3 que capture el MSH2, donde aumenta la estabilidad de los loops que se han formado y por ende se da el aumento de las expansiones. Mientras que para el caso del polimorfismo rs2228006 al producirse un cambio en el aminoácido de la proteína (lisina-ácido glutámico) podría estar afectándose la interacción con otras proteínas del sistema MMR y por ende la efectividad del mismo en la corrección de los errores.

En la base de datos LOVD (Leiden Open Variation Database), al 30 de setiembre de 2009 se reporta 516 variantes para PMS2, 178 correspondientes a variantes únicas de ADN. Dentro de este grupo se reportaron 2 polimorfismos (p.Thr597Ser y p.Met622Ile (rs180534)) en el exón 11 del gen *PMS2*, asociados con HNPCC, que reducen la interacción de la proteína PMS2 con MLH1, pese a que el cambio de aminoácido que producen está fuera del dominio de interacción de la proteína reportado anteriormente (Guerrette & Fishel 1999, Qiang *et al.* 2002); lo que da indicio de que el polimorfismo rs2228006:A>G, también podría estar actuando de forma similar, a través de un efecto en la variación somática residual en enfermedades causadas por mutaciones inestables.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se cumplieron los objetivos propuestos en la práctica.
2. Se implementó el estudio de factores genéticos modificadores en *trans* de enfermedades causadas por mutaciones inestables en Costa Rica, lo que a su vez podría llegar a contribuir con una mejora en el diagnóstico clínico y molecular de estos pacientes.
3. Se encontró una tendencia marginalmente significativa entre el polimorfismo rs2228006:A>G y los residuos de la variación somática que tienen influencia sobre la misma variante AofO.
4. Esta práctica abre paso a futuras investigaciones que ampliarán el conocimiento acerca de factores *cis* y *trans* que afectan de forma diferencial el desarrollo de la enfermedad en pacientes con tamaños de mutaciones similares.
5. Debido a las diferencias encontradas entre Costa Rica y Texas con la muestra de Escocia, se recomienda analizar otros factores genéticos y/o ambientales, como la dieta de los pacientes, agentes mutagénicos, entre otros.
6. Se recomienda analizar polimorfismos en el gen *MLH1*, porque está muy asociado con la inestabilidad microsatelítica en cáncer y debido a su interacción con el gen *PMS2* en el sistema MMR, existe la posibilidad de que pueda estar contribuyendo con el mecanismo de inestabilidad en enfermedades como DM y HD.
7. Debido a los resultados obtenidos para el polimorfismo rs2228006:A>G, es necesario realizar un análisis de expresión de la proteína en pacientes de todas las categorías clínicas y en diferentes tejidos, así como en una muestra control para evaluar la efectividad de la enzima en el sistema de reparación cuando está presente la mutación inestable y cuando no lo está.
8. Otra recomendación es aumentar el tamaño de la muestra, el número de polimorfismos analizados por gen, así como el número de genes involucrados en el sistema de reparación.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, A. & B. Gómez-González. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.* 9: 204-217.
- Alazzouzi, H. 2006. La inestabilidad genómica en cáncer. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. 100 p.
- Aquilina, G. & M. Bignami. 2001. Mismatch Repair in Correction of Replication Errors and Processing of DNA Damage. *J. Cell. Physiol.* 187: 145-154.
- Arnheim, N. & D. Shibata. 1997. DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. *Genetics & Dev.* 7: 364-370.
- Baarends, W.M., R. van der Laan & J. A. Grootegoed. 2001. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 121: 31-39.
- Bertrand P., D. X. Tishkoff, N. Filosi, R. Dasgupta & R. D. Kolodner. 1998. Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. *PNAS* 95: 14278-14283.
- Bickmore, W. A. 2001. Eukaryotic chromosomes. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. Edinburgh, Scotland, UK.: 1-7.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, M. A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G. N. Ranzani & S. Srivastava. 1998. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 5248-5257.

- Brook, J.D., M. E McCurrach, H. G. Harley, A. J. Buckler, D. Church, H. Aburatani *et. al.* 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansión of a trinucleotide (CTG) repeat at 3' end of a transcript encoding a protein kinase family members. *Cell* 68: 799-808.
- Buermeyer, A. B., S. M. Deschênes, S. M. Baker & M. Liskay. 1999. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* 33: 533-64.
- Chow, T.Y-K., M. A. Alaoui-Jamali, Ch. Yeh, L. Yuen, & D. Griller. 2004. The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for câncer. *Mol. Cancer Ther.* 3: 911-9.
- Clearly, J. D. & C. E. Pearson. 2003. The contribution of CIS-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet. Genome Res.* 100: 25-55.
- Coolbaugh-Murphy, M. I., A. Maleki, L. Ramagli, M. Frazier, B. Lichtiger, D. G. Monckton, M. J. Siciliano & B. W Brown. 2004. Estimating mutant microsatellite allele frequencies in somatic cells by small-pool PCR. *Genomics* 84: 419-430.
- Coolbaugh-Murphy, M. I., J. Xu, L. S. Ramagli, B. W. Brown & M. J. Siciliano. 2005. Microsatellite instability (MSI) increases with age in normal somatic cells. *Mech. Ageing Dev.* 126: 1051-1059.
- Cuenca, P. y F. Morales. 1999. Mutaciones inestables: causa de algunas enfermedades neurológicas hereditarias. *Acta Médica Costarricense* 41: 7-15.
- De Souza-Pinto, N., D. Wilson, T. Stevnsner & V. Bohr. 2008. Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration. *DNA repair* 7: 1098-1109.

- Fernández, L. 2004. Estudio de la inestabilidad de repeticiones de trinucleótidos asociadas a enfermedades genéticas humanas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España. 75 p.
- Foiry L., L. Dong, C. Savouret, L. Hubert, H. T. Riele, C. Junien & G. Gourdon. 2006. Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum. Genet.* 119: 520-6.
- Fu Y. H., A. Pizzuti, R. G Fenwick, J. Jr. King, S. Rajnarayan, O. W. Dunne, *et. al.* 1992. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255: 1256-1258.
- Gomes-Pereira M., M. T. Fortune & D. G. Monckton. 2001. Mouse tissue culture models of unstable triplet repeats: in vitro selection for larger alleles, mutational expansion bias and tissue specificity, but no association with cell division rates. *Hum. Mol. Genet.* 10: 845-854.
- Gomes-Pereira M. & D. G. Monckton. 2004. Chemically induced increases and decreases in the rate of expansion of a CAG\*CTG triplet repeat. *Nucleic Acids Res.* 32: 2865-2872.
- Gomes-Pereira M. & D. G Monckton. 2006. Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: What goes up, could come down. *Mutat. Res.* 598: 15-34.
- Guerrette, S., S. Acharya & R. Fishel. 1999. The interaction of the Human MutL Homologues in Hereditary Nopolyposis Colon Cancer. *The Journal of biological chemistry*: 6336-6341.
- Harfe B. D. & S. J. Robertson. 2000. DNA Mismatch Repair And Genetic Instability. *Annu. Rev. Genet.* 34: 359-99.

- Hashem VI, W. A. Rosche, R. R. Sinden. 2002. Genetic assays for measuring rates of (CAG).(CTG) repeat instability in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 502: 25-37.
- Hawn, M. T., A.Umar, J. M. Carethers, G. Marra, T. A. Kunkel, C. R. Boland & M. Koi. 1995. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 55: 3721-3725.
- Hayden, M. R. 2000. Huntington's disease. Pp. 265-280. In S. Pulst (ed). *Neurogenetics*. Oxford University, Inglaterra.
- Hsieh, P. 2001. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research* 486: 71-87.
- Iyer, R. R., A.Pluciennik, V. Burdett & P. L. Modrich. 2006. DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* 106: 302-323.
- Jakupciak, J. & D. R. Wells. 1999. Genetics instabilities in (CTG.CAG) repeats occur by recombination. *J. Biol. Chem.* 274: 23468-23479.
- Jaworski A., W.A. Rosche, R. Gellibolian, S. Kang, M. Shimizu, R. P. Bowater, R. R. Sinden, R. D. Wells. 1995. Mismatch repair in *Escherichia coli* enhances instability of (CTG)<sub>n</sub> triplet repeats from human hereditary diseases. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 92: 11019-11023.
- Kao, J., B. Rosenstein, Sh. Peters, M. Milano & S. Kron. 2005. Cellular Response to DNA Damage. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1066: 243-258.
- Kass, D.H. & Batzer M. A. 2004. Genome organization: human. *Encyclopedia Of Life Sciences* doi: 10.1038/npg.els.0003855.

- Kirkpatrick, D.T. & T. D. Petes. 1997. Repair of DNA loops involves DNA-mismatch and nucleotide-excision repair proteins. *Nature* 387: 929-931.
- Kolodner, R. 1996. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes & Dev.* 10: 1433-1442.
- Kolodner, R. D. & G. T. Marsischky. 1999. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Genetics & Dev.* 9: 89-96.
- Kunkel, T. A. & D.A. Erie. 2005. DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 681–710.
- Lahue R. S. & D. L. Slater. 2003. DNA repair and trinucleotide repeat instability. *Front Biosci*, 8: s653-65.
- Lander, E., L. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. Zody, J. Baldwin, K. Devon, et. al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Mahaden M., C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, Jansen G. et. al. 1992. Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255: 1253-1255.
- Manley K., T.L. Shirley, L. Flaherty, A. Messer. 1999. Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat. Genet.* 23: 471-3.
- Marra, G. & P. Schär. 1999. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem. J.* 338: 1-13.

- Martorel, L., J. Gámez, M. L. Cayuela, F. K. Gould, J. P. McAbney, T. Ashizawa, D. G. Monckton & M. Baiget. 2004. Germline mutational dynamics in myotonic dystrophy type 1 males. Allele length and age effects. *Neurology* 62: 269-274.
- McMurray, C. 2008. Hijacking of the mismatch repair system to cause CAG expansion and cell death in neurodegenerative disease. *DNA repair* 7: 1121–1134.
- Min Li, G. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* 18: 85- 98.
- Mirkin, S. M. 2007. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 447: 932-940.
- Miyaki, M., J. Nishio, M. Konishi, R. Kikuchi-Yanoshita, K. Tanaka, M. Muraoka, M. Nagato, J.-M. Chong, M. Koike, T. Terada, Y. Kawahara, A. Fukutome, J. Tomiyama, Y. Chuganji, M. Momoi & J. Utsunomiya. 1997. Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome. *Oncogene* 15: 2877-2881.
- Modrich, P. & R. Lahue. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 101-33.
- Modrich, P. 1997. Strand-specific Mismatch Repair in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 272: 24727–24730.
- Morak, M. , H. K. Schackert, N. Rahner, B. Betz, M. Ebert, C. Walldorf, B. Royer- Pokora, K. Schulmann, M. von Knebel-Doerberitz, W. Dietmaier, G. Keller, B. Kerker, G. Leitner & E. Holinski- Feder. 2008. Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with *MLH1* promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC. *Eur. J. Hum. Genet.* 1-8.

- Morales F. 2006. Somatic mosaicism and genotype-phenotype correlations in myotonic dystrophy type 1. Ph.D. thesis, University of Glasgow. 187 pp.
- Morales, F. y P. Cuenca. 2004. Aspectos genéticos y moleculares de las enfermedades miotónicas. *Rev. Neurol.* 38: 668-674.
- Myers, R. H., K. S. Marans & M. E. MacDonald. 1999. Huntington's disease, pp.301-323. In R. D. Wells & S.T. Warren (eds). *Genetic instabilities & hereditary neurological diseases*. Academic, California, USA.
- O'Regan, N.E., P. Branch, P. Macpherson & P. Karran. 1996. hMSH2- independent DNA mismatch recognition by human proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 1789-1796.
- Owen, B. A L., Z. Yang, M. Lai, M. Gajec, J. D Badger II, J. J. Hayes, W. Edelmann, R. Kucherlapati, T. M. Wilson & C. T. McMurray. 2005. (CAG)<sub>n</sub>-hairpin DNA binds to Msh2–Msh3 and changes properties of mismatch recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 663–670.
- Owen, B. A. L., W. H. Lang & C. T. McMurray. 2009. The nucleotide binding dynamics of human MSH2–MSH3 are lesion dependent. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 550-557.
- Parniewski P., A. Jaworski, R. D. Wells, R. P. Bowater. 2000. Length of CTG.CAG repeats determines the influence of mismatch repair on genetic instability. *J. Mol. Biol.* 299: 865-74.
- Peakall, R. & P.E. Smouse 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molec. Ecology Notes.* 6: 288-295.
- Pearson, E. C & R. R Sinden. 1996. Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci. *Biochemistry* 35: 5041-5053.

- Pearson C. E, K. N. Edamura & J. D. Cleary. 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat. Rev. Genet.* 6: 729-42.
- Peltomaki P. 2003. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* 21: 1174-9.
- Petruska, J. , M. Harstentine & M. Goodman. 1998. Recent Advances on the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Exp. Neurol.* 157:1-18.
- Piñeiro, E., L. Fernández, J. Gamez, R. Marcos, J. Surrallés & A. Velázquez. 2003. Mutagenic stress modulates the dynamics of CTG repeat instability associated with myotonic dystrophy type 1. *Nucleic Acids Res.* 31: 6733-6740.
- Qiang, Z., B. Gottlieb, L. K. Beitel, N. Wong, P. H. Gordon, Q. Wang, A. Puisieux, W. D. Foulkes & M. Trifiro. 2002. Polymorphismo and HNPCC: PMS2-MLH1 protein interactions diminished by single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mut.* 19: 108-113.
- Rao, K. S. 2007. Mechanisms of Disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nature Clinical Practice (Review)*: 1-11.
- Richards R. I. 2001. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2187-94.
- Rolfmeier M. L., Dixon M. J., Lahue R. S. 2000. Mismatch repair blocks expansions of interrupted trinucleotide repeats in yeast. *Mol. Cell.* 6: 1501-7.
- Rubicz, R.C. 2007. Molecular markers in anthropological genetic studies, p. 141- 186. *In* M.H. Crawford (ed). *Anthropological genetics: theory, methods and applications*. Cambridge University Press.

- Schmidt K. H., Abbott C. M., Leach D. R. 2000. Two opposing effects of mismatch repair on CTG repeat instability in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 35: 463-71.
- Schofield, M. J. & P. Hsieh. 2003. DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 579–608.
- Schumacher S., R.P. Fuchs, M. Bichara. 1998. Expansion of CTG repeats from human disease genes is dependent upon replication mechanisms in *Escherichia coli*: the effect of long patch mismatch repair revisited. *J. Mol. Biol.* 279: 1101-10.
- Schweitzer J. K., D. M. Livingston. 1997. Destabilization of CAG trinucleotide repeat tracts by mismatch repair mutations in yeast. *Hum. Mol. Genet.* 6: 349-55.
- Slebos, R. J. C. M. Li, S. Vadivelu, B. B. Burkey, J. L. Netterville, R. Sinard, J. Gilbert, B. Murphy, C. H. Chung, Y. Shyr & W. G. Yarbrough. 2008. Microsatellite mutations in buccal cells are associated with aging and head and neck carcinoma. *Bri. J. of Cancer* 98: 619-626.
- Strachan, T. & A. P. Read. 2004. *Human molecular genetics*. 3ed. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK. 576 p.
- Van den Broek, W. J. *et. al.* 1992. Somatic expansion behavior of the (CTG)<sub>n</sub> repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and MSH6 mismatch- repair proteins. *Hum. Mol. Genet.* 11: 191-199.
- Vásquez, M., F. Morales, H. Fernández, G. del Valle, J. Fornaguera y P. Cuenca. 2008. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington en Costa Rica. *Acta Méd. costarricense*. 1: 35-41.

- Waring, J. D. & R. Korneluk. 1998. Genetic Studies of the Myotonic Dystrophy CTG repeat. p. 131-146. *In* R. D Wells & S. T. Warren (eds.). Genetic instabilities and hereditary neurological diseases. Academic Press.
- Wei, K., R. Kucherlapati & W. Edelmann. 2002. Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defects. *Trends Mol. Med.* 8: 346-353.
- Wu, Q. & K. M. Vasquez. 2008. Human MLH1 Protein Participates in Genomic Damage Checkpoint Signaling in Response to DNA Interstrand Crosslinks, while MSH2 Functions in DNA Repair. *PLoS Genet.* 4: 1-10.
- Yang, W. 2000. Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutation Research* 460: 245–256.

**ÁPENDICE**

**MATERIALES Y EQUIPO  
DE LABORATORIO**

## **REACTIVOS**

### **Geles de agarosa**

- Agarosa
- Agua destilada
- Buffer TBE 0,5X
- Bromuro de Etidio
- Azul de bromofenol
- Orange G
- Marcador de peso molecular de 50pb

### **PCR**

- Agua destilada
- Buffer 11X
- Buffer 10X-  $MgCl^{2+}$
- Dinucleótidos= dNTP's
- Cloruro de Magnesio=  $MgCl^{2+}$
- Iniciadores
- Taq polimerasa
- Aceite mineral

### **Análisis de restricción**

- Buffer de la enzima
- Enzima de restricción
- Agua destilada
- EDTA

## ***MATERIALES Y EQUIPO***

### **Geles de agarosa**

- Guantes de nitrilo
- Beakers
- Balanza electrónica
- Espátulas
- Canastas para pesar
- Microondas
- Cámaras de electroforesis horizontales
- Fuente de poder
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Descartadores de puntas
- Transiluminador
- Cámara fotográfica

### **PCR**

- Tubos Eppendorf de 1.5, 0.6 y 0.2 $\mu$ L
- Placas de polipropileno para PCR y cubiertas adhesivas.
- Marcadores indelebles
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Descartadores de puntas
- Microcentrífuga
- Termociclador
- Bloques fríos
- Refrigeradora

**Análisis de restricción**

- Tubos Eppendorf de 0.6  $\mu$ L
- Bloques fríos
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Baño María
- Termomixer
- Refrigeradora