



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**SINTESIS *IN VITRO* DE EXPANSIONES DE SECUENCIAS DE  
TRINUCLEOTIDOS REPETIDOS ASOCIADOS A  
ENFERMEDADES HUMANAS.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**SANDRA IRENE VARGAS ARAIZA**

ASESORA: M. en C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA H  
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La tesis: Síntesis in vitro de expansiones de secuencias  
de trinucleótidos repetidos asociados a enfermedades humanas.

que presenta la pasante: Sandra Irene Vargas Araiza  
con número de cuenta: 9361353-4 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de noviembre de 2000.

PRESIDENTE	<u>C.F.E. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>Genl. Sandra Láz Barriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>C.F.E. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>C.F.E. Gabriela Esculante Reynoso</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Gen C. Alejandra Hernández Ceruelos</u>	

## AGRADECIMIENTOS

Gracias le doy a **Dios** por ser mi amigo fiel y estar junto a mí en cada momento, me ha dado el milagro de la vida misma que ha llenado de salud, inteligencia, comprensión y paciencia para lograr cada una de las metas que he forjado en mi camino y por sus bendiciones pero sobre todo le doy gracias porque me ha regalado un ángel.

Con amor  
Sandra.

**Madre** tú eres el ángel que Dios ha puesto a mi lado lleno de dulzura y bondad infinita, eres todo amor y comprensión, gracias por todas tus oraciones y bendiciones, por tus desvelos, cuidados y sufrimientos que pacientemente has soportado para hacer de mí una mujer de bien.

Con amor  
Sandy.

A mis **hermanas y hermanos** que con su entusiasmo y dedicación por el estudio y trabajo han sido para mí ejemplo a seguir, por el cariño y apoyo que me han brindado para seguir adelante, pero sobre todo por creer en mi capacidad para lograr cada una de mis metas.

Con cariño  
Sandy bell.

Al amor de mi vida: **Frank** que con gran paciencia, esfuerzos y desvelos ha hecho posible este pequeño triunfo, gracias por todo tu apoyo, cariño y comprensión, por darme alientos para seguir adelante, por tus sabios consejos y por llenar mi vida de alegrías y felicidad.

Con amor  
Sandy.

A mis **profesores y amigos** por compartir conmigo su conocimiento, por su apoyo, comprensión y amistad.

Con cariño  
Sandra.

# INDICE

GLOSARIO Y ABREVIATURAS	4
RESUMEN	8
1.- INTRODUCCIÓN	9
1.1.- GENERALIDADES	9
1.2.- MECANISMO DE EXPANSIÓN	10
1.3.- PROPIEDADES BIOFISICOQUÍMICAS	16
1.4.- TRINUCLEÓTIDOS REPETIDOS Y ENFERMEDADES	26
1.4.1.- <i>Trinucleótidos CGG/GCC asociados a sitios frágiles en los cromosomas</i>	26
1.4.2.- <i>Síndrome del cromosoma X frágil</i>	27
1.4.3.- <i>X Frágil E (FRAXE)</i>	29
1.4.4.- <i>X Frágil F (FRAXF)</i>	29
1.4.5.- <i>Sitio Frágil 16A (FRA 16A)</i>	30
1.4.6.- <i>Sitio Frágil 16B (FRA 16B)</i>	30
1.4.7.- <i>Sitio Frágil 11B (FRA 11B)</i>	31
1.4.8.- <i>Sitios frágiles en los cromosomas y minisatélites</i>	31
1.4.9.- <i>Enfermedades neurodegenerativas y repetidos CAG/CTG</i>	32
1.4.10.- <i>Atrofia muscular espinobulbar o enfermedad de Kennedy</i>	32
1.4.11.- <i>Ataxia espinocerebral tipo 1</i>	33
1.4.12.- <i>Enfermedad de Huntington</i>	34
1.4.13.- <i>Atrofia dentatorubral-palidoliusiana y síndrome del río Haw</i>	35
1.4.14.- <i>Enfermedad de Machado-Joseph o ataxia espinocerebral tipo 3</i>	36
1.4.15.- <i>Enfermedades neuromusculares y repetidos CTG/GAC</i>	36
1.4.16.- <i>Distrofia miotónica</i>	36
1.4.17.- <i>Ataxia de Friedreich y repetidos GAA/CTT</i>	37
1.4.18.- <i>Epilepsia mioclónica tipo I Unverricht-Lundborg (EPM1) y minisatélites</i>	39
1.4.19.- <i>Características de las mutaciones por expansión</i>	39
1.5.- FUNDAMENTOS	42
1.5.1.- <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	42
1.5.2.- <i>Reacción de fosforilación</i>	43
1.5.1.- <i>Reacción de Ligación</i>	44
2.- JUSTIFICACIÓN	45
3.- OBJETIVOS	45
3.1.- GENERAL	45
3.2.- ESPECÍFICOS	46
4.- HIPÓTESIS	46
5.- METODOLOGÍA	47
5.1.- CONSTRUCCIÓN DE TRINUCLEÓTIDOS REPETIDOS	47
5.2.- PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	48
5.3.- ALINEAMIENTO	49

5.4.- LIGACIÓN	50
5.5.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	51
5.6.- PROGRAMA DE PCR	52
5.7.- TERCERA REACCIÓN DE PCR	54
6.- RESULTADOS	55
7.- DISCUSION	62
8.- CONCLUSIONES	67
9.- ANEXOS	68
9.1.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS. (44)	68
9.1.1.-AGUA DESTILADA FILTRADA Y ESTERIL.	68
9.1.2.-BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL)	68
9.1.3.-TRIS-HCl 2 M pH.8.0	68
9.1.4.-ETILEN DIAMINO TETRACÉTICO (EDTA) 1M pH. 8.0	69
9.1.5.-SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS-BORATOS-EDTA (TBE 5X)	69
9.1.6.-FENOL-TRIS pH. 8.0 (Equilibrado)	70
9.1.7.-REGULADOR AZUL DE BROMOFENOL.	70
9.2.- TECNICAS EMPLEADAS. (44)	71
9.2.1.-Cuantificación de DNA por el método espectrofotométrico.	71
9.2.2.-Extracción con Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico. (25:24:1)	72
9.2.3.-Preparación de un Gel de Agarosa. (figura 23)	73
9.2.4.- Descontaminación de soluciones que contienen BrEt. (44)	75
10.- REFERENCIAS	79

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Tabla 1. Expansión de trinucleótidos repetidos en humanos.</b>	10
Fig. 1 Modelo para la inestabilidad dependiente de la orientación de TR durante la replicación	11
Fig. 2 Modelo para la expansión de TR	13
Fig. 3 Formación de horquillas en TR	15
Fig. 4 Apareamientos incorrectos en estructuras de horquillas que contienen repetidos d(CTG) y d(GTC)	16
Fig. 5 Apareamientos incorrectos en estructuras de horquillas que contienen repetidos d(GAC)	17
Fig. 6 Apareamientos incorrectos en estructuras de horquillas que contienen repetidos d(CGG)	18
Fig. 7 Posibles modelos de mecanismos de protección de interrupciones en repetidos	23
Fig. 8 Estructuras alternativas de DNA formadas por TR	24
Fig. 9 Modelos para estructura S-DNA	25
Fig. 10 Expresión anormal del gen de la Ataxia de Friedreich	37
Fig. 11 Plan de trabajo general	46
<b>Tabla 2. Oligonucleótidos de tripletes repetidos empleados y la enfermedad asociada</b>	47
<b>Tabla 3. Condiciones de reacción de PCR</b>	51
<b>Tabla 4. Tm de los oligonucleótidos y la utilizada en la reacción de PCR</b>	51
<b>Tabla 5. Condiciones de reacción de PCR</b>	52
<b>Tabla 6. Tm de los oligonucleótidos con el sitio <i>Bgl</i>II y la utilizada en la reacción de PCR</b>	53
<b>Tabla 7. Concentraciones finales de cada oligonucleótido</b>	54
Fig. 12 Gel de agarosa. Alineamiento de las secuencias CTG/AGC	54
Fig. 13 Gel de agarosa. Alineamiento de las secuencias CCG/GGC	55
Fig. 14 Gel de agarosa. Alineamiento de la secuencia TTC/AAG	55
Fig. 15 Gel de agarosa. Alineamiento de la secuencia GAC/TCG	56
Fig. 16 Gel de agarosa. Eficiencia de ligación en función de la concentración de oligonucleótidos	56
Fig. 17 Gel de agarosa. Primera ligación de los TR	57
Fig. 18 Gel de agarosa. Comparación de la 2ª y 3ª ligación de las secuencias CTG/AGC y GAC/TCG	57
Fig. 19 Comparación de la 2ª y 3ª ligación de las secuencias GAC/TCG, CCG/GGC y TTC/AAG	58
Fig. 20 Gel de agarosa. Efecto del MgCl <sub>2</sub> en la PCR de la secuencia TTC/AAG	58
Fig. 21 Gel de agarosa. Expansiones y amplificaciones de los TR por PCR utilizando MgCl <sub>2</sub> 9,0 mM	59
Fig. 22 Gel de agarosa. Expansiones y amplificaciones de los TR adicionados del sitio <i>Bgl</i> II	60
Fig. 23. Preparación de un gel de agarosa	76
Fig. 24 Observación y fotografiado del gel de agarosa	77

# GLOSARIO Y ABREVIATURAS

*Abs*: Absorbancia.

*Alelo*: Una de dos (diploide) copias de un gen en el genoma. Si un alelo antes de esto llega a ser mutado es llamado premutación alélica. (46)

*Anticipación*: El aparente incremento en la severidad de la enfermedad o la edad temprana de manifestación en generaciones sucesivas con un desorden hereditario.(8)

*BrEt*: Bromuro de etidio.

*cm*: Centímetro

*Críptica*: Secuencia de trinucleótidos repetidos la cual no es continua y que se encuentra interrumpida por otro tipo de repetidos.

*DM*: Distrofía miotónica.

*DMPK*: Gen de la proteína serina-treonina cinasa.

*DNA*: Acido dexocirribonucleico.

*dNTPs*: Deoxinucleótidos trifosfatados.

*DO*: Densidad óptica.

*dsDNA*: DNA de doble cadena.

*EDTA*: Acido etilendiaminotetracético.

*EM*: Coeficiente de extinción molar.

*Expansión de tripletes repetidos (o trinucleótidos)*: Situación donde tres nucleótidos dentro de un gen son repetidos un número de veces. Esto puede resultar en un fenotipo de enfermedad. (46)

*FMR1 mRNA*: El mRNA transcrito del gen X-frágil. (46)



*FRA11B*: Sitio frágil sensible a folato localizado en la región cromosómica 11q23.3 ligado a la enfermedad denominada síndrome de Jacobsen.

*FRA16A*: Sitio frágil sensible al folato localizado en la región cromosómica 16q13.1.

*FRA16B*: Este sitio frágil es insensible a folato y esta localizado en la región cromosómica 16q22.1

*Fragmentos de Okazaki*: DNA de corta longitud formado sobre la cadena retrasada durante la replicación del DNA. Estos son rápidamente unidos para formar una cadena de DNA continua; la cadena guía es sintetizada continuamente. (46)

*FRAXA*: Sitio frágil sensible a folato ubicado en la banda Xq27.3 del cromosoma X.

*FRAXE*: Igual que FRAXA pero localizado a 600 Kb de este.

*FRAXF*: Igual que FRAXA pero localizado en Xq27-28 y a 600 Kb de FRAXE.

*Inestabilidad*: El número de (perfecto) repetidos que se incrementan en un alelo, la probabilidad de cambiar el número de copias dentro de la premutación o el alineamiento portador, hasta que la expansión se manifiesta como un sitio frágil y/o un efecto fenotípico. La relación entre el número de copias de repetidos y la inestabilidad (manifestada como una predisposición a expansión) es típica del proceso de mutación dinámica (49, 50)

*Islas CpG*: Regiones del genoma involucradas en el inicio de la transcripción que son inusualmente ricas en los nucleósidos C y G y son rodeadas por regiones con un contenido reducido de C y G.(46)

*mA*: Miliamperes.

$\mu\text{g}$ : Microgramos.

$\mu\text{L}$ : Microlitros

$\mu\text{M}$ : Micromolar.

*MgCl<sub>2</sub>*: Cloruro de magnesio.

*mL*: Mililitro.

*mM*: Milimolar.

*Mutación dinámica*: Es un término que ha sido introducido para distinguir diferencias en el número de copias de secuencias repetidas de DNA de otros tipos de mutación, siendo éste un proceso de cambio de material genético que puede ocurrir a través de varias generaciones y solo ha sido encontrada en la especie humana. (49, 50)

*nm*: Nanómetros.

*No críptica*: Secuencia pura e ininterrumpida de trinucleótidos repetidos.

*pb*: Pares de bases.

*PCR*: Reacción en cadena de la polimerasa.

*Polimorfismo*: Es la variación en el número de copias repetidas de cromosoma a cromosoma. (49, 50)

*Premutación o alelos portadores*: Son aquellos que muestran inestabilidad más allá de la transmisión, pero son de insuficiente número de copias para causar enfermedad y/o sitios frágiles. (49, 50)

*RNA<sub>m</sub>*: Acido ribonucleico mensajero.

*SCA1*: Gen relacionado con la ataxia espinocerebral tipo 1 localizado en el cromosoma 6, produce un RNA<sub>m</sub> que codifica para una proteína de función desconocida denominada ataxina 1.

*SSC*: Solución salina de citratos.

*ssDNA*: DNA de cadena sencilla.

*Tándem* : copias múltiples de la misma secuencia consecutivas o adyacentes. (49, 50)

*TBE*: Tris-boratos EDTA.

*TE*: Tris-EDTA

*T<sub>m</sub>*: Temperatura de fusión.

*Trinucleótidos repetidos (TR)*: Son secuencias de tres nucleótidos que se presentan una vez y otra vez en forma consecutiva hasta alcanzar expansiones que pueden llegar a ser hasta de miles de repetidos. Los repetidos expandidos son inestables entre generaciones y somáticamente. (49, 50)

*UTR*. Región no codificante en el DNA.

*UV*: Ultravioleta.

V. Volts.

## RESUMEN

En el genoma de los seres vivos existen secuencias repetidas ampliamente dispersas o en arreglos sencillos en tándem, entre éstas se encuentran los trinucleótidos repetidos (TR) que son secuencias de tres nucleótidos que se presentan una vez y otra vez en forma consecutiva y existen en un rango de entre 5 y aproximadamente 40 repetidos en cromosomas humanos normales, sin embargo, bajo un proceso de mutación dinámica éstos pueden sufrir un incremento en el número de copias y alcanzar expansiones que pueden llegar a ser hasta de miles de repetidos. (49,50)

Los TR se han asociado a enfermedades neurológicas y su estudio se complica debido al alto grado de polimorfismo que presentan y en algunos casos a la riqueza de C y G encontradas en las secuencias de los mismos. (3-5,40) Por esta razón en el presente trabajo, se recurrió a la síntesis *in vitro* de largas expansiones de TR de las secuencias (CCG/GGC)<sub>15</sub>, (TTC/AAG)<sub>15</sub>, (CTG/AGC)<sub>15</sub> asociadas a enfermedades humanas y la secuencia (TCG/GAC)<sub>15</sub> no asociada a enfermedad, éstas se realizaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual también se empleó para adicionar el sitio de restricción *Bgl*/II. Se lograron expansiones semejantes a las encontradas en enfermedades humanas siendo estas de 702 a 1371 pb (49,50)

Con esto se busca facilitar el estudio y entendimiento de las bases moleculares que conducen a enfermedades por expansiones de secuencias de TR evitando depender del uso del material biológico, por otro lado, es una valiosa herramienta que puede ser utilizada para estudiar como se ve afectada la estabilidad del mRNA dentro de la célula o bien pueden crearse sondas para efectuar un diagnóstico molecular directo y oportuno en pacientes predispuestos a presentar alguna enfermedad asociada a TR.

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Generalidades

En el genoma de los seres vivos existen secuencias repetidas que pueden encontrarse ampliamente dispersas o en arreglos sencillos en tándem (copias múltiples de la misma secuencia que son adyacentes) (32). En los últimos años se ha descubierto un nuevo mecanismo de enfermedad genética en la que participan secuencias de tres nucleótidos o trinucleótidos (TR), los cuales se repiten y se presentan una y otra vez en forma consecutiva hasta alcanzar expansiones que llegan a tener una longitud de miles de repetidos de tal forma que pueden interrumpir o comprometer un gen (47). Estos se han estudiado en el humano, además de otras especies animales, en éste se han detectado expansiones de 5 o más tripletes repetidos (TR) relacionados con al menos 50 genes diferentes. (9, 30, 34, 46, 49, 50). La variación en el número y longitud de unidades repetidas en tándem ocurre en diferentes escalas y estas se clasifican en:

- a) Secuencias microsatélite ó repetidos cortos en tándem (simples): arreglos de nucleótidos repetidos cortos que comprenden de 2 a 6 pb. Estos se han encontrado en genomas de vertebrados, insectos y plantas, al menos 30 000 localizaciones de microsatélites están presentes en el genoma humano, localizados en la eucromatina.
- b) Secuencias minisatélite: arreglos de repetidos más largos, alrededor de 15-200 pb. Se encuentran en regiones eucromáticas del genoma de vertebrados, hongos y plantas.
- c) Secuencias satélite: Unidades que pueden tener una longitud similar a las micro ó minisatélites ó ser mucho más largas, aproximadamente 140-200 pb de longitud y pueden ser extendidos hasta megabases. Se encuentran agrupados en regiones heterocromáticas de cromosomas cercanos a los centrómeros, telómeros y en el cromosoma Y. (9, 24, 34, 46)

Entre los repetidos consecutivos simples, están los TR sin embargo aún no se aclara cual es su función biológica, éstos pueden sufrir un incremento en el número de copias por un proceso de mutación dinámica, que es un cambio en el material genético que ocurre a través de varias generaciones generando enfermedad.(49,50)

Los arreglos expandidos de TR se han asociado con enfermedades genéticas, en las cuales un TR normalmente polimórfico sufre un cambio mutacional donde el repetido expande su longitud, a veces extraordinariamente (Tabla 1). Esta mutación dinámica es diferente a las mutaciones convencionales porque el repetido puede sufrir cambios con las generaciones siguientes (expansión continuada). La magnitud de la expansión se relaciona en parte a la longitud del repetido emparentado. En aquellas expansiones que resultan en fenotipo, la expansión siguiente del repetido en la generación descendiente puede llevar a patrones de herencia no Mendeliana fenómeno clínicamente referido como "anticipación" debido a la penetrancia incompleta y/o a la expresividad variable, la cual puede ser directamente correlacionada con la longitud de la expansión, en un nivel molecular, la "anticipación" genética es acompañada por un incremento en el número de TR dentro del locus de la enfermedad. (5, 11, 17, 28, 29, 35, 42, 49)

## **1.2.- Mecanismo de expansión**

El mecanismo de expansión de TR es completamente desconocido. Para explicarlo se han propuesto varias hipótesis que involucran replicación aberrante o recombinación de cadenas intermedias en las que ocurre un pequeño deslizamiento dentro de los TR que gradualmente permite expansiones más largas, seguida por la formación de estructuras tallo-burbuja u horquilla y un rápido incremento de la expansión a gran escala (Fig.1). Por ejemplo, pueden ocurrir expansiones largas cuando la longitud de TR incrementa más allá del tamaño de un fragmento de Okasaki, de tal forma que los extremos 3' y 5' de un fragmento naciente sufren deslizamiento cuando están dentro de la región de repetidos de DNA. (35, 46)

Tabla 1. Expansión de trinucleótidos repetidos en humanos

Locus	Enfermedad	Alelos repetidos		Localización del repetido	Consecuencia funcional de la expansión.
		Normal	Mutante		
FMRI (FRAXA)	Síndrome del X frágil	(CGG) <sub>6-52</sub>	(CGG) <sub>60-200</sub> (previa) (CGG) <sub>230-1000</sub> (completa)	5'UTR	Pérdida de función del sitio frágil.
FRAXE	Retardo mental frágil XE	(GCC) <sub>7-35</sub>	(GCC) <sub>130-150</sub> (previa) (GCC) <sub>230-750</sub> (completa)	ND*	Perdida de función del sitio frágil
FRAXF	Ninguno	(GCC) <sub>6-29</sub>	(GCC) <sub>300-1000</sub>	ND	Sitio frágil
FRA16A	Ninguno	(CCG) <sub>16-49</sub>	(CCG) <sub>1000-1900</sub>	ND	Sitio frágil
FRA11B (CBL2)	Predisposición hacia el síndrome Jacobsen en la descendencia (11q-)	(CGG) <sub>11</sub>	(CGG) <sub>80</sub> (previa) (CGG) <sub>100-1000</sub> (completa)	5'UTR	Sitio frágil
AR	Atrofia muscular bulbar y espinal.	(CAG) <sub>11-33</sub>	(CAG) <sub>38-66</sub>	Codificante	Ganancia y pérdida parcial de función
SCAI	Ataxia espino-cerebellar tipo 1 Ataxia espino-cerebellar tipo 1	(CAG) <sub>6-39</sub>	(CAG) <sub>41-81</sub>	Codificante	Ganancia de función
Hdh (IT15)	Enfermedad de Huntington	(CAG) <sub>10-35</sub>	(CAG) <sub>36-121</sub>	Codificante	Ganancia de función
B37 (DRPLA)	Atrofia Dentatoribral-palidolusiana, Síndrome de Haw River (variante fenotípica)	(CAG) <sub>7-25</sub>	(CAG) <sub>49-75</sub> (CAG) <sub>63-68</sub>	Codificante	Ganancia de función
MJD1 (SCA3)	Enfermedad de Machado-Joseph	(CAG) <sub>12-37</sub>	(CAG) <sub>61-84</sub>	Codificante	Ganancia de función
DMPK	Distrofia miotónica	(CTG) <sub>5-37</sub>	(CTG) <sub>50-3000</sub>	3'UTR	Procesamiento del mensaje DMPK anormal.

\*No determinado. (Tomado de referencia 5)

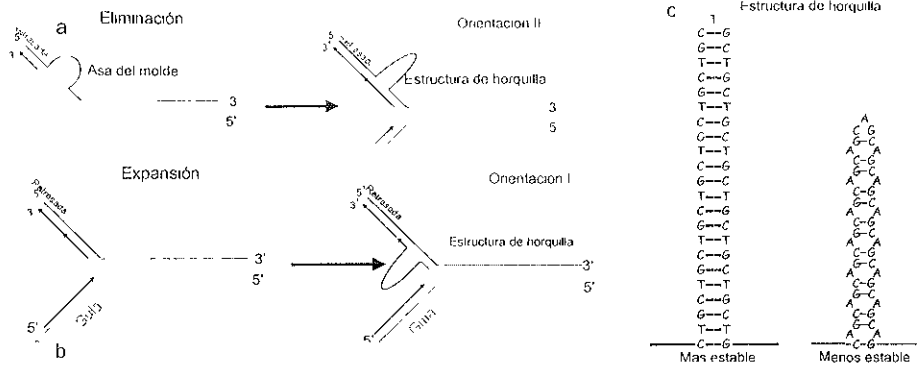


Fig.1 Un modelo para la inestabilidad dependiente de la orientación de TR durante la replicación. A) Delección: la horquilla fuera del molde en la cadena retrasada favorece la formación de una estructura de horquilla que es pasada por la DNA polimerasa. B) Expansión: la horquilla fuera del DNA nuevamente sintetizado en la cadena retrasada causa replicación del repetido en la región que contiene el repetido. C) posibles estructuras de horquilla adoptadas por CTG y CAG en DNA de cadena sencilla. (tomado de 46)

Se ha propuesto que en el mecanismo para la expansión a gran escala de TR ricos en CG (CNG, donde N = A, T, G o C) ocurre una variación en la estabilización en las horquillas de la polimerasa. En la enfermedad la expansión de TR ocurre en un número limitado de secuencias y requiere una extensión de repetidos largos. Las secuencias características de enfermedad para los repetidos tipo CNG pueden ser explicadas por la formación de horquillas en el DNA. Las secuencias CNG que se expanden son aquellas que forman estructuras de horquillas *in vitro*. La expansión de TR CNG *in vivo*, parece requerir un umbral de longitud de la horquilla antes de existir una probable expansión significativa. (19)

Las horquillas se forman más fácilmente en haploupos predispuestos a enfermedad (p. ej. en la enfermedad de Huntington) y la interrupción de secuencias asociadas con alelos estables desestabiliza horquillas en regiones repetidas; así, las estructuras secundarias explican la selectividad de secuencias de expansiones CNG. El deslizamiento de la polimerasa es parte de algunos modelos de mecanismos de la inestabilidad de TR, durante la replicación de una secuencia de DNA con TR, la cadena guía y la cadena molde se separan transitoriamente y entonces al reasociarse pueden adquirir una configuración mal alineada (Fig. 2). Si las



bases no apareadas están en la cadena guía la síntesis continua resultando en un alargamiento de la secuencia, mientras que si están en la cadena molde el resultado es una eliminación. (48) La pérdida o ganancia de secuencias repetidas de DNA ocurre porque los errores resultantes del deslizamiento de la cadena durante la replicación del DNA permanecen sin corregir como resultado de una reparación defectuosa del heterodúplex posterior a la replicación (25) El deslizamiento es más probable si la extensión de repetidos es largo, sin embargo, la probabilidad de deslizamiento entre 29 y 39 repetidos, en el umbral para la inestabilidad de CAG en la enfermedad se incrementa modestamente, mientras que la frecuencia de inestabilidad lo hace dramáticamente en este rango, por ejemplo en la Enfermedad de Huntington. (19)

Las horquillas pueden estabilizar un evento de deslizamiento. Es posible que repetidos largos expandidos se requieran para formar horquillas de estabilidad suficiente. Sin embargo, si la inestabilidad ocurre por un sencillo evento de estabilidad de horquillas largas ¿Por qué la expansión no esta típicamente asociada con regiones palindrómicas que también pueden formar horquillas? Alternativamente, la expansión puede ser la suma de muchos pequeños eventos de deslizamiento, también pequeñas formaciones de horquillas en palíndromas. Sin embargo, si horquillas cortas forman varios deslizamientos a lo largo de un repetido largo, entonces, la inestabilidad puede ocurrir en repetidos largos que tienen un cambio de valor por debajo de 29 a 35 repetidos CNG. Expansiones de repetidos cortos y secuencias palindrómicas pueden teóricamente formar horquillas pero ninguno se expande típicamente, además, la capacidad del DNA para formar estructuras secundarias es necesaria pero no suficiente para explicar las características de expansión en enfermedades humanas. El DNA dúplex repetido puede tener por sí mismo propiedades únicas que pueden contribuir a la expansión. Alternativamente, horquillas formadas de TR largos pueden interactuar de forma diferente con su medio ambiente (incluyendo cadenas complementarias) o tienen propiedades estructurales únicas que dirigen la expansión. Si el deslizamiento ocurre, entonces, la cadena deslizada compete con la unión por sí misma (formación de horquilla) o con su pareja heterodúplex para el realineamiento del dúplex. (19)

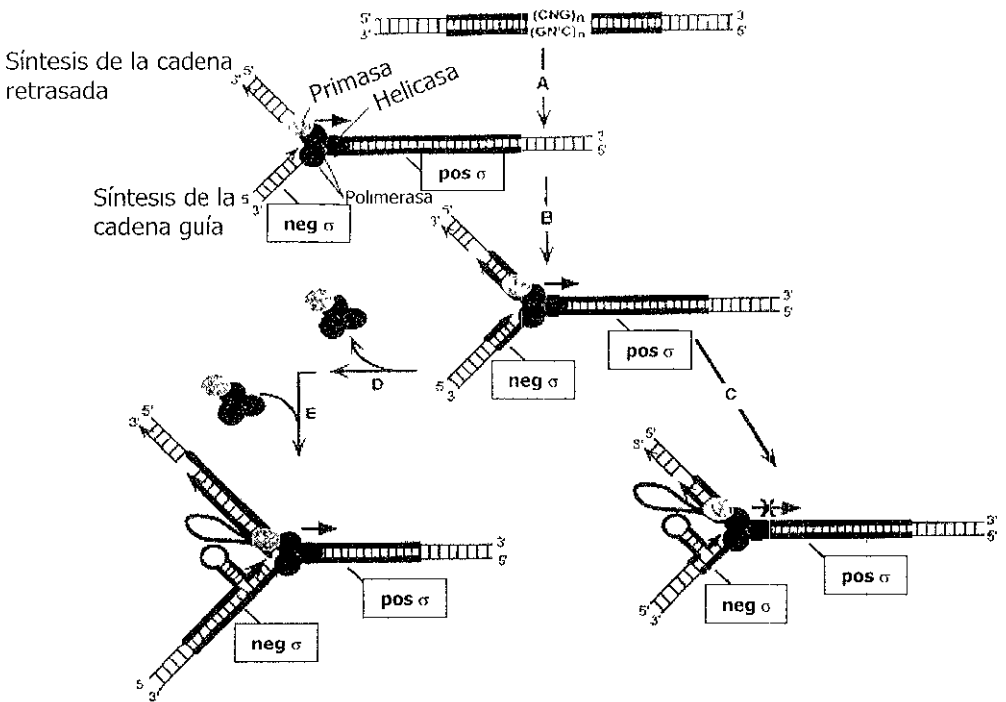


Fig. 2 Modelo para la expansión de TR. Las líneas gruesas representan regiones de TR, las líneas delgadas representan secuencias de DNA al azar flanqueándolas. N representa nucleótidos T o G, N' representa nucleótidos A o C. Pos  $\sigma$  y Neg  $\sigma$  indica superenrollamiento positivo y negativo respectivamente. En el paso A, la maquinaria sintética del DNA (primasa/helicasa/polimerasa) avanza a lo largo del DNA en un promedio normal de aproximadamente 1000 nucleótidos por cadena. En el paso B, sobre el alargamiento de la longitud óptima de TR con la más alta contorsión el complejo enzimático crea regiones de superenrollamiento positivo denso hacia el frente y una densidad negativa hacia atrás del ensamble. La acumulación de las guías anteriores al hiperenrollamiento de la hélice enfrente del complejo, impide a las topoisomerasas remover eficientemente el superenrollamiento positivo. Esto en su momento puede causar el estancamiento del complejo (paso C) o el separamiento de su sustiato para liberar la tensión (paso D). En el caso anterior, la pausa en la maquinaria sintética tendería a disminuir su procesividad y por consiguiente la fidelidad en la síntesis del DNA, lo cual, en cambio, facilitaría el promedio de síntesis reiterativa de DNA, en el segundo caso la expansión (paso E) ocurriría como resultado de un incremento en la densidad negativa de la superhélice detrás del complejo (debido a la inherente contorsión dentro de los TR largos, la energía creada con esto viaja a lo largo de la hélice de DNA) en cambio, esto facilitará la fusión local de pocos TR y el subsecuente realineamiento crea un dúplex mal apareado (paso D y E). En el acoplamiento de los TR los repetidos deslizados serán expandidos por la polimerasa. (tomado de 20)

Gacy y McMurray encontraron que las estructuras de horquilla en repetidos largos inhiben el porcentaje de formación del heterodúplex por arriba de dos órdenes de magnitud comparado con secuencias que son incapaces de formar horquillas estables, todavía las estructuras de horquillas no alteran la cinética de formación relativa del dúplex al azar en secuencias sin estructura. Sus datos sugieren un modelo en el cual el tiempo de vida del estado estable más que la capacidad para formar horquillas es la fuerza principal que conduce la expansión. Adicionalmente el modelo provee una razón para los repetidos largos pero no para la expansión de repetidos cortos o palíndromas. Fig. 3 (19)

Hay dos clases generales de expansiones de TR. La primera son expansiones relativamente pequeñas (2 a 3 veces la longitud normal). Por ejemplo en los repetidos CAG/CTG dentro de una región codificante de un gen se expande de un rango normal de 5 a 35 copias hacia un rango de aproximadamente de 40 a 100 copias, resultando en un tramo expandido de poliglutamina en la proteína. Esta categoría de expansión de TR se ha encontrado en 5 desórdenes neurodegenerativos, incluyendo la Enfermedad de Huntington. Existen evidencias que sugieren que la patología dominante de estas enfermedades se debe a una estrecha interacción entre la proteína con el tramo de poliglutamina extendido y otras proteínas en el cerebro. (5, 16)

La segunda clase de expansiones de TR involucra grandes expansiones (10-100 veces la longitud normal), en algunos casos tantos como 2000 o más repetidos, en regiones no codificantes, estas grandes expansiones de repetidos disminuyen la producción de proteínas de un gen cercano, ya sean a nivel transcripcional o postranscripcional, con la disminución, se causa el fenotipo de la enfermedad. Por ejemplo, la expansión de un tramo de CTG/CAG localizado en la región 3' no codificante del gen de la proteína serina-treonina cinasa (DMPK) es responsable de la distrofia miotónica (DM), un desorden autosómico dominante que es la forma más común de la distrofia muscular del adulto. (5, 16)

### 1.3.- Propiedades biofísicoquímicas

Estudios bioquímicos y biofísicos recientes revelan que es más probable que ocurra la expansión de los TR cuando adoptan estructuras helicoidales inusuales de DNA, horquillas en cadena sencilla y estructuras de cadena deslizada en moléculas de DNA dúplex y triplex intramoleculares, éstas se forman en condiciones fisiológicas de osmolaridad, temperatura y estabilidad; además pueden actuar como un interruptor estructural que ofrece un nuevo modo para la modulación de la expresión génica. (1, 2, 7, 29)

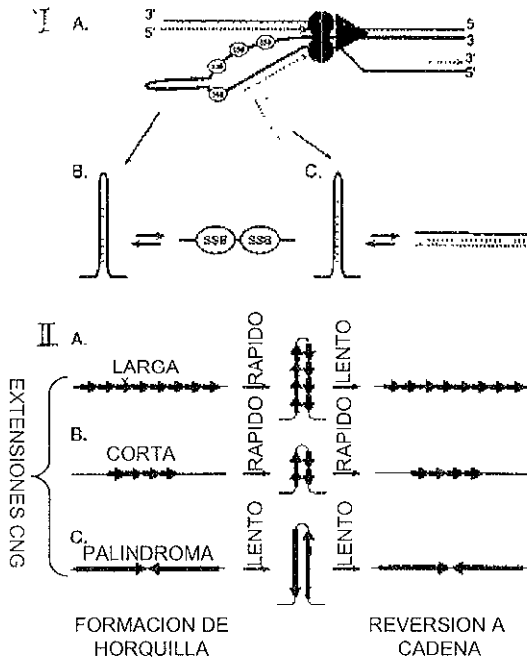


Figura 3: Formación de horquillas en TR. Solo repetidos largos están probablemente formando horquillas durante la replicación. (Panel I) Competición para la formación de horquilla durante (A) la replicación o por la unión a proteínas de la cadena sencilla (B) si la horquilla se forma en la cadena retardada (C) o si la horquilla se forma en la cadena complementaria sobre una cadena guía replicada o en la cadena retrasada replicada. (Panel II) La probabilidad de formación de estructuras durante la replicación. (A) una larga extensión de repetidos puede rápidamente formar una horquilla, debido a la degeneración de posibles apareamientos. Una vez formada, esta regresará lentamente al estado de cadena sencilla (B) una extensión de repetidos cortos puede rápidamente formar una horquilla pero también regresará rápidamente al estado de cadena sencilla, (C) una región palindrómica formará lentamente una horquilla debido al apareamiento exacto requerido para la formación. Una vez formada, sin embargo, ésta será estable y lentamente regresará al estado de cadena sencilla (tomado de 19)

Durante la replicación del dsDNA ocurre la separación de las cadenas moldes en la horquilla de replicación, durante este evento se pueden formar estructuras secundarias de ssDNA, compuestas de secuencias de TR, variando de acuerdo al triplete de que se trate, una o más de estas estructuras inusuales o formas alternativas del DNA pueden ser responsables de la inestabilidad genética de estos repetidos facilitando los errores durante la replicación, reparación o recombinación del DNA. Al realizar estudios bioquímicos y biofísicos de dichas secuencias como oligonucleótidos de cadena sencilla se lograron determinar las siguientes características (11, 28, 29, 42):

(CTG)<sub>n</sub>: Las estructuras tallo-burbuja que contienen (CTG)<sub>n</sub> tienen apareamientos erróneos de T-T, los cuales están bien apilados en la hélice y contienen 2 puentes de hidrógeno formados entre el O2 y N3 y N3 y N4 (Fig. 4), (29, 38)

(GTC)<sub>n</sub>: Al igual que el anterior tiene apareamientos erróneos de T-T bien apilados en la hélice, pero son estructuras más inestables, a pesar de que el apareamiento es idéntico al de (CTG)<sub>n</sub>. La inestabilidad de la horquilla puede ser causada por una disminución de energía en las bases apiladas intracadena (Fig.4).

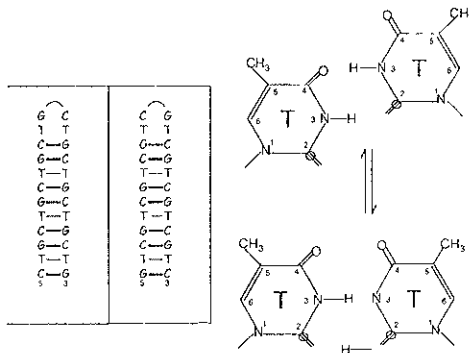


Fig.4: Apareamientos incorrectos de pares de bases en estructuras de horquillas que contienen secuencias de repetidos d(CTG) y d(GTC). Las líneas gruesas indican los apareamientos correctos y las líneas delgadas entre los pares de bases claros denotan apareamientos incorrectos. En la representación molecular se muestra como se establecen las uniones por puentes de hidrógeno entre las bases mal apareadas. (tomado de 29)

(GAC)<sub>n</sub>; En este caso los apareamientos erróneos contenidos en las estructuras tallo-burbuja son A-A y también están bien apilados en la hélice. Las secuencias de DNA que contienen (GAC)<sub>n</sub> pueden adoptar una estructura de doble cadena paralela en condiciones ácidas, en condiciones neutras se favorece la estructura tallo-burbuja. Los apareamientos erróneos entre A-A contiene un puente de hidrógeno formado entre N1 y N6 (Fig. 5)

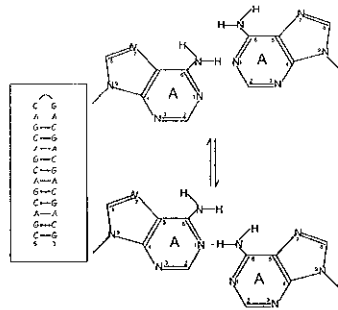


Fig.5: Apareamientos incorrectos de pares de bases en estructuras de horquillas que contienen secuencias de repetidos d(GAC). Las líneas gruesas indican los apareamientos correctos y las líneas delgadas entre los pares de bases claros denotan apareamientos incorrectos. En la representación molecular se muestra como se establecen las uniones por puentes de hidrógeno entre las bases mal apareadas. (tomado de 29)

(CAG)<sub>n</sub>; Las estructuras formadas por estos repetidos son menos estables que las formadas por (GAC)<sub>n</sub>, además los apareamiento A-A no están bien apilados en la hélice, son un poco flexibles y no contienen puentes de hidrógeno. (29, 38)

(CGG)<sub>n</sub>; Estos repetidos forman estructuras tallo-burbuja y estructuras de 4 cadenas, esta estructura es muy estable debido a que los apareamientos G-G formados causan una mínima distorsión en la hélice de DNA. En horquillas adyacentes que contienen secuencias de repetidos (CGG)<sub>n</sub> se pueden formar puentes de hidrógeno entre las citosinas y las guaninas formando así apareamientos correctos entre C-G formando estructuras de cuatro cadenas (Fig.6).(29, 58, 59)

(CCG)<sub>n</sub>: Las estructuras tallo-burbuja adoptadas por estos repetidos son diferentes, de las 8 posibilidades de apareamientos erróneos los C-C de estas secuencias son reparados con menor eficiencia por bacterias ó mamíferos; se sugiere que estas citosinas mal apareadas son muy flexibles porque no se han descubierto puentes de hidrógeno en este par. (29, 58)

Las citosinas están localizadas simétricamente en el surco menor de la hélice formada, pero fuera de ella. Debido a la naturaleza de éstas, la estructura [(CCG)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> se ha denominado “arreglo e” ó extra-hélice, en esta estructura para lograr el acomodo de las citosinas el esqueleto de azúcar-fosfato esta muy distorsionado, de esta forma las citosinas pueden interactuar con algunas otras citosinas en el surco menor.

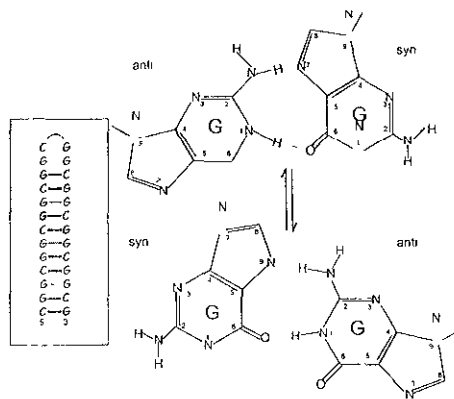


Fig.6: Apareamientos incorrectos de pares de bases en estructuras de horquillas que contienen secuencias de repetidos d(CGG). Las líneas gruesas indican los apareamientos correctos y las líneas delgadas entre los pares de bases claros denotan apareamientos incorrectos. En la representación molecular se muestra como se establecen las uniones por puentes de hidrógeno entre las bases mal apareadas. (tomado de 29)

La formación de horquillas o dúplex en cadenas ricas en G depende del número de TR, de la secuencia del DNA y la concentración de sal. A concentraciones bajas de sal (5mM de NaCl) predomina la conformación de horquilla y a 200 mM de NaCl la principal conformación encontrada es la dúplex. Sin embargo, a concentraciones de sal de 5 y 200 mM de NaCl las cadenas ricas en C solo presentan estructuras de

horquilla. Lo que demuestra que las cadenas ricas en C forman más fácilmente estructuras de horquillas que las cadenas ricas en G y por lo tanto pueden expandirse preferentemente durante la replicación *in vitro*. Se ha visto también que los repetidos menores a 50 pb son más estables y la inestabilidad de repetidos es cuando llegan a presentar una longitud de más de 50 pb (58, 59), en donde pueden formar estructuras más complejas con dos o tres horquillas de tamaño similar. Una posible explicación es que las cadenas con más TR tienen más grados de libertad y contribuyen a formar varias horquillas más cortas en lugar de una sola más larga. (38)

(GAA)<sub>n</sub>: La estructura tallo-burbuja formada por este repetido parece contener pares de bases A-G; adicionalmente es posible que esta secuencia se establezca por las interacciones con los apareamientos erróneos A-A.

La secuencia (TTC)<sub>n</sub> complementaria de (GAA)<sub>n</sub> y las secuencias (GAT)<sub>n</sub> y (ATC)<sub>n</sub> no muestran una estructura secundaria predominante al ser analizados por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida, modificación química y digestión con nucleasa P1. (Datos no publicados por Mitas).

Por otro lado la movilidad electroforética de las cadenas de DNA simula un movimiento de reptación de una serpiente debido a que las cadenas migran a lo largo de su eje, por lo que la movilidad electroforética depende en gran medida de la longitud de la cadena; cuando en la secuencia del DNA se encuentran TR formando estructuras especiales el comportamiento de la movilidad electroforética de éstas es anormal, por ejemplo fragmentos de DNA con TR CTG migran 20% más rápido de lo esperado esto se considera como un 20% de incremento en la longitud del DNA y que esto quizá se deba a que existen doblamientos de la cadena cuando hay secuencias que contienen CTG o CGG. Por ejemplo, un fragmento de repetidos (CTG)<sub>17</sub> de 164 pb migra como de 156 pb. (10)



Por otra parte, las diferencias entre las secuencias repetidas dinucleótidos y los TR son. los cambios en las secuencias de los dinucleótidos (eliminaciones o incrementos) son más pequeños, ocurren a través del genoma y son causadas por defectos en el sistema de reparación; mientras que los cambios en el número de secuencias de TR asociados con enfermedad son más grandes, se localizan en genes específicos y no involucran el sistema de reparación. En conclusión los mecanismos que llevan a la expansión de TR son diferentes de los que llevan a la inestabilidad de los dinucleótidos; una implicación de la expansión de secuencias repetidas es conducida por la capacidad de ciertos TR para formar las estructuras inusuales de DNA antes mencionadas. (29)

Aunque teóricamente pueden formarse estructuras de cadena deslizada dentro de corrimientos de TR largos, no hay evidencias concluyentes de que tales estructuras estén presentes. Usando oligonucleótidos cortos, recientemente se ha demostrado que cadenas sencillas de CTG, CAG, CGG o CCG pueden formar estructuras de horquilla dúplex intracadena y que cadenas sencillas conteniendo CGG forman estructuras cuadrúplex, para la formación de DNA-no-B por TR CAG, se ha descrito una dependencia de  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . (12, 13, 24, 35)

Otras estructuras alternativas de DNA (no B) tales como las cruciformes, DNA-Z levógiro, y estructuras triplex intramoleculares *in vivo* pueden formar elementos de DNA en el orden de la secuencia definida: repetidos invertidos, fragmentos purina-pirimidina [(GC) o (AC) ] alternados y fragmentos de homopurina-homopiridina conteniendo repetidos simétricos (espejo) [ejemplo:(GA) $n$  y (G) $n$ ] respectivamente. Mutaciones espontáneas en células procarióticas y eucarióticas (incluyendo al humano) frecuentemente son asociadas con elementos de la secuencia del DNA que pueden formar estructuras alternativas de DNA-no-B (35). Se ha descrito que los TR no presentan las mismas propiedades del DNA-B. Primero porque las secuencias de TR CTG muy grandes facilitan el ensamble del nucleosoma el cual

puede reprimir la transcripción. Segundo, la síntesis de DNA *in vitro* de fragmentos que contienen TR CTG y CGG en una localización específica es pausada. Tercero, fragmentos largos de TR AAG y AGG forman tripletes intramoleculares que detienen la síntesis de DNA. Cuarto, los TR CTG y CGG migran un 30% más rápidamente de lo esperado en una electroforesis en gel de poliacrilamida, mientras que es normal en geles de agarosa. Quinto, los TR CTG son preferentemente expandidos en *Escherichia coli* comparados con los otros nueve TR. Sexto, la frecuencia de expansiones y eliminaciones en *E. coli* está influida por la dirección de replicación sugiriendo la formación de horquillas estables en la cadena guía o en la síntesis de la nueva cadena naciente. (6, 19)

Entendiendo la formación, estructura y estabilidad de las estructuras de cadena deslizada en los TR podría contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares responsables de su inestabilidad. El proceso donde DNAs de cadena sencilla es realineado para formar doble cadena ocurre en una variedad de procesos biológicos tales como, transcripción, recombinación, reparación y replicación. Imitando este proceso por desnaturalización y realineamiento del DNA se han detectado nuevas estructuras de DNA formadas dentro de fragmentos (CTG)<sub>n</sub> y (CGG)<sub>n</sub> de las localizaciones de la Distrofia Muscular y FRAXA, respectivamente. (35)

Las estructuras de DNA alternativas, las cuales son determinadas S-DNA tienen las siguientes características: 1) Los nuevos productos son compuestos de cadenas complementarias, 2) pueden formarse de igual longitud de TR en las dos cadenas, 3) la estructura anormal ocurre dentro del fragmento de repetidos, es subdirigida por DNA lineal dúplex, su formación no requiere tensión superhelicoidal, y las estructuras están remarcadamente estables bajo condiciones fisiológicas, 4) en las nuevas estructuras, las cadenas CAG tienen una mayor caracterización de cadena sencilla que la complementaria CTG, como lo indica la reactividad preferente de la nucleasa *mung bean* de la cadena conteniendo CAG. (35-37)

Los resultados son consistentes con la formación de cadenas deslizadas en las estructuras de DNA. (Figura 7 A). Estas estructuras son consistentes con la posibilidad de que en cromosomas humanos estas estructuras alternativas pueden formarse dentro de los TR en un locus particular. Debido a la naturaleza de las unidades repetidas las cuales pueden formar múltiples formas de malos apareamientos, se espera un alto grado de variabilidad estructural en la cadena deslizada de la estructura de DNA dentro de un corrimiento de TR. Estos están en contraste a las conformaciones definidas como cruciformes, DNA-Z, o estructuras triplex intramoleculares en las cuales la estructura hélice alternativa es claramente definida por la secuencia primaria del DNA. (35)

En fragmentos de TR largos, la longitud del deslizamiento hacia fuera de las regiones, así como, su posición puede variar como se ilustra en la figura 7A. La variación de la extensión del deslizamiento puede ocurrir ya sea en dirección 3' o 5' (Figura 7A) y el número de regiones deslizadas por repetido contenido en la cadena también puede variar (Figura 7 B, C). El modelo complejo de múltiples productos indican un alto grado de polimorfismo conformacional siguiendo las reacciones de redúplex CTG o CGG. (35)

Las estructuras alternativas S-DNA, presumiblemente DNA de cadena sencilla, pueden estar involucradas en la inestabilidad de TR y su expansión dentro de la célula (36, 37), otra función biológica posible de las estructuras alternativas puede existir. El DNA deslizado en repetidos en tándem ha sido hipotetizado por participar en diferentes procesos biológicos incluyendo evolución genética, mutagénesis vía pequeñas inserciones y/o eliminaciones, también como enfermedades genéticas humanas involucrando eliminaciones y/o expansiones. Estas estructuras pueden ser reconocidas por proteínas celulares en una fase de estructura específica e influenciar en la transcripción o replicación. Es posible que fragmentos de TR largos conteniendo estructuras alternativas alteren la estructura cromosomal de tal forma que hay una metilación alterada retardando la replicación, disminuyendo la transcripción o fragilidad cromosómica. (35) (Fig. 8 y 9).

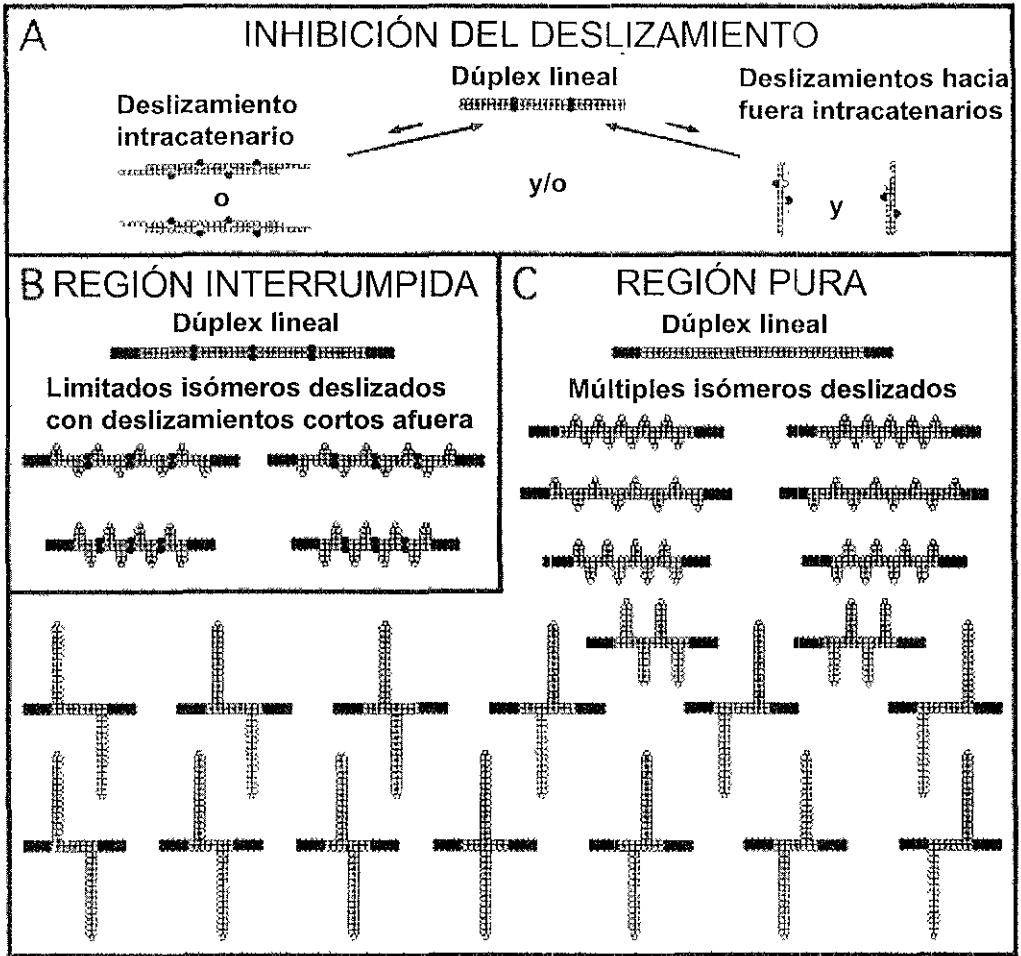
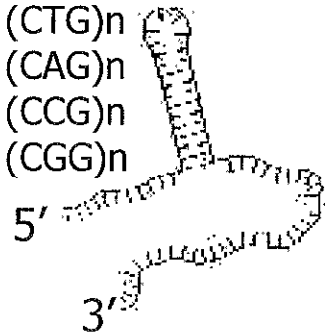


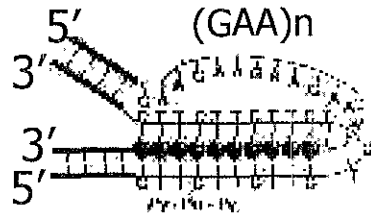
Fig. 7. Posibles modelos de mecanismos de protección de interrupciones en repetidos. (A) Para SCA1 y FRAXA, los círculos abiertos representan repetidos (CAG)-(CTG) y (CGG)-(CCG) respectivamente, mientras los círculos llenos representan las interrupciones (CAT)-(ATG) y (AGG)-(CCT). (B) La reducción en isómeros S-DNA formados en los fragmentos interrumpidos pueden ser debidas a la limitación de las posiciones y por lo tanto el número de repetidos deslizados hacia fuera. (C) El fragmento puro puede tener deslizamientos hacia fuera en puntos nucleares através del fragmento de repetidos, también como un número mayor de repetidos contenidos en un deslizamiento hacia fuera. En B y C los círculos llenos en los extremos representan secuencias no repetitivas flanqueando. (tomado de 36)

El descubrimiento de secuencias repetidas altamente polimórficas en genomas eucarióticos ha permitido el desarrollo de nuevas y valiosas tecnologías para identificar polimorfismos dentro de genomas, basándose inicialmente en el descubrimiento y uso de secuencias repetidas dentro de regiones no codificantes del gen de la mioglobina humana. Estas secuencias repetidas expandidas se denominan ahora minisatélites porque su secuencia de repetición distorsiona localmente el promedio de bases AT/CG. El estudio de DNA genómico digerido con enzimas de restricción con esas secuencias repetidas inesperadamente reveló que el número de copias de los repetidos difiere ampliamente entre los individuos. (55)

### A. Estructura de horquilla



### B. Tripletes intramoleculares tipo Hy3



### D. Estructura de cadena deslizada

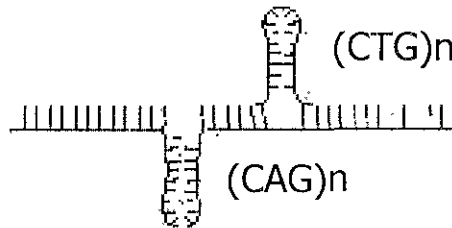


Fig. 8. Estructuras alternativas de DNA que pueden ser formadas por TR asociados con enfermedades genéticas humanas. A) estructuras de horquilla, B) Tripletes intramoleculares, C) Estructura de cuadruplete y D) Estructura de cadena deslizada. (tomado de 45)

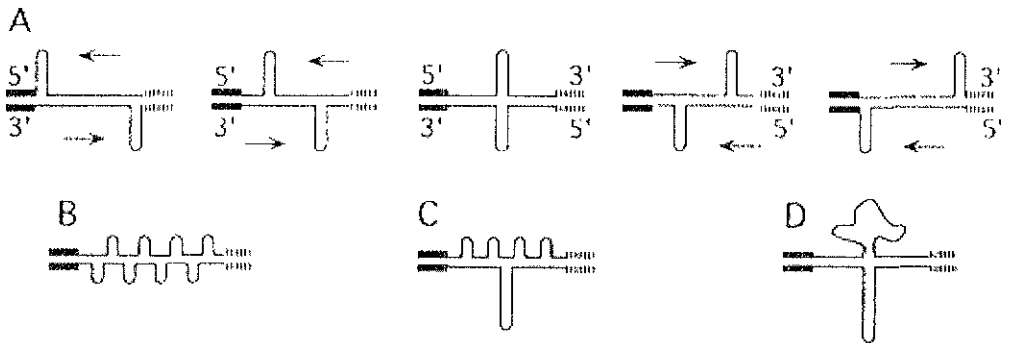


Figura 9: Modelos para estructura S-DNA.

- A. Debido a la naturaleza repetitiva de las secuencias de tripletes, una variedad de estructuras de (S-DNA) DNA de cadena deslizada puede formarse dentro de un fragmento de TR. Un número de estructuras diferentes son posibles en las cuales la posición y longitud de la región deslizada hacia fuera varía. En las estructuras mostradas, la longitud de la cadena deslizada hacia fuera en ambas cadenas complementarias son idénticas, aunque esto puede no ser un requerimiento para estructuras alternativas de TR. Las líneas delgadas representan TR, donde las barras sólidas o líneas interrumpidas representan flaqueados, secuencias únicas de DNA.
- B. Posible S-DNA con múltiples regiones deslizadas hacia fuera en ambas cadenas complementarias.
- C. Estructuras con múltiples regiones deslizadas hacia fuera en una cadena y un brazo de horquilla sencilla en la cadena opuesta.
- D. Posibles estructuras alternativas de TR en los cuales una horquilla se ha formado solamente en una cadena. La cadena opuesta puede estar inapareada (o en un colapso pero no una estructura con apareamiento de bases). (tomado de 35)

## 1.4.- Trinucleótidos Repetidos y Enfermedades

### 1.4.1.- Trinucleótidos CGG/GCC asociados a sitios frágiles en los cromosomas

La secuencia CGG/GCC por lo regular se localizan en las regiones no codificadoras de distintos genes y cuando se expanden, se asocian con sitios frágiles en los cromosomas. Al menos siete sitios frágiles en cromosomas humanos han sido caracterizados, los cuales son visibles citogenéticamente como un adelgazamiento en regiones específicas de los cromosomas en metafase. (3-5, 8), las patologías y los trinucleótidos asociados a sitios frágiles se describen a continuación.

### **1.4.2.- Síndrome del cromosoma X frágil**

El síndrome se caracteriza por un sitio frágil sensible a folato ubicado en la banda Xq27.3 del cromosoma X, denominado FRAXA, que está asociado al retraso mental hereditario más frecuente en los seres humanos. Alteraciones craneofaciales y macroorquidismo son otras de las características asociadas al síndrome. Esta enfermedad presenta un patrón de herencia dominante ligado al X, con penetrancia incompleta en las mujeres y tiene una incidencia de 1 por cada 1,250 hombres nacidos vivos y 1 en cada 2,500 - 3,000 mujeres. (3-5, 8)

Mediante la técnica de clonaje posicional, se aisló el gen FMR1 en 1991, responsable del síndrome del cromosoma X frágil. El gen tiene en su extremo 5', una región polimórfica de repetidos crípticos CGG interrumpidos por tripletes AGG principalmente en las posiciones 10 y 20. El número de repetidos es de 6 a 52 en personas no afectadas, en portadores se presentan de 180 a 200 copias (540-600 pb) denominándose premutación y de más de 200 en los enfermos, en donde se denomina mutación completa (5, 20). Hay un tercer grupo de individuos que presentan lo que se denomina premutación, en donde el número de los trinucleótidos está entre los valores normales y los de mutación completa. No existen en estos últimos sujetos alteraciones fenotípicas relacionadas con el síndrome y se les consideran portadores, ya que tienen una probabilidad alta de tener individuos afectados en la siguiente generación. La expansión de los repetidos en los descendientes de estos individuos solamente se ha descrito por vía materna. El tamaño de repetidos en los afectados depende del número que de éstos tenga la madre, por ejemplo, si la madre tiene 90 o más repetidos todos sus hijos de sexo masculino tendrán más de 200 y manifestarán el retraso mental asociado con la enfermedad. Se ha descrito en algunos pocos casos, regresión de repetidos sólo por vía paterna. El mosaico germinal es común en los individuos con mutación completa. Esto sugiere que la expansión de repetidos es un nuevo evento postzigótico. (3-5, 8)

Se ha observado metilación en el promotor del gen FMRI y en los repetidos cuando el número de éstos es mayor de 200, lo que provoca la inhibición de la transcripción. Se cree que la ausencia del mRNA es la causa de la enfermedad. La ausencia de expresión del gen FMRI en enfermos del síndrome, que tiene eliminaciones o mutaciones puntuales en este gen y no tienen expansión de los tripletes CGG, confirma que el gen FMRI es el responsable de esta enfermedad (3-5)

Gracias al análisis de las secuencias de los repetidos del gen FMR en diferentes poblaciones humanas, se cree que la secuencia ancestral relacionada con el síndrome fue una secuencia pura de CGG, carente de las interrupciones AGG. Esto plantea una posible explicación para la expansión de los repetidos, en la que la DNA polimerasa, copia equivocadamente varias veces la misma secuencia de repetidos, durante la replicación de la hebra rezagada del DNA. (3-5)

El gen FMRI se localiza en una región de aproximadamente 38 Kb del cromosoma Xq 27.3 y está formado de 17 exones. Su expresión se ha descrito en distintos tejidos, siendo la máxima en el cerebro, testículos y ovarios. Existe empalme ("splicing") alternativo en el extremo 3' del gen que genera diferentes proteínas con pesos comprendidos entre 39-90 Kd. Esta familia de proteínas denominadas FMRP, de las que se desconoce su función, se localiza principalmente en el citoplasma, aunque también se han detectado señales en núcleo. Existen dos regiones conservadas en las FMRPs de unión a RNA.

Se estima que aproximadamente 4% de mRNA de cerebro fetal de rata interactúa con las FMRPs. Recientemente se demostró que una isoforma de las FMRPs presenta dos señales de exportación: una citoplasmática y otra nuclear y que se asocian a la subunidad ligera del ribosoma, posiblemente al inicio de la traducción. (3-5)



### **1.4.3.- X Frágil E (FRAXE)**

El descubrimiento de un sitio frágil diferente a FRAXA en el cromosoma X, se obtuvo a partir de individuos que citogenéticamente fueron positivos para el sitio frágil, pero no presentaban expansión de repetidos en el gen FMRI. Este nuevo sitio sensible a folatos denominado FRAXE se localiza a 600 Kb de FRAXA, hacia el telómero y presenta repetidos de GCC. Los límites normales van de 7 a 35, en individuos que presentan el sitio frágil son de 230 a 750 y en mujeres portadoras que no manifiestan el sitio frágil son de 130-150. (3-5, 8)

Más de 150 repetidos correlacionan con una metilación anormal en una secuencia probablemente reguladora, localizada aproximadamente a 1Kb de la región de los repetidos. La expansión de los repetidos en esta región, al igual que en el gen FMRI, se da por vía materna, aunque hay unos pocos casos en los cuales ésta se da por vía paterna. Se ha informado que algunos individuos con expansión en esta región presentan un coeficiente intelectual subnormal, con valores de IQ de 60 a 80. El gen relacionado con esta alteración no se ha aislado aunque se cree que está en una región de aproximadamente 200 Kb de FRAXE. (3-5, 8)

### **1.4.4.- X Frágil F (FRAXF)**

Es el tercer sitio frágil sensible al folato en la región del cromosoma Xq27-28. Se encuentra aproximadamente a 600 Kb de FRAXE y presenta repetidos CGG. Los individuos con el sitio frágil tienen de 300 a 1000 repetidos GCC metilados. Los rangos en los repetidos en los individuos sin el sitio frágil van de 6-29 y no están metilados. Hasta el momento no se han detectado alteraciones fenotípicas en los individuos con la expansión, probablemente por que no existen genes en esa región genómica. (3-5, 8)

#### **1.4.5.- Sitio Frágil 16A (FRA 16A)**

Se localizó un sitio frágil sensible al folato en la región cromosómica 16q13.1, con repetidos CGG. Los rangos de estos tripletes en individuos que expresan el sitio frágil van de 1000 a 1900 y en los que no lo tienen van de 16-49. Como se da en el caso del gen FMR1 asociado al síndrome del cromosoma X frágil, los repetidos también se encuentran metilados, cuando son más de 1000 y la expansión se da preferentemente por vía materna. No se han descrito alteraciones fenotípicas asociadas a la expansión de estos repetidos, aunque esto puede deberse a la falta de individuos homocigotos. (3-5, 8)

#### **1.4.6.- Sitio Frágil 16B (FRA 16B)**

Este sitio insensible a folato se localiza en la región cromosómica 16q22.1. Se induce por los fármacos antivirales y antitumorales Distamicina A y Netropsina, que interactúan con regiones ricas en AT o por bromodeoxiuridina, el cual sustituye a la timina en el DNA. Esta región se aisló recientemente mediante clonaje posicional y está formada por un repetido rico en AT de 33 nucleótidos, aunque también se han encontrado repetidos con tamaños de 26 a 37 nucleótidos. En los individuos que no manifiestan el sitio frágil, el repetido de 33 nucleótidos varía de 7 a 12 copias. En los individuos que manifiestan el sitio frágil, el número de copias del repetido de 33 nucleótidos es de más de 2000. No se han descrito alteraciones fenotípicas asociadas a la expansión de este minisatélite. (3-5, 8)

### **1.4.7.- Sitio Frágil 11B (FRA 11B)**

En la región cromosómica 11q23.3 se encontró otra región frágil sensible al folato, que esta ligada a la enfermedad denominada síndrome de Jacobsen. Este síndrome de eliminación cromosómica en 11q se caracteriza por un grave retraso mental en los individuos afectados. (3-5, 8)

Los puntos de rompimiento para la eliminación relacionada con el síndrome de Jacobsen y el sitio frágil localizan en la banda 11p23.3, donde se encuentra el proto-oncogene CBL-2. Este gen presenta repetidos CGG en su extremo 5', y en los individuos que expresan el sitio frágil hay más de 100 repetidos metilados. (3-5, 8)

En aproximadamente un tercio de las familias con el síndrome de Jacobsen con la eliminación 11q, se encontró expansión de los repetidos CGG del proto-oncogen. Esto sugiere que la expansión podría inducir la eliminación que ocasiona el síndrome. Por otro lado, no esta claro si la metilación de los repetidos afecta la expresión de CBL-2, como sucede en el caso del gen FMR1. De ser así, no sería posible que CBL-2 ocasionara un tipo de cáncer, ya que un oncogen se comporta como dominante. (3-5, 8)

### **1.4.8.- Sitios frágiles en los cromosomas y minisatélites**

Se ha demostrado que en al menos cinco sitios frágiles sensibles al folato en los cromosomas humanos, la presencia de TR del tipo CGG está relacionada con la inducción del sitio frágil. Recientemente se demostró que en un sitio frágil sensible a Distamicina A, la secuencia involucrada es un repetido de 33 nucleótidos. Por lo tanto, el fenómeno de expansión también puede ser ocasionado por minisatélites. (3-5, 8)

### **1.4.9.- Enfermedades neurodegenerativas y repetidos CAG/CTG**

Se han descrito hasta el momento cinco padecimientos neurodegenerativos relacionados con la expansión de repetidos CAG. Todos ellos tienen en común que la expansión no es tan grande como en el caso de los sitios frágiles, y que los repetidos se encuentran en la región codificadora de los genes. Esto ocasiona que en estas alteraciones exista una ganancia de función y no una pérdida, como sucede en el síndrome del cromosoma X-frágil. (3-5, 8), los padecimientos se describen a continuación.

### **1.4.10.- Atrofia muscular espinobulbar o enfermedad de Kennedy**

Es una neuropatía motora de adultos que presenta un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. La alteración se manifiesta entre la tercera a quinta década de la vida y se caracteriza a nivel clínico por temblores de los músculos terminales, disfagia, reducción de fertilidad, atrofia testicular y ginecomastia en hombres y degeneración de neuronas motoras. (3-5, 8)

En 1991 se descubrió el gen del receptor a andrógeno (AR) en Xq12, relacionado con la enfermedad. En su primer exón existe una región variable de repetidos CAG, que codifica para glutaminas. Los límites normales de repetidos van de 11 a 30 y de 38 a 66 en la expansión. La inestabilidad en un 75% de los casos es por expansión y el resto por contracción en el número de repetidos. En esta enfermedad se presenta el fenómeno de "anticipación", ya que existe una alta correlación entre el número de repetidos y la edad de aparición de la enfermedad. Se cree que el exceso de glutaminas en el producto del gen AR, que es un factor de transcripción, modifique la expresión de distintos genes, lo que ocasionaría la degeneración neuronal. (3-5, 8)

### **1.4.11.- Ataxia espinocerebral tipo 1**

Esta enfermedad neurodegenerativa, con un patrón de herencia autosómico dominante se caracteriza por ataxia, disfagia, neuropatía periférica y degeneración muscular. La enfermedad tiene una manifestación variable que oscila de los 4 a los 70 años. En familias con la alteración, la manifestación temprana de la enfermedad ocurre en las generaciones finales, lo cual confirma un fenómeno de "anticipación".

En 1994 se aisló el gen SCA1 relacionado con la enfermedad, localizado en el cromosoma 6. Las personas que no tienen la enfermedad presentan en la región codificadora del gen de 6 a 39 repetidos de CAG, los afectados tienen de 41 a 81 tripletes. El fenómeno de "anticipación" se ha comprobado a nivel molecular, pues existe una relación inversa entre la edad de manifestación de la enfermedad y el número de repetidos y una correlación entre la gravedad de la enfermedad y el número de repetidos. La expansión se ha descrito solamente por vía paterna. Es interesante notar que la secuencia de repetidos CAG en los individuos no afectados por esta ataxia es críptica (con tripletes diferentes) en 98% de los casos estudiados, puesto que hay dos interrupciones en las posiciones 13 y 15 con el triplete CAT y no es críptica (con tripletes iguales) en 100% de los alelos con expansión. La falta de las interrupciones en los alelos con la expansión podría favorecerla de una forma similar a la del gen FMR1. (3-5, 8)

El gen SCA1 está formado de nueve exones distribuidos sobre 450 Kb del cromosoma 6. Produce un mRNA de distribución ubicua formado de 10,660 nucleótidos. Sorprendentemente el marco de lectura del transcrito es de solamente 2448 nucleótidos y codifica para una proteína de función desconocida denominada ataxina 1, con un peso molecular de 87 KD. Mediante inmunohistoquímica se ha localizado esta proteína en el núcleo de neuronas, en el citoplasma de células de músculo estriado y en núcleo y citoplasma de células de Purkinje. También se demostró la presencia de ataxina normal y mutante en células de enfermos de esta ataxia. (3-5, 8)

### **1.4.12.- Enfermedad de Huntington**

Esta alteración autosómica dominante tiene incidencia de uno por cada 10, 000 individuos en la población caucásica y se caracteriza por trastornos en el movimiento. Las características clínicas asociadas a la enfermedad son un declinamiento cognoscitivo progresivo y corea que generalmente se manifiestan en la edad adulta, aunque también se han descrito casos juveniles. En 1993 se aisló el gen IT15, relacionado con la enfermedad. Se localiza en el cromosoma 4p16.3 y tiene una región polimórfica de repetidos CAG en el exón 1, con valores de 10 a 35 en personas no afectadas y de 36 a 121 en las que tienen la enfermedad. La amplificación de repetidos es por vía paterna preferencialmente y en las familias afectadas que se han estudiado existe el fenómeno de la "anticipación" . (3-5, 21)

El gen IT15 está formado de 8 exones distribuidos en una región genómica de 180 a 200 Kb del cromosoma 4p16.3. Su transcrito se ha encontrado en el cerebro y otros tejidos y produce una proteína de 340 KD de función desconocida denominada hungtintina, que se encuentra principalmente en el citoplasma. Los individuos afectados por esta enfermedad expresan el transcrito y la proteína normal y mutada. Se demostró en fecha reciente que la hungtintina es sustrato de la apopaina, una cistein-proteasa involucrada en la muerte celular programada o apoptosis. Esta proteasa utiliza como sustrato a la glutamina de la hungtintina. En estudios *in vitro* se demostró que a mayor cantidad de este aminoácido en la hungtintina hay más digestión por la apopaina. Este dato es importante porque podría explicar la conexión entre el número de repetidos en exceso en los individuos con expansión y la degeneración neuronal, lo que sería resultado de un problema con la apoptosis. (3-5, 21)

### **1.4.13.- Atrofia dentatorubral-palidoliusiana y síndrome del río Haw**

Esta neuropatología autosómica dominante se caracteriza por ataxia cerebelar y demencia. Los enfermos de menos de 20 años presentan epilepsia mioclónica progresiva y retardo mental. Es una alteración rara con una prevalencia de 1/1 millón en japon. Se aisló en 1994 un gen relacionado con la enfermedad denominado DRPLA, localizado en el cromosoma 12p y tiene repetidos de CAG en su región codificadora. Los límites normales van de 7 a 25 y los de expansión de 49 a 75. Esta se ha observado solamente por vía paterna y en las familias estudiadas con la alteración se ha descrito el fenómeno de "anticipación". (3-5, 8)

El gen DRPLA produce un mRNA ubicuo de 4.5 Kb, presente principalmente en cerebro, ovarios, testículos y próstata. La proteína producida por el transcrito es de 1184 aminoácidos. Los individuos afectados presentan una proteína normal y una mutada de mayor tamaño debido a un mayor número de glutaminas. (3-5)

El síndrome del río Haw es un padecimiento neurodegenerativo, autosómico dominante, parecido a la atrofia dentatorubral, se ha informado en una sola familia afroamericana. Este padecimiento se diferencia de la atrofia dentatorubral por la ausencia de epilepsia mioclónica. Probablemente esta alteración es una variedad alélica de la atrofia dentatorubral, pues los individuos afectados por el síndrome presentan expansión de CAG en el gen DRPLA. (3-5, 8)

Mediante un estudio de la frecuencia de repetidos CAG en el gen DRPLA en distintas poblaciones humanas se demostró que el alelo normal con 19 repetidos es más frecuente en la población japonesa (7.4%) que en la afroamericana (1%) y en la caucásica (0%). Esto podría explicar la mayor prevalencia de los alelos con expansión en esta población asiática. (3-5, 8)

#### **1.4.14.- Enfermedad de Machado-Joseph o ataxia espinocerebral tipo 3**

Esta enfermedad se hereda de manera autosómica dominante y se caracteriza por una degeneración espinocerebral. El gen MDJ1 relacionado con la alteración, se localiza en el cromosoma 14q32.1 y presenta en su región codificadora una región polimórfica de repetidos CAG cuyos límites en personas no afectadas va de 12 a 37 y en los que presentan la expansión de 61 a 84. El fenómeno de expansión se ha observado tanto por vía materna como paterna, sin embargo, el número de repetidos es mayor por vía paterna. La proteína producida por el gen MNJ1 tiene 359 aminoácidos y no se conoce su función.

#### **1.4.15.- Enfermedades neuromusculares y repetidos CTG/GAC**

Hasta el momento sólo se ha descrito una alteración neuromuscular relacionada con la expansión de repetidos CTG, la distrofia miotónica. El fenómeno de expansión en esta enfermedad tiene varias diferencias respecto a la de los sitios frágiles y a las enfermedades neurodegenerativas. (3-5)

#### **1.4.16.- Distrofia miotónica**

Esta miopatía se hereda en forma autosómica dominante. Es la distrofia muscular más común en los adultos. Las características fenotípicas relacionadas con esta alteración son muy variables, pudiéndose presentar miotonía, debilidad muscular progresiva, alteraciones cardíacas, cataratas, atrofia testicular o calvicie frontal. En las formas congénitas se presenta retraso mental. Se ha descrito el fenómeno de "anticipación" en las familias afectadas. (3-5, 56). El gen DM responsable de la enfermedad se localiza en el cromosoma 19q13.3, presenta una región polimórfica de repetidos CTG en su región 3', con valores de 5 a



37 en personas no afectadas y de 50 a más de 3000 en los afectados. La expansión de TR se da por vía materna y pocos casos se han descrito por vía paterna. Debido a que existe mosaico somático para los TR CTG en los individuos afectados, se cree que la expansión es un suceso postzigótico. (3-5, 8)

El gen DM esta formado de 15 exones y su transcrito se ha localizado en músculo esquelético y cardíaco. La proteína que produce es del tipo protein-cinasa Ser/Tre y se localiza en las uniones neuromusculares. Existe controversia respecto al efecto de los repetidos CTG en la expresión del gen DM; en algunos trabajos se ha informado que los repetidos en exceso no afectan la transcripción y en otros se demostró lo contrario. Wang y colaboradores demostraron que la cantidad de RNAs poliA en células musculares de enfermos por esta miopatía, es menor que en células musculares de individuos sin la enfermedad. Este dato sugiere que el producto del gen DM podría tener un efecto negativo en la regulación genética de muchos genes.(3-5, 56)

#### **1.4.17.- Ataxia de Friedreich y repetidos GAA/CTT**

La ataxia de Friedreich es la más frecuente, con una prevalencia de 1/ 50,000 recién nacidos vivos y una estimación de 1/70 a 1/110 posibles portadores. Tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y se caracteriza por deformaciones esqueléticas, cardiomiopatía y diabetes mellitus en aproximadamente 10% de los enfermos; aparece antes de los 25 años y muestra una amplia variabilidad fenotípica y edad de manifestación, lo que sugiere un fenómeno de "anticipación". (3-5, 15, 43)

En 1996 se aisló el gen responsable de esta alteración denominado X25, localizado en el cromosoma 9q13. El gen produce una proteína de 210 aminoácidos conocida como fraxina, de función desconocida. En el intrón de 1 de este gen existe una región de repetidos variables de GAA (Fig. 10). Los límites normales van

de 7-22 y en la expansión van de 200 a 1186, ésta se ha determinado en linfocitos de los enfermos, más no se sabe si existe en las células de los órganos blancos como corazón, hígado, músculo esquelético, páncreas y cerebro. Se ignora de qué manera el exceso de TR en un intrón de este gen podría ocasionar la enfermedad, aunque está demostrado que los niveles de mRNA para la frataxina son menores en los enfermos de esta ataxia (27, 43)

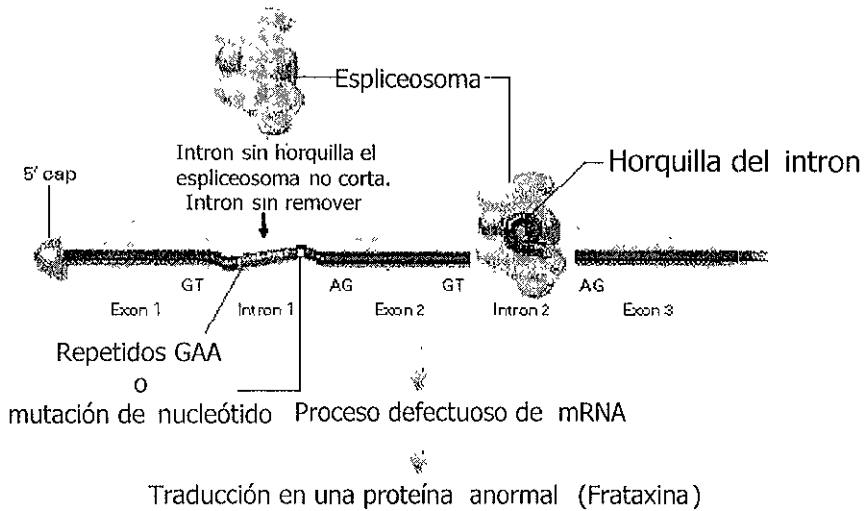


Fig.10. Expresión anormal del gen de la Ataxia de Friedreich. La expresión del gen requiere el procesamiento del transcrito primario (pre-mRNA), el cual contiene exones e intrones. Como parte de este proceso la unión del espliceosoma al DNA y la remoción de intrones cortando el RNA en las interfaces entre exones e intrones. Horquillas de secuencias de intrones son formadas en el curso de esta excisión como se muestra en el intron normal 2. En el gen frataxin, la expansión de GAA en el intron 1 o la mutación en un nucleótido del mismo, postula que el proceso de corte y activación del espliceosoma es defectuoso, resultando en un proceso alterado del mRNA. El procesamiento defectuoso de éste afecta la traducción de la proteína. En este caso el resultado son bajos o indetectables niveles de frataxina en los tejidos de los pacientes con Ataxia de Friedreich. (tomado de 43)

#### **1.4.18.- Epilepsia mioclónica tipo I Unverricht-Lundborg (EPM1) y minisatélites**

Esta epilepsia presenta un patrón de herencia recesivo autosómico. Se caracteriza por deterioro mental y ataxia cerebral, con progresión variable. La enfermedad se manifiesta entre los 6-13 años. Es una enfermedad poco común, tiene incidencia de 1 en 20,000 en Finlandia y en ciertas regiones del Mediterráneo. El gen cistatin B (CSTB), localizado en el cromosoma 21q22.3 es el responsable de la enfermedad. En sólo 14% de los afectados se encontraron mutaciones puntuales que ocasionarían el padecimiento; en el resto de los pacientes analizados se demostró que la expansión de una secuencia minisatélite de 12 nucleótidos, es la responsable de la enfermedad. Esta secuencia se encuentra aproximadamente 70 nucleótidos antes del inicio de la transcripción del gen CSTB. En las personas no afectadas de existen de dos a tres copias de la secuencia y en los afectados hay más de 60 copias. El transcrito del gen de 0.8 Kb presenta una distribución ubicua. En los afectados sus niveles están reducidos en leucocitos pero no en otras líneas celulares, lo que podría provocar la enfermedad. Hasta el momento no existe una explicación para la disminución del transcrito del gen CSTB, aunque se demostró que la expansión no ocasiona una hipermetilación de la región de los repetidos, como sucede en el gen FMR1 y que ocasiona la inhibición de su transcripción. (3-5, 8)

#### **1.4.19.- Características de las mutaciones por expansión**

Existen al menos dos tipos de mutaciones por expansión en los TR. Una genera una expansión corta y la otra una larga. La primera se caracteriza por la presencia de repetidos CAG, localizado en regiones codificadoras de diversos genes que se expanden por vía paterna. En la segunda los repetidos pueden ser CCG o CTG, se encuentran en regiones no codificadoras y se expanden por vía materna. Debido a que se

ha demostrado mosaico somático en la expansión larga, se ha sugerido que estas mutaciones se inician como expansiones cortas durante la meiosis, y la expansión larga de los repetidos CTG o CGG continúa en la embriogénesis temprana. (3-5, 8)

Se ha sugerido que la expansión corta se origina por problemas durante la replicación de la hebra rezagada del DNA. Secuencias puras de 38 repetidos o más son inestables; sorprendentemente este es el tamaño aproximado de los fragmentos de Okazaki. Esto sugiere que secuencias puras de 38 repetidos o más, pueden tener problemas durante su replicación, ya que la DNA polimerasa los podría copiar varias veces. Otra alternativa que se ha sugerido para explicar la expansión corta, plantea que los repetidos forman estructuras secundarias que ocasionan inestabilidad. (3-5, 8)

El efecto de los repetidos a nivel molecular depende del tipo de secuencia y de su tamaño. Los repetidos de CGG se metilan cuando son más de 200, esto ocasiona la inhibición de la transcripción. Cuando los repetidos de CAG se expanden, hay una ganancia o alteración de la función, pues existe mayor cantidad de glutaminas en la proteína mutante, lo que puede ocasionar, al menos en el mal de Huntington, una posible activación del programa apoptótico de la célula. Por lo que respecta a la expansión de los repetidos CTG, no está claro el efecto de la expansión a nivel molecular, sin embargo Wang y colaboradores sugieren un efecto a nivel de regulación genética. (3-5, 8)

En fecha reciente se logró reproducir el fenómeno de expansión con los repetidos CTG y CAG en ratones transgénicos. Algunas conclusiones importantes obtenidas de estos trabajos fueron: a) la necesidad de otras secuencias que flanqueen a los repetidos para que se dé el fenómeno de expansión. En al menos un caso fue necesario que los repetidos CTG localizados en el extremo 3' del gen DM estuvieran flanqueados por otros dos genes que se encuentran de manera natural asociados a este gen, para que se diera la expansión, y

b) el papel del sexo en la expansión: la expansión de repetidos CTG sólo se da en ratones transgénicos machos. (3-5, 8)

La ataxia de Friedreich es la primera enfermedad autosómica recesiva relacionada con este fenómeno de expansión. Los repetidos asociados con la enfermedad son diferentes a los anteriormente descritos, tanto en el tipo como en su localización. Es interesante notar que éstos se encuentran en el intrón 1. Hasta el momento se ignora de qué manera, un exceso de repetidos en un intrón pueden ocasionar la enfermedad. Sin embargo, algunos de los afectados además de tener expansión en uno de los alelos, presentan una mutación puntual con sentido equivocado en el otro. (3-5, 8)

El fenómeno de expansión no está limitado a las secuencias de TR; recientemente se demostró que dos secuencias minisatélites están relacionadas con la generación de un sitio frágil y con EMP1, como resultado de su expansión. En la actualidad no está claro cómo se expande este tipo de secuencias y está en discusión si realmente son mutaciones dinámicas, debido a que no se ha demostrado un fenómeno de "anticipación" para EMP1, y ambos minisatélites no pueden formar estructuras secundarias que ocasionarían inestabilidad en la región y podrán favorecer la expansión. (3-5, 8)

Es posible que el efecto más claro a nivel fenotípico de la expansión de repetidos, sea el fenómeno de "anticipación" que describió por primera vez Augusto Morel en 1857, en lo que él llamó la teoría de la degeneración. Esta fue retomada por Penrose en 1948 y le dio el nombre de "anticipación". Antes del descubrimiento de la expansión de repetidos la "anticipación" se explicaba como un forma de herencia multifactorial o bien por un manejo estadístico inadecuado. Ahora la "anticipación" se observa como un aumento de penetrancia en el síndrome del X frágil, como manifestación temprana de la enfermedad en el mal de Huntington o como aumento de severidad en el caso de la distrofia miotónica. En los tres casos la "anticipación" presenta correlación directamente proporcional con el número de repetidos. (3-5, 8)

El fenómeno de "anticipación" se ha descrito en al menos otras 13 enfermedades. Hasta el momento sólo en la esquizofrenia se ha encontrado una posible asociación entre la expansión de los repetidos CAG/CTG y la enfermedad, aunque la expansión de estos repetidos no sería la única causa que explicaría la "anticipación" en este desorden mental. (3-5, 8)

El conocimiento molecular del fenómeno de expansión ha permitido conocer las causas de distintas enfermedades genéticas. Esto ha facilitado la implantación de diferentes pruebas diagnósticas de la enfermedad y de posibles portadores con una certeza muy alta, lo que permite ofrecer asesoramiento genético a las familias en riesgo. La implantación de diagnósticos presintomáticos para estas alteraciones, tienen implicaciones ético-sociales muy importantes, que deben ser tomadas en cuenta, pues plantean la necesidad de contar con claros principios que normen la realización de estos estudios, más aún cuando en este momento no existen alternativas terapéuticas. Por otra parte, el conocimiento molecular de estas alteraciones permitirá plantear estrategias novedosas para corregirlas mediante terapia génica. Por último, el descubrimiento de esta nueva forma de herencia ha reforzado la noción de que el DNA es una molécula en constante cambio, aún en un mismo organismo. (3-5, 8)

## **1.5.- Fundamentos**

### ***1.5.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

La PCR es una amplificación enzimática mediada por un iniciador de secuencias de DNA. El proceso requiere una serie repetitiva de los tres pasos fundamentales que definen un ciclo: Desnaturalización del dsDNA molde, alineamiento de dos oligonucleótidos iniciadores al molde de cadena sencilla y la extensión enzimática de los iniciadores para producir copias doble cadena que pueden servir como molde en ciclos subsecuentes y están unidas por sitio de alineamiento de los iniciadores incorporados. Los extremos 3' de

los iniciadores deben ser complementarios exactamente al molde, pero los extremos 5' pueden ser una cola no complementaria con sitios de restitución enzimática y/o sitios promotores que también serán incorporados. (57)

La desnaturalización ocurre a 94-96°C. El alineamiento de los iniciadores depende su temperatura de fusión ( $T_m$ ), que es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas son cadena sencilla y la otra es cadena doble. Generalmente se usa un software que calcula las  $T_m$  basándose en la secuencia de los iniciadores, su concentración de apareamiento y sobre todo la concentración de sales. La mejor temperatura de alineamiento es determinada por optimización usualmente es escogida con pocos grados (de 2 a 4°C) abajo del consenso de temperaturas de alineamiento de los iniciadores. La extensión ocurre a 72°C para muchos moldes. (57)

El método está basado en la extensión de dos oligonucleótidos iniciadores por una DNA polimerasa termoestable (Taq DNA pol) que es repetido durante 30-35 ciclos de reacción. Esto conduce hacia una reacción en cadena que dobla la cantidad de productos extendidos de doble cadena en cada ciclo y produce suficiente DNA para cualquier aplicación. Los ciclos pueden ser realizados por un cambio automático en la temperatura en un incubador programable. En principio, solamente una molécula de molde es necesaria para iniciar la PCR. (26)

### **1.5.2.- Reacción de fosforilación**

Los iniciadores u oligos que se utilizan en la PCR generalmente son sintetizados desfosforilados por ello es necesario realizar la reacción de fosforilación en donde la polinucleótido cinasa del bacteriófago T4 cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP al extremo 5' del DNA o RNA. En la reacción de Forward el fosfato gamma es transferido al extremo 5' de DNA desfosforilado, de esta forma el grupo fosfato puede formar enlaces y puede por tanto conectar dos compuestos. (44, 51)

### 1.5.1.- Reacción de Ligación

Otra de las reacciones que permite la obtención de grandes secuencias de DNA puede hacerse utilizando la DNA ligasa de *Escherichia coli* que cataliza la formación de uniones fosfodiéster en dsDNA conteniendo terminaciones complementarias salientes 5' o 3'. La reacción es catalizada por NAD<sup>+</sup>. (44) Los enlaces que se forman a partir de los fosfatos (enlaces fosfodiéster) tienen la propiedad adicional de ser estables, aunque se pueden romper fácilmente por hidrólisis enzimática, pero los residuos de nucleótidos pueden ser eliminados para conservarlos en diversos procesos de replicación y reparación. Cuando se separa un nucleótido, no es destruido durante el proceso. Una vez que se ha formado el enlace fosfodiéster, un átomo de oxígeno del grupo fosfato todavía está ionizado negativamente. Esta propiedad es extremadamente importante porque hace que sea menos probable el hecho de que el enlace fosfodiéster se rompa espontáneamente (una carga negativa protege frente a un ataque nucleofílico) y la ionización negativa mantiene a los nucleótidos y al DNA dentro de las membranas, específicamente la membrana nuclear de los eucariotes y la membrana celular de los procariontes. Como los compuestos cargados negativamente son muy insolubles en lípidos, los fosfatos se mantienen dentro de membranas por su ionización (51)

En el presente trabajo se utilizaron estas reacciones para lograr expansiones de TR *in vitro* de una longitud semejante a la que se reporta asociada a enfermedades causadas por TR que es el objetivo principal de este trabajo.



## 2.- JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se pretende realizar la expansión *in vitro* de secuencias de 'TR y sus complementarios, de una longitud similar a la que se ha reportado que está asociada con enfermedades humanas y con esto tener una herramienta para tratar de demostrar las hipótesis que han sido planteadas por diferentes investigadores, así como también tener material que no dependa de la obtención de muestras clínicas y que sirva para realizar diversos estudios.

## 3.- OBJETIVOS

### 3.1.- GENERAL

3.1.1. Sintetizar *in vitro* expansiones de los trinucleótidos repetidos que se han asociado a enfermedades humanas.

## 2.- JUSTIFICACIÓN

En este trabajo se pretende realizar la expansión *in vitro* de secuencias de TR y sus complementarios, de una longitud similar a la que se ha reportado que está asociada con enfermedades humanas y con esto tener una herramienta para tratar de demostrar las hipótesis que han sido planteadas por diferentes investigadores, así como también tener material que no dependa de la obtención de muestras clínicas y que sirva para realizar diversos estudios.

## 3.- OBJETIVOS

### 3.1.- GENERAL

3.1.1. Sintetizar *in vitro* expansiones de los trinucleótidos repetidos que se han asociado a enfermedades humanas.

## 3.2.- ESPECÍFICOS

3.2.1. Realizar las reacciones de alineamiento de los oligonucleótidos de 15 bases que contengan las secuencias causantes de enfermedad d(CAG), d(CGG), d(GAA), y sus cadenas complementarias respectivas d(CTG), d(CCG), d(TTC) y el control de repetidos no causante de enfermedad d(GAC) y su secuencia complementaria d(GTC), para obtener DNA de doble cadena.

3.2.2. Realizar la reacción de ligación al DNA de doble cadena obtenido a través de la alineación de los oligonucleótidos para obtener secuencias expandidas de repetidos de diferentes longitudes utilizando la enzima T4 DNA ligasa.

3.2.3. Realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando las secuencias expandidas obtenidas por la reacción de ligación para producir secuencias mayores de 500 pares de bases (pb), utilizando como iniciadores las secuencias de 15 pb correspondientes.

3.2.4. Adicionar el sitio de restricción *Bgl* II a los productos de la PCR inicial.

## 4.- HIPÓTESIS

Sí, se utilizan oligonucleótidos de 15 bases cuya secuencia esta constituída de TR relacionados a enfermedades humanas y se optimizan las condiciones de ligación y PCR entonces, será posible sintetizar *in vitro* expansiones de TR de longitud semejante a la reportada en enfermedades asociadas a éstos.

## 3.2.- ESPECÍFICOS

3.2.1. Realizar las reacciones de alineamiento de los oligonucleótidos de 15 bases que contengan las secuencias causantes de enfermedad d(CAG), d(CGG), d(GAA), y sus cadenas complementarias respectivas d(CTG), d(CCG), d(TTC) y el control de repetidos no causante de enfermedad d(GAC) y su secuencia complementaria d(GTC), para obtener DNA de doble cadena.

3.2.2. Realizar la reacción de ligación al DNA de doble cadena obtenido a través de la alineación de los oligonucleótidos para obtener secuencias expandidas de repetidos de diferentes longitudes utilizando la enzima T4 DNA ligasa.

3.2.3. Realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando las secuencias expandidas obtenidas por la reacción de ligación para producir secuencias mayores de 500 pares de bases (pb), utilizando como iniciadores las secuencias de 15 pb correspondientes.

3.2.4. Adicionar el sitio de restricción *Bgl* II a los productos de la PCR inicial.

## 4.- HIPÓTESIS

Sí, se utilizan oligonucleótidos de 15 bases cuya secuencia esta constituída de TR relacionados a enfermedades humanas y se optimizan las condiciones de ligación y PCR entonces, será posible sintetizar *in vitro* expansiones de TR de longitud semejante a la reportada en enfermedades asociadas a éstos.

## 5.- METODOLOGÍA

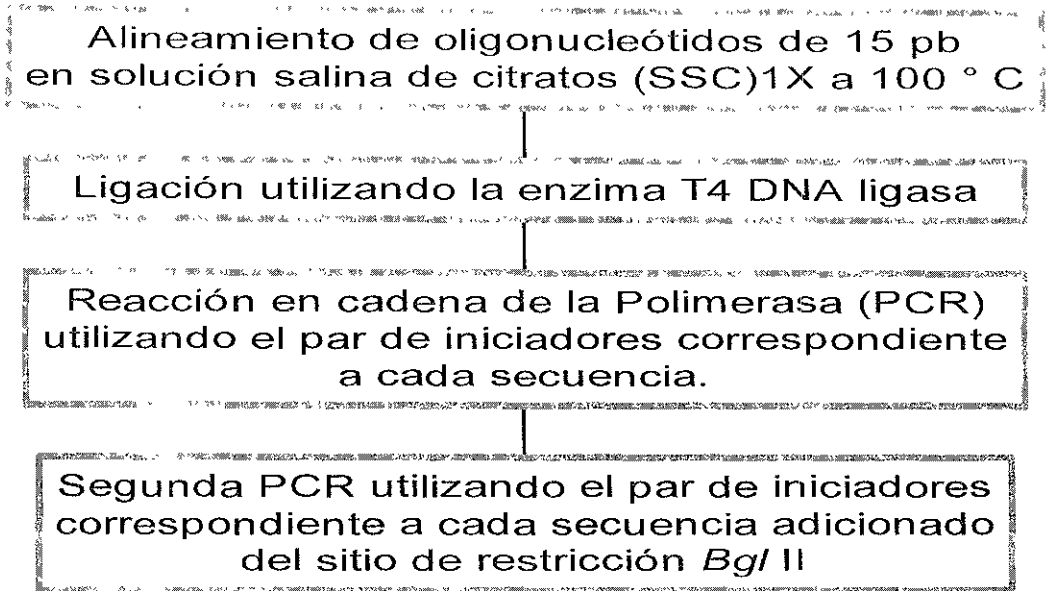


Fig. 11. Plan de trabajo general.

### 5.1.-Construcción de Trinucleótidos repetidos

Se diseñaron oligonucleótidos de 15 bases conteniendo los tripletes patógenos d(CAG), d(CGG), d(GAA), y sus respectivas cadenas complementarias d(CTG), d(CCG), d(TTC) y el control de repetidos no patógenos d(GAC) y su secuencia complementaria d(GTC), los cuales fueron sintetizados en la unidad de ácidos nucleicos del CINVESTAV IPN, en el secuenciador ABI PRISM<sup>IM</sup> Mod. 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados y la enfermedad a la que se encuentran asociados:

NOTA: Durante el trabajo con DNA, se tuvo la precaución de mantenerlo en hielo.

**TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS DE TRIPLETES REPETIDOS EMPLEADOS Y LA ENFERMEDAD ASOCIADA**

Oligonucleótido	Pares de bases	Enfermedad asociada
CC <sub>g</sub> CC <sub>g</sub> CC <sub>g</sub> CC <sub>g</sub> CC <sub>g</sub> GgC <sub>gg</sub> C <sub>gg</sub> C <sub>gg</sub> C <sub>gg</sub> C	15	Síndrome del X-Frágil
TTCTTTCTTTCTTC AagAAgAAgAAgAAg	15	Ataxia de Friedrich
CT <sub>g</sub> CT <sub>g</sub> CT <sub>g</sub> CT <sub>g</sub> CT <sub>g</sub> AgCAgCAgCAgCAgC	15	Distrofia Miotónica
TCgTCgTCgTCgTCg GACgACgACgACgAC	15	Ninguna

## 5.2.- Preparación de Oligonucleótidos

En los apéndices 1 y 2 aparecen los reactivos utilizados y las técnicas empleadas.

- 1.- Los oligonucleótidos liofilizados se resuspendieron en 500  $\mu$ L de amortiguador Tris-EDTA (TE) pH 8.0 y perfectamente homogeneizados.
- 2.- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% con BrEt en concentración de 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ L y se observó con luz UV para confirmar que el DNA se encontraba en buenas condiciones; empleando para ello de 5-8  $\mu$ L de cada oligonucleótido, el avance de la muestra en el gel fue de aproximadamente 1.0 cm y se corrió bajo las siguientes condiciones de electroforesis: 105-108 V, 20 mA, durante 20 minutos.
- 3.- Los oligonucleótidos se purificaron por el método de extracción fenol-cloroformo, precipitados con etanol y resuspendidos en TE pH 8.0, pues estos fueron obtenidos sin desalinizar.

4.- La cuantificación de los oligonucleótidos se realizó por el método espectrofotométrico utilizando una longitud de onda de 260 nm y se determinó su concentración con base en el siguiente procedimiento:

Primero se realizaron diferentes diluciones de cada oligonucleótido de las cuales se obtuvo su DO a 260 nm, estas fueron corregidas a través del método de regresión lineal.

Con la DO corregida de cada oligonucleótido y la dilución empleada se calculó la concentración de cada uno empleando el factor de corrección para DNA de cadena sencilla que dice  $1 \text{ Abs}_{260} = 33 \mu\text{g/mL}$ , y también con la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de extinción molar} = \text{EM} = \#A (16000) + \#G(12000) + \#C(7000) + \#T (9600)$$

#A = Número de Adeninas en el oligonucleótido    # C= Número de Citocinas en el oligonucleótido

#G = Número de Guaninas en el oligonucleótido    # T= Número de Timinas en el oligonucleótido

Sustituir en la siguiente fórmula la concentración de cada uno de los oligonucleótidos:

$$\frac{(\text{Abs}_{260})(\text{Factor de dilución})}{\text{EM}} = \text{Concentración } \mu\text{M}$$

**Nota:** Estos son los cálculos que realiza el software llamado oligo.

### 5.3.- Alineamiento

1.- El DNA de doble cadena se obtuvo a través de la reacción de alineamiento la cual se realizó colocando en una proporción 1:1 molar el par de oligonucleótidos complementarios en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionó solución salina de citratos (SSC) 20X a una mezcla de reacción de 50  $\mu\text{L}$ . La SSC 20X debe estar a una concentración final de 1X en la reacción. Se mezcló en agitador tipo vórtex y se centrifugó rápidamente. Los tubos con la mezcla de reacción fueron colocados en un termoblock a una temperatura de 100°C durante 15 minutos al cabo de este tiempo se dejó que la temperatura disminuyera hasta alcanzar la temperatura ambiente.

2.- El DNA se mantuvo en hielo y se comprobó la eficiencia del alineamiento de los oligonucleótidos en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% con BrEt ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 100V, 46 mA, durante 15 minutos y se observó el corrimiento electroforético con un transiluminador con luz U.V. Cada alineamiento llevó como control una muestra del oligonucleótido de cadena sencilla que le corresponde.

3.- El DNA alineado se purificó mediante extracción fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y fue resuspendido en TE pH 8.0, para eliminar las sales.

4.- El DNA alineado se cuantificó por el método espectrofotométrico utilizando una longitud de onda de 260 nm y se determinó la calidad del alineamiento observando el retraso del DNA de doble cadena en el gel de agarosa y el remanente sin alinearse comparado con las cadenas sencillas.

## 5.4.- Ligación

1.- Los oligonucleótidos no tenían el extremo 5' fosforilado por lo cual se utilizó la T<sub>4</sub> polinucleótido cinasa que cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP al extremo 5' del DNA desfosforilado (también tiene actividad en el RNA). Con el DNA alineado (DNA de doble cadena) se realizó una reacción de fosforilación y ligación utilizando las enzimas T<sub>4</sub> polinucleótido cinasa y la T<sub>4</sub> DNA ligasa respectivamente.

Esta reacción de fosforilación se realizó en un volumen de 40  $\mu\text{L}$ , variando la concentración del DNA utilizando 46, 92, 231 y 355  $\mu\text{M}$ . Se usaron 10 U de enzima T<sub>4</sub> polinucleótido cinasa la temperatura empleada fue de 37°C con un tiempo de reacción de 2 horas y el ATP ajustado a 1mM. Esta reacción se realizó en un amortiguador de reacción de ligación sin ATP y también en el regulador comercial. La T<sub>4</sub> DNA ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3' hidroxilo y 5' fosfato adyacentes del DNA.



Al terminar el tiempo de fosforilación en la misma mezcla de reacción se adicionaron 6U de la enzima T<sub>4</sub> DNA ligasa (Unidades Weiss), el volumen final de reacción fue de 46  $\mu$ L. La reacción de ligación se efectuó durante 4 horas a 37°C y la concentración final de glicerol fue de 7.7%. (44)

La reacción de ligación se realizó tres veces consecutivamente, limpiando cada reacción de ligación por extracción fenol-cloroformo, precipitación con etanol y resuspensión en TE pH 8.0. Se mantuvieron las condiciones de reacción de 46  $\mu$ L, ATP 1.0 mM, 6U T<sub>4</sub> DNA ligasa, 4 horas a 37°C y el glicerol disminuyó a 6.5 %.

2.- La eficiencia de la fosforilación y ligación de los TR se analizó en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 2 y 4 % y cuantificados por método espectrofotométrico.

## **5.5.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

1.- La primera expansión *in vitro* de las secuencias de TR se realizó utilizando la PCR, empleando como DNA molde los TR expandidos a través de ligaciones consecutivas y como iniciadores los oligonucleótidos de cadena sencilla de 15 pb; se preparó una mezcla de reacción incluyendo los dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatados) : dATP, dCTP, dGTP, dTTP, la enzima Taq DNA polimerasa recombinante, el amortiguador 10X para PCR y MgCl<sub>2</sub> de Böehringer en un volumen final de 100  $\mu$ L.

Para la reacción de PCR se usaron las condiciones en la tabla 3:

Elementos de la reacción	Concentración final en la reacción.
10X PCR amortiguador	1X
10 mM dNTPs mezcla	2mM cada dNTP
10 $\mu$ M iniciador 1	1 $\mu$ M
10 $\mu$ M iniciador 2	1 $\mu$ M
DNA molde	1.0 $\mu$ g
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 - 9.0 mM
5 U/ $\mu$ L Taq DNA polimerasa	2.5 U
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	cbp 100 $\mu$ L

## 5.6.- Programa de PCR

El programa inicia con una desnaturalización previa a 95°C durante 1 minuto. El programa consta de desnaturalización a 95°C/ 30 segundos, alineamiento a una temperatura de aproximadamente 2°C debajo de la T<sub>m</sub> menor de los iniciadores durante 30 segundos, extensión a 72°C/1 minuto durante 35 ciclos y un paso final de 72°C/15 minutos para permitir que la enzima termine de polimerizar; después se programó una temperatura de 4°C/10 minutos para detener la reacción.

La Tabla 4 muestra las T<sub>m</sub> utilizadas en el PCR para cada par de oligonucleótidos correspondientes:

Secuencia de oligonucleótidos	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> utilizada para PCR (°C)
AagAAgAAgAAgAAg	23.9	22.0
TTCTTCTTCTTCTTC	24.3	
CCgCCgCCgCCgCCg	69.5	66.5
GgCggCggCggCggC	68.5	
AgCAgCAgCAgCAgC	44.9	41.0
CTgCTgCTgCTgCTg	43.0	
TCgTCgTCgTCgTCg	45.9	38.3
GACgACgACgACgAC	40.3	

Los productos de PCR se purificaron por extracción fenol-clorotorno, precipitación con etanol y resuspendidos en 20  $\mu\text{L}$  de TE pH 8.0. Se confirmó la obtención de expansión y amplificación de los TR en geles de agarosa al 1% con BrEt (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y observados en un transiluminador con luz UV.

Se determinó la concentración óptima de  $\text{MgCl}_2$  para la expansión por PCR de los TR variando la concentración de 1.5 mM a 9.0 mM con intervalos de 1.5 mM y se cuantificó el DNA por método espectrofotométrico.

El DNA obtenido de la primera expansión por PCR a la concentración de 9.0 mM de  $\text{MgCl}_2$  se utilizó como DNA molde para realizar una segunda reacción de PCR en la cual se utilizaron como iniciadores las secuencias correspondientes de los TR que además llevan adicionado el sitio de restricción *Bgl* II, estos iniciadores fueron sintetizados de 25 pb en el lugar y forma antes mencionado. La reacción se efectuó en las condiciones indicadas en la tabla 5:

Componentes de la reacción	Concentración final en la reacción
10X PCR amortiguador	1X
10 mM dNTPs mezcla	0.2 mM
5 $\mu\text{M}$ iniciador 1	0.5 $\mu\text{M}$
5 $\mu\text{M}$ iniciador 2	0.5 $\mu\text{M}$
DNA molde	1.0 $\mu\text{g}$
50 mM $\text{MgCl}_2$	5.0-13.5 mM
5 U/ $\mu\text{L}$ Taq DNA polimerasa (Gibco BRL)	2.5 U
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada estéril	cbp 100 $\mu\text{L}$

Para esta PCR se preparó la reacción sin enzima, esta se adicionó hasta que la reacción alcanzó una temperatura de 95°C. El programa de PCR se inició con un precalentamiento de platina del termociclador a 95°C/4-6 minutos, en el momento en que alcanzó la temperatura de 95°C se colocaron los tubos de reacción abiertos, hasta la adición de la enzima (debe ser rápido para evitar evaporación en la reacción). Posteriormente se inició al programa de PCR ya establecido, que inicia con una desnaturalización a 95°C/1

minuto, el programa es de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C/30 segundos, alineamiento a una Tm de 2°C debajo de la Tm menor de los iniciadores durante 30 segundos, extensión 72°C/1 minuto y un paso final de 72°C/15 minutos para permitir que la enzima termine de polimerizar, después la reacción es detenida a una temperatura de 4°C/10 minutos. Las Tm utilizadas en la reacción de PCR para adicionar el sitio *Bgl* II son las siguientes (tabla 6).

**TABLA 6. Tm DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CON EL SITIO BGL II Y LA UTILIZADA EN LA REACCIÓN DE PCR**

Oligonucleótidos con sitio <i>Bgl</i> II	Tm	Tm (-2°C)
Ggg <b>AAgATC</b> TTTCTTCTTCTTCTC	52.5	49
Ggg <b>AAgATCTAAgAAgAAgAAgAAg</b>	50.7	
Ggg <b>AAgATCTCCgCCgCCgCCgCCg</b>	79.0	77.0
Ggg <b>AAgATCTggCggCggCggC</b>	79.1	
Ggg <b>AAgATCTAgCAgCAgCAgCAgC</b>	63.4	61.4
Ggg <b>AAgATCTCTgCTgCTgCTgCTg</b>	64.3	
Ggg <b>AAgATCTTCgTCgTCgTCg</b>	65.6	61.8
Ggg <b>AAgATCTgACgACgACgACgAC</b>	63.8	

Las letras en negritas indican el sitio de restricción enzimática *Bgl* II.

Se confirmó la expansión y amplificación de los TR en geles de agarosa al 1% con BrEt (1 µg/µL), así como, la mejor concentración de MgCl<sub>2</sub> para cada una de las secuencias.

## 5.7.- Tercera Reacción de PCR

Se realizó una tercera reacción de PCR para mejorar la eficiencia de expansión de los TR con el sitio de restricción *Bgl* II utilizando en ésta como molde el DNA obtenido en la expansión realizada en la segunda reacción de PCR se utilizó el mismo programa de la segunda PCR estandarizando nuevamente la concentración de MgCl<sub>2</sub> correspondiente a cada secuencia de TR. La eficiencia de expansión de los TR se analizó en gel de agarosa al 1% y se observó en un transiluminador con luz UV.

## 6.- RESULTADOS

Antes de iniciar el proceso de alineamiento se comprobó utilizando un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que todas las secuencias de oligonucleótidos de 15 pb de cadena sencilla no estuvieran degradadas. Se determinó la concentración de cada una por espectrofotometría, las cuales se muestran en la Tabla 7 y están expresadas en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y  $\text{pmoles}/\mu\text{L}$ . Todas las concentraciones fueron calculadas como se indica en la metodología.

<b>TABLA 7. CONCENTRACIONES FINALES DE CADA OLIGONUCLEÓTIDO</b>		
<b>Secuencia del oligo</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentración <math>\text{pmoles}/\mu\text{L}</math></b>
CTG	2.79	572.3
CCG	2.574	528.0
AGC	2.689	551.5
GGC	2.821	578.6
GAC	2.442	500.9
TCG	2.755	565.1
TTC	1.9635	402.7
AAG	3.036	622.7

El resultado de alineamiento para cada una de las secuencias se muestra en las figuras 12, 13, 14 y 15.

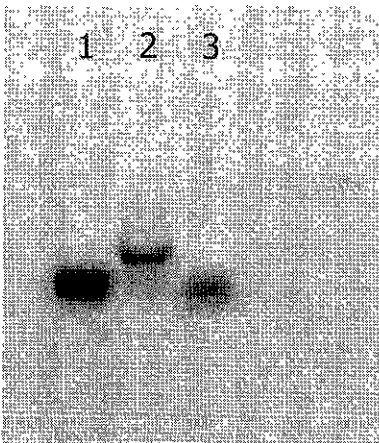


Fig 12: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Alineamiento de las secuencias CTG/AGC dsDNA de 15 pb en el carril 2, carril 1 el control de la secuencia CTG de 15 pb de cadena sencilla y carril 3 el control de la secuencia AGC de 15 pb de cadena sencilla.

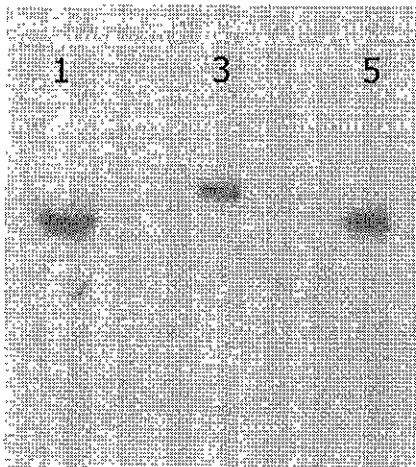


Fig.13: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Alineamiento de las secuencias CCG/GGC en el carril 3, se generó dsDNA de 15 pb, control de cadena sencilla de 15 pb de la secuencia CCG en el carril 1 y el control de cadena sencilla de 15 pb de la secuencia GGC en el carril 5.

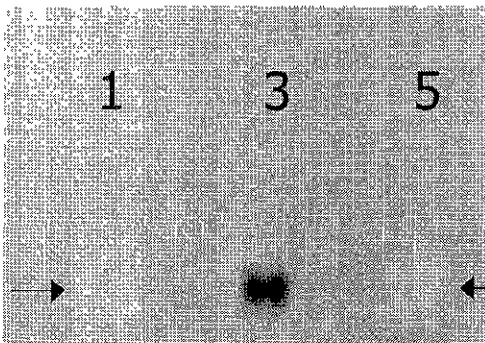


Fig.14: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Alineamiento de la secuencia TTC/AAG dsDNA de 15 pb en el carril 3; carril 1 control de la cadena sencilla de 15 pb de la secuencia TTC y el control de la cadena sencilla de 15 pb de la secuencia AAG en el carril 5. Las flechas indican el frente de corrimiento.

La cadena sencilla de las secuencias TTC y AAG no intercala el bromuro de etidio.

Para la secuencia GAC/TCG se obtuvo el alineamiento de la misma forma que la secuencia CTG/AGC.

Se muestra en la fotografía de la figura 15

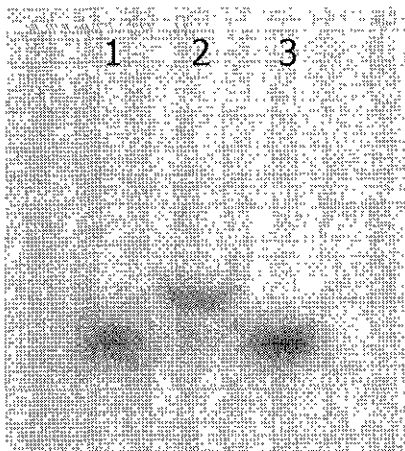


Fig.15: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Alineamiento de la secuencia GAC/TCG dsDNA de 15 pb en el carril 2; carril 1 control de la cadena sencilla de 15 pb de la secuencia GAC y el control de la cadena sencilla de 15 pb de la secuencia TCG en el carril 3.

Para realizar la primera ligación se determinó la concentración de oligonucleótidos a utilizar en la reacción, esta fue de 92  $\mu$ M de acuerdo a los resultados obtenidos en la Fig.16.

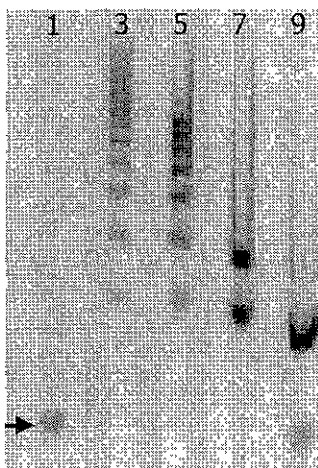


Fig.16: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Eficiencia de ligación en función de la concentración de oligonucleótidos. Se utilizó la secuencia TTC/AAG; carril 1 control de DNA de doble cadena de 15 pb en concentración de 46  $\mu$ M, sin ligar, en los siguientes carriles se observa la eficiencia de ligación de esta secuencia a concentraciones de: carril 3, 46  $\mu$ M, carril 5, 92  $\mu$ M, carril 7, 231  $\mu$ M y carril 9, 355  $\mu$ M. La punta de flecha en el carril 1 señala la posición del DNA sin ligar.

Al comparar el efecto del amortiguador sin ATP y el regulador comercial de la enzima T<sub>4</sub> DNA ligasa en la reacción de ligación, no existió diferencia alguna.

La primera ligación se realizó con la enzima T<sub>4</sub> DNA ligasa, los resultados de la misma se muestran en la Fig. 17.

1 2 3 4 5

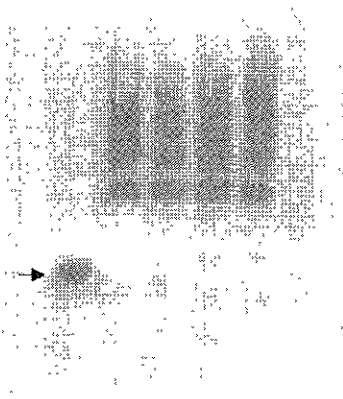


Fig 17: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1µg/µl) Carril 1 control de DNA de doble cadena de 15 pb de la secuencia CTG/AGC, carril 2 secuencia CTG/AGC, carril 3 secuencia GAC/TCG, carril 4 secuencia CCG/GGC y carril 5 secuencia TTC/AAG. La flecha indica la posición del DNA sin ligar.

En las figuras 18 y 19 se muestra el resultado de la 2ª y 3ª reacción de ligación de las secuencias en estudio.

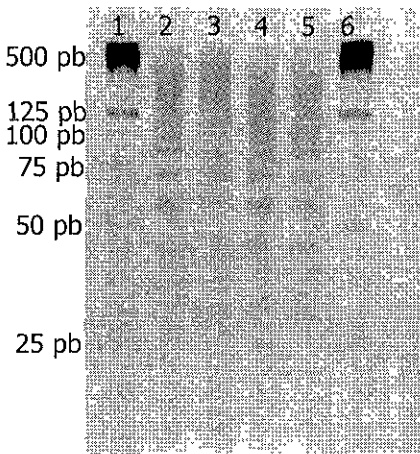


Fig. 18: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1µg/µl). Comparación de la eficiencia de la 2ª y 3ª ligación. Carril 1 y 6 marcador de peso molecular de 25-500 pb, 2ª y 3ª ligación de la secuencia CTG/AGC en el carril 2 y 3, carril 4 y 5, 2ª y 3ª ligación de la secuencia GAC/TCG.

Como se observa en el gel, ya no se mejora la eficiencia de ligación en la 3ª puesto que no hay mucha diferencia en el tamaño de los productos obtenidos respecto a la 2ª ligación

El tamaño máximo de las expansiones para estas secuencias es de 500 pb.



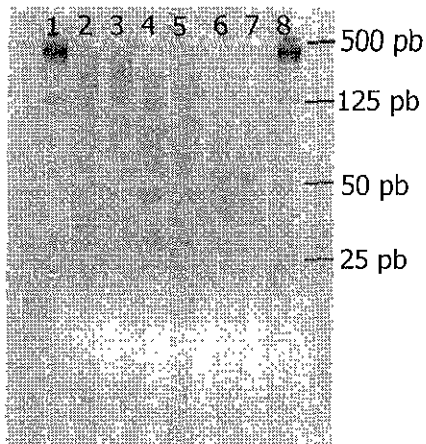


Fig.19: Comparación de la eficiencia de ligación 2ª y 3ª. Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% teñido con BrEt (1µg/µL). Carriles 1 y 8 marcadores de peso molecular de 25-500 pb, carriles 2 y 3 ligaciones 2ª y 3ª de la secuencia GAC/TCG, carriles 4 y 5 ligaciones 2ª y 3ª de la secuencia CCG/GGC y 6 y 7 ligaciones 2ª y 3ª de la secuencia TTC/AAG.

A diferencia de la secuencia GAC/TCG que presenta una expansión máxima de 500 pb, la secuencia CCG/GGC tiene una expansión mayor de 125 pb y menor de 500 pb y la secuencia TTC/AAG solo presenta expansión entre valores de 50 a 125 pb.

Las expansiones utilizando la enzima T4 DNA ligasa permitieron obtener dsDNA con un tamaño de 500 pb. Se estudiaron las condiciones más adecuadas para realizar la PCR de este producto y obtener DNA de mayor longitud (702 pb, 1371 pb, 8454 pb), como se observa en la Fig.20 el cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) es un factor determinante en la reacción.

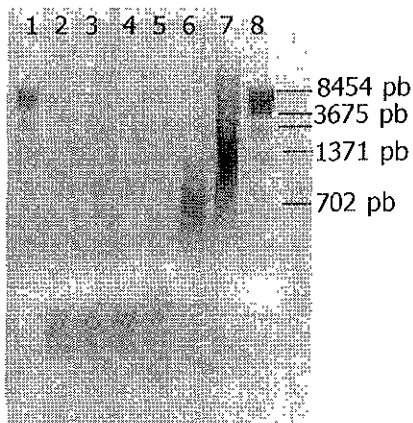


Fig.20: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% teñido con BrEt (1µg/µl). Efecto del MgCl<sub>2</sub> en la PCR de la secuencia TTC/AAG. Carril 1 y 8 DNA del fago λ cortado con *Bst* II. Carril 2 MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, carril 3 MgCl<sub>2</sub> 3 mM, carril 4 MgCl<sub>2</sub> 4.5 mM, carril 5 MgCl<sub>2</sub> 6 mM, carril 6 MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM y carril 7 MgCl<sub>2</sub> 9 mM.

Como se observa en la figura 20, conforme aumenta el cloruro de magnesio se favorece la reacción obteniéndose productos del DNA amplificados y expandidos (el DNA molde fue de 500 pb), con la PCR se lograron expandir en su mayoría hasta 1371 pb, sin descartar que hay producto que supera el valor más alto dado por el marcador de peso molecular DNA del fago  $\lambda$  cortado con *BstE* II que es de 8454 pb y hay producto que entra en el valor inferior del mismo marcador que es de 702 pb. Puede observarse que la eficiencia de la expansión y amplificación inicia con una concentración de  $MgCl_2$  de 7.5 mM y la máxima se da a 9.0 mM de  $MgCl_2$ . Aprovechando el efecto positivo que tiene el  $MgCl_2$  en la reacción de PCR para expandir y amplificar el DNA de 500 pb de las secuencias expandidas con la T4 DNA ligasa se realizó la PCR para todas éstas bajo las mismas condiciones de la secuencia TTC/AAG. Fig.21.

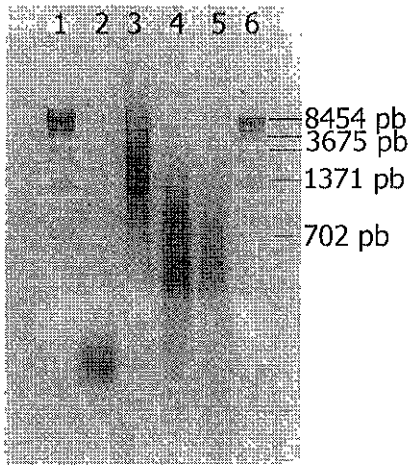


Fig. 21: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% teñido con BrEt (1µg/µl). Expansiones y amplificaciones de los TR con la PCR utilizando una concentración de  $MgCl_2$  de 9.0 mM. Carril 1 y 6 DNA del fago  $\lambda$  cortado con *BstE* II, carril 2 secuencias CCG/GGC, carril 3 TTC/AAG, carril 4 CTG/AGC y carril 5 GAC/TCG.

La secuencia CCG/GGC no presenta expansión solo amplificación el tamaño del DNA obtenido es menor a 702 pb. La secuencia TTC/AAG es la mejor expandida, el tamaño de DNA es de 1371 pb en su mayoría y llega a expandirse a más de 8454 pb, el menor valor de expansión es de 702 pb. La secuencia CTG/AGC y GAC/TCG son expandidas mayormente hasta 702 pb, también presentan expansiones menores a este valor y el mayor tamaño de expansión alcanzado es de 1371 pb aproximadamente.

Aunque no todas las expansiones presentan la misma eficiencia puede decirse que la expansión es mucho mejor que la obtenida con la T4 DNA ligasa, además de obtener una buena concentración. La secuencia CCG/GGC presentó dificultad para su expansión. Se ensayaron diferentes condiciones de PCR que permitieran mejorarla, además de insertar un sitio de restricción *Bgl*/II al DNA de todas las secuencias. Para esto se partió de las secuencias expandidas de 500 pb. Fig 22

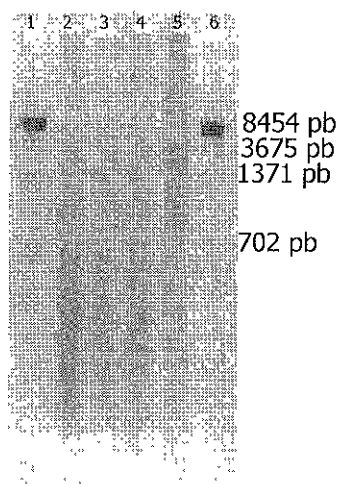


Fig.22: Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% teñido con BrEt (1µg/µl). Expansiones y amplificaciones de los TR adicionados del sitio *Bgl*/II. Carril 1 y 6 DNA del fago λ cortado con *Bgl*/II, carril 2 secuencia CTG/AGC, carril 3 secuencia CCG/GGC, carril 4 secuencia GAC/TCG, carril 5 secuencia TTC/AAG.

La mejor expansión se obtiene para las secuencias TTC/AAG-*Bgl*/II en donde la mayor cantidad de DNA presenta un peso de 1371 pb y las secuencias CTG/AGC *Bgl*/II, TCG/GAC-*Bgl*/II y CCG/GGC-*Bgl*/II presentan una expansión de 702 pb, aunque sigue existiendo DNA de menor peso la expansión se ve muy favorecida para las cuatro secuencias logrando expansiones de un peso molecular mayor a las 8454 pb que es el peso molecular máximo que indica el marcador, y se observa también que hay DNA de un peso más elevado que ya no entra al gel. La expansión fue muy satisfactoria para las cuatro secuencias de TR especialmente para la secuencia CCG/GGC-*Bgl*/II.

## 7.- DISCUSION

Para dar inicio a la síntesis *in vitro* de secuencias de largos TR, primero se sintetizaron oligonucleótidos de cadena sencilla de 15 pb para las secuencias CCG, TTC, CTG y TCG, así como, sus respectivas cadenas complementarias GGC, AAG, AGC y GAC. Posteriormente se obtuvo por alineamiento de oligonucleótidos complementarios el DNA de doble cadena, obteniendo así: (CCG/GGC)<sub>15</sub>, (TTC/AAG)<sub>15</sub>, (CTG/AGC)<sub>15</sub> y (TCG/GAC)<sub>15</sub>. En el alineamiento de los oligonucleótidos de cadena sencilla de 15 pb llama la atención el hecho de que las secuencias de cadena sencilla TTC y AAG no intercalen el BrEt en comparación con las otras secuencias como se muestra en la figura 14; muy probablemente esto se debe a la habilidad de las secuencias de TR de cadena sencilla para formar estructuras de horquillas *in vitro* que facilitan que el BrEt se intercale en la formación del dúplex interactuando con las moléculas de la horquilla en dos formas diferentes: unión por intercalación de un ligando en el centro del tallo y por una asociación de dos ligandos en el asa (14), de esta manera en el análisis del gel pueden ser visibles, sin embargo, los estudios sobre TR han mostrado que las secuencias TTC/AAG no son capaces de formar estructuras de horquillas como cadena sencilla por lo cual no intercalan el BrEt, puesto que éste solo se intercala en DNA de doble cadena si en el gel de agarosa las cadenas sencillas de DNA de las secuencias TTC y AAG se encuentran en carriles adyacentes pueden tener interacciones moleculares que faciliten la formación del DNA de doble cadena y de esta forma el BrEt se intercala en el DNA haciéndola visible, sin embargo, si éstas se encuentran alejadas en el gel no serán observadas y solo se verá el frente del corrimiento del azul de bromofenol. (22)

Cada par de 15 pb de TR alineados correspondientemente presenta un retraso en el corrimiento electroforético del dsDNA en comparación al ssDNA, esto debido al aumento en peso de la cadena doble del DNA (fig. 1, 2 y 3), a su vez, este mismo DNA sirvió como molde para la enzima T4 DNA ligasa.

Para realizar la primera ligación primero se consideró que los oligonucleótidos no poseen el P5' por lo cual fue añadido a través de una reacción de fosforilación con la enzima T4 DNA polinucleótido cinasa y en esa misma mezcla de reacción después de la fosforilación se realizó la ligación. Es importante determinar cual es la mejor concentración de oligonucleótidos alineados para llevar a cabo la ligación, en este estudio se demostró que la mejor concentración para ésta es de 92  $\mu\text{M}$  (fig. 16), con dicha concentración y bajo las condiciones establecidas de reacción se obtiene una ligación del DNA alineado mas eficiente puesto que conforme se aumenta la concentración de oligonucleótido la eficiencia de la ligación se ve disminuida, se observa mayor producto ligado de menor peso para las concentraciones de oligos de 231  $\mu\text{M}$  y 355  $\mu\text{M}$ , esta última concentración es la máxima concentración de oligonucleótido que puede ser utilizada en las condiciones de reacción establecidas, ya que si se utiliza más, el volumen de reacción superaría 40  $\mu\text{L}$  impidiendo la comparación con las demás reacciones y también se modificaría la reacción de ligación, así mismo, puede observarse en ésta, una cantidad de DNA alineado que corresponde al tamaño del control de oligonucleótidos sin ligar, lo cual indica que la enzima llegó a un punto máximo de actividad (fig. 16). Para la ligación también se consideró el tiempo de reacción y se observó que después de 4 horas ya no aumentaba la eficiencia de ligación; la temperatura óptima fue de 37°C dado que la enzima trabaja mejor a esta temperatura, por otro lado al comparar el uso de un amortiguador de ligación preparado en el laboratorio y el comercial no existió ninguna diferencia en cuanto a su funcionalidad, por lo tanto para todas las reacciones de ligación se utilizó el amortiguador preparado en el laboratorio.

Como se observa en la fig. 17 la primera ligación de las secuencias fue muy eficiente siendo escasa la cantidad que queda sin ligar en todas ellas. El empleo de la T4 DNA ligasa permitió obtener expansiones de los TR hasta de 500 pb, determinados al realizar la comparación con el marcador de peso molecular de 25-500 pb, para lograr esta longitud se hicieron tres ligaciones consecutivas (fig. 18 y 19), es posible que el polimorfismo de los TR dificulte la actividad de la enzima impidiendo así su capacidad de seguir expandiéndolos, sin embargo, se han realizado estudios con diferentes DNA polimerasas en donde se ha

observado su eficiencia para expandir secuencias altamente repetitivas y entre éstas se encuentran la Taq DNA polimerasa, la DNA polimerasa I (fragmento Klenow), DNA sequenasa, DNA polimerasa- $\alpha$ , DNA polimerasa- $\beta$  y la HIV-transcriptasa reversa, todas estas enzimas expandieron repetidos GGC:GCC pero la expansión más grande fue realizada por la Taq DNA polimerasa, la cual sintetizó un producto de aproximadamente 250 pb y con el resto se obtuvieron productos de menor longitud, esto demuestra que la Taq DNA polimerasa tiene mejor eficiencia de expansión para secuencias de TR. (23)

Debido a que las enfermedades asociadas a expansiones de TR son generadas por miles de unidades de repetidos, se ha recurrido a la síntesis *in vitro* de largas expansiones de estos empleando la técnica de PCR y aprovechando la capacidad de la enzima Taq DNA polimerasa para generar productos de alto peso molecular favorecidos por altas concentraciones de  $MgCl_2$ . (52) Para elaborar esta reacción se variaron concentraciones de  $MgCl_2$  de 1.5 a 9.0 mM con intervalos de 1.5 mM de  $MgCl_2$  para la expansión de los TR TTC/AAG, observándose que conforme aumenta la concentración de  $MgCl_2$  la expansión de esta secuencia comienza a ser significativa a una concentración de 7.5 mM de  $MgCl_2$  en donde alcanza un tamaño de 702 pb en promedio y la expansión aumenta a la concentración de 9.0 mM  $MgCl_2$  obteniéndose una mayor cantidad de DNA que presenta un tamaño de 1371 pb y hay menor cantidad de DNA que logra expandirse hasta 8454 pb (fig. 20). Esta variación de  $MgCl_2$  se realizó para las secuencias CTG/AGC, TCG/GAC y CCG/GGC para todas la mejor expansión fue a la concentración de 9.0 mM  $MgCl_2$  las dos primeras secuencias presentan un tamaño de expansión alrededor de 702 pb y poca es la cantidad de DNA que es de menor o mayor a este tamaño (fig. 21). Para la secuencia CCG/GGC solo se amplificó el DNA de 500 pb obtenido por expansión de la ligación, con la PCR no se logró expandir satisfactoriamente y se encuentra en un tamaño menor de las 702 pb en comparación con el marcador de peso molecular. Por otro lado, las diferentes conformaciones estructurales que pueden adoptar cadenas de repetidos GGC y GCC *in vitro* pueden incluir horquillas, estructuras de triple o cuádruple cadena de DNA, además se ha sugerido una

formación de tetrahélice de d(CGG)<sub>n</sub> *in vivo* debido al alto contenido de guaninas, esto puede obstruir la transcripción y replicación del DNA; estas son las posibles razones por las que las secuencias CCG y GGC no son expandidas tan eficientemente como las demás secuencias estudiadas además de presentar una temperatura de desnaturalización de 90°C/10 minutos, pero se continuo con la búsqueda de las mejores condiciones de reacción para lograr su expansión. (1,2, 18, 22, 23, 53, 54)

Para adicionar un sitio de restricción enzimática *Bgl* II al DNA expandido en la primera PCR se utilizaron iniciadores que contenían las secuencias de TR correspondientes más el sitio *Bgl* II. Se buscaron las mejores condiciones de reacción pero las expansiones tuvieron poca eficiencia (no se muestran fotografías); utilizando el poco DNA expandido obtenido de cada una se realizó una tercera PCR. De esta manera la enzima Taq DNA polimerasa solo amplifica el DNA de alto peso molecular que ya contenía el sitio *Bgl* II, en estas reacciones utilizaron las siguientes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>: para los TR TTC/AAG-*Bgl* II 5.5 mM y 9.5 mM para la secuencia CCG/GGC-*Bgl* II, 9.0 mM para TCG/GAC-*Bgl* II y 10.5 mM para la secuencia CTG/AGC-*Bgl* II. Con esto se mejora la eficiencia de la expansión de los TR TTC/AAG, CCG/GGC, CTG/AGC, TCG/GAC con un sitio de restricción *Bgl* II. (fig. 22)

El éxito de la expansión de los TR con el sitio *Bgl* II se debe en gran parte a que los tubos de reacción permanecieron aproximadamente 6 minutos a 95°C en el proceso de adición de la enzima Taq DNA polimerasa antes de dar inicio al programa de PCR previamente establecido lo cual brinda oportunidad a que las cadenas de TR se desnaturalicen y de esta forma la enzima Taq DNA polimerasa pueda expandirlas y amplificarlas ya que especialmente la secuencia CCG/GGC-*Bgl* II es la que presenta mayor polimorfismo y es más difícil de expandir, con esto se garantiza que la formación de triples o cuádruples cadenas adoptadas por esta secuencia se disminuyan en gran proporción facilitando el trabajo de la enzima. (7,52,53).

Las expansiones obtenidas servirán para estudiar el proceso de degradación del mRNA en células eucariotes, así como, conocer si influyen en la estabilidad de un mRNA el cual normalmente es muy estable y también analizar si la presencia de estos TR pueden modificar la localización del mRNA en la célula.

Esto es importante debido a que varios de estos TR están asociados con la manifestación clínica de algunas enfermedades; y el saber de que manera modifican al mRNA, podría ayudar a conocer parte del mecanismo involucrado en estas enfermedades. Por otro lado, la obtención de estas secuencias expandidas ofrece una nueva herramienta que los investigadores pueden emplear para estudiar *in vitro* como es afectada la estabilidad del mRNA por secuencias de TR dentro de la célula, sin que esto tenga que depender de la obtención de TR provenientes de muestras clínicas las cuales resultan difíciles de obtener ya que puede llevar varios años el reunir una cantidad significativa de muestras clínicas para realizar el estudio, por otro lado pueden crearse sondas que permitan realizar un diagnóstico molecular directo y oportuno a pacientes con posibilidad de presentar las enfermedades asociadas a estos TR (31). También puede facilitarse la clonación de estas secuencias a través de la adición del sitio de restricción el cual puede ser variado de acuerdo a las necesidades del investigador. Con esto se ofrece una mejor fuente de material de trabajo que los investigadores pueden emplear en el campo de la genética para facilitar el entendimiento de las bases moleculares que conducen a enfermedades por expansiones de secuencias de TR (39), así como, ayudar al entendimiento del mecanismo biológico por el cual los TR son expandidos.



## 8.- CONCLUSIONES

- 8.1 Se logró sintetizar *in vitro* las expansiones de las secuencias de TR (CCG/GCC)<sub>15</sub>, (TTC/AAG)<sub>15</sub>, (CTG/AGC)<sub>15</sub>, que se encuentran asociadas a enfermedades humanas, así como, la secuencia (TCG/GAC)<sub>15</sub> que no esta relacionada con enfermedad en humanos, esto se logró con la integración de las técnicas de alineamiento y ligación, lo que permitió que su expansión se obtuviera hasta un tamaño de 500 pb.
- 8.2 La PCR ofreció una mejor alternativa para lograr una mayor expansión de los TR en estudio permitiendo expansiones que van de un tamaño de 702 pb hasta de 1371 pb en su mayoría, sin descartar que se pueden obtener pesos moleculares mayores (8454 pb). Con esto, se demuestra que es posible obtener expansiones grandes de TR en cuya secuencia se encuentra un alto contenido de guaninas y citocinas.
- 8.3 La PCR no solo facilitó la expansión de las secuencias de TR sino también su amplificación, por otra parte hace más sencilla la adición de sitios de restricción como es el sitio *Bgl* II pero también pueden ser adicionados otros.
- 8.4 Sí es posible sintetizar *in vitro* secuencias de TR de hasta miles de unidades repetidas de tamaño semejante al que se encuentra asociado con enfermedades humanas

## 9.- ANEXOS

### 9.1.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES y REACTIVOS. (44)

#### 9.1.1.-AGUA DESTILADA FILTRADA Y ESTERIL.

AGUA DESTILADA: 3500 mL

1. El agua se filtra en un sistema Millipore con membranas MSI de acetato con poro de 0.22 - 0.45  $\mu\text{m}$
2. Envasar en un matraz de 4000 mL
3. Etiquetar y esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

#### 9.1.2.-BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL)

BROMURO DE ETIDIO 1 g.

AGUA DESTILADA 100 mL.

1. Agregar 1 g de BrEt a 100 mL de agua destilada, agite en un agitador magnético por varias horas para asegurar que el colorante se disuelva bien, colóquelo en un frasco ámbar y almacene a temperatura ambiente.

#### 9.1.3.-TRIS-HCl 2 M pH.8.0

TRIZMA BASE (SIGMA) 121.1g

TRIZMA HIDROCLORADO (SIGMA) 157.6 g

HCl CONCENTRADO (BAKER) para ajustar el pH.

AGUA DESTILADA c.b.p. 1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL. de agua destilada.
2. Adicionar el TRIZMA BASE poco a poco hasta solubilizar
3. Repetir la operación con el TRIZMA HIDROCLORADO.

4. Ajustar el pH a 8.0 con HCl gota a gota.
5. Aforar a 1000 mL con agua destilada
6. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$
7. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
8. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos. Enfriar y almacenar a temperatura ambiente.

#### 9.1.4.-ETILEN DIAMINO TETRACÉTICO (EDTA) 1M pH. 8.0

EDTA DIHIDRATADO (CTR) 372.26 g.

NaOH (QUIROMED) para ayudar a la solubilización del EDTA

AGUA DESTILADA c.b.p. 1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se coloca 800 mL. de agua destilada. Calentar ligeramente.
2. Adicionar el EDTA.
3. Adicionar el NaOH en hojuelas hasta solubilizar el primero.
4. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH.
5. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
6. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22 -0.45  $\mu\text{m}$ .
7. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
8. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos. Se enfría y se almacena a temperatura ambiente.

Nota: El EDTA solubiliza cuando el pH de la solución es ocho o esta muy cercano.

#### 9.1.5.-SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TRIS-BORATOS-EDTA (TBE 5X)

ÁCIDO BÓRICO 27.5 g

TRIZMA BASE (SIGMA) 540 g.

EDTA 1M pH. 8.0 10 mL.

AGUA DESTILADA c.b.p. 1000 mL.

1. En un vaso de precipitado se colocan 800 mL de agua destilada.
2. Adicionar el EDTA, ÁCIDO BÓRICO y TRIZMA BASE hasta solubilizarlos
3. Aforar a 1000 mL con agua destilada.
4. Filtrar en sistema Millipore con membrana MSI de acetato con poro de 0.22  $\mu$ m.
5. Envasar en frasco de vidrio y etiquetar.
6. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 minutos. Se enfría y se almacena a temperatura ambiente.

### 9.1.6.-FENOL-TRIS pH. 8.0 (Equilibrado)

FENOL GRADO BIOLOGÍA MOLECULAR (SIGMA) 500 g.

TRIS 1M pH. 8.0 2000 mL.

8-HIDROXIQUINOLINA 0.5 g.

1. Fundir el fenol a temperatura ambiente.
2. Adicionar un agitador magnético libre de DNAsas.
3. Agregar aproximadamente 500 mL. de Tris 1M pH. 8.0.
4. Agitar 10 minutos y se deja reposar.
5. Extraer la fase acuosa, a la que se mide el pH. con potenciómetro.
6. Se repiten los pasos 3, 4, y 5, de 2 a 3 veces, hasta alcanzar el pH de 8.0.
7. Adicionar 0.5g de 8-hidroxiquinolina.
8. Agitar por 10 minutos. Etiquetar y almacenar en obscuridad a 4°C.

### 9.1.7.-REGULADOR AZUL DE BROMOFENOL.

Este regulador sirve para 3 propósitos: Incrementar la densidad de la muestra; asegurarse que el DNA quede uniformemente dentro del pozo; proporcionar color a la muestra, además de simplificar el proceso de carga.

Mezclar 0.25% (peso/volumen) de azul de bromofenol con 40% (peso/volumen) de sacarosa en agua.

Mezclar bien. Hacer alicuotas y almacenar a 4°C.

Nota final: Todos los reactivos empleados deberán ser "Grado Biología Molecular", si no se cuenta con ellos, deben emplearse los reactivos de más alta calidad.

## 9.2.- TECNICAS EMPLEADAS. (44)

### 9.2.1.-Cuantificación de DNA por el método espectrofotométrico.

1. Colocar la muestra de DNA en tubos para microcentrifuga, adicionar agua bidestilada para realizar una dilución 1:500. Mezclar en vórtex y dar una centrifugación rápida (10000 g por 5 segundos).
2. Tomar la mitad de la solución anterior y colocarla en un tubo para microcentrifuga con agua bidestilada. Mezclar y dar una centrifugación rápida (10000 g por 5 segundos). Continuar con el proceso para obtener diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:4000.
3. Tomar lectura de las diluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de  $\lambda = 260 \text{ nm}$ .
4. Determinar la concentración de DNA de la siguiente forma:
5. Hacer una regresión lineal de las densidades ópticas obtenidas de cada una de las lecturas de las diluciones utilizando la ecuación de la recta:  $y = mx + b$ .
6. Utilizando los datos obtenidos en la regresión calcular los valores de densidad óptica corregida de cada una de las diluciones y con este valor obtener la concentración de la muestra de acuerdo a lo siguiente:
7. Una densidad óptica (D.O) = 1.0 corresponde a 33  $\mu\text{g}$  de DNA de cadena sencilla/mL y a 50  $\mu\text{g}$  de DNA de cadena doble.

### **9.2.2.-Extracción con Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico. (25:24:1)**

Para remover proteínas de las preparaciones de ácidos nucleicos se emplea una mezcla de partes iguales de fenol equilibrado y cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). El cloroformo desnatura las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica, y el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción. Además, aunque el fenol desnatura proteínas eficientemente, no inhibe completamente la actividad de RNAsas y es un solvente para RNA con cadena de poli A grande, este problema se soluciona usando la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). La extracción subsecuente con cloroformo remueve trazas de fenol de la preparación de ácidos nucleicos, para que en el futuro, las trazas de fenol no inhiban a las enzimas (de restricción, polimerasas etc.). El cloroformo y el alcohol isoamílico no requieren tratamiento previo para su uso. La mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico se almacena con Tris-HCl pH 8.0 en frascos ámbar a 4°C hasta 1 mes.

#### **Técnica.**

Adicionar un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico a la muestra de ácidos nucleicos en un tubo 1.5 mL de polipropileno con tapa.

1. Mezclar hasta formar una emulsión.
2. Centrifugar la muestra a 12000 g por 15 segundos en una microcentrifuga a temperatura ambiente. Si la fase orgánica y acuosa no se separaron bien centrifugar otra vez por mayor tiempo y velocidad.
3. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y descartar la fase orgánica.
4. Repetir los pasos 1 a 4 hasta que no se observen proteínas en la interfase de las fases acuosa y orgánica.
5. Adicionar un volumen igual de cloroformo y repetir los pasos 2 a 4.
6. Recuperar el DNA por precipitación con etanol frío o isopropanol ajustando la concentración de cationes monovalentes hasta 0.5 de NaCl, mezclar bien y agregar dos volúmenes del etanol frío o un volumen de isopropanol frío y vuelva a mezclar bien.

7. Colocar la solución en hielo y permitir que el DNA precipite, generalmente se requieren 15 a 30 minutos, pero si el tamaño del DNA o su concentración son pequeños el período de almacenaje debe extenderse a una hora y adicionar cloruro de magnesio a una concentración final de 0.01 M.
8. Recuperar el DNA por centrifugación a 0°C, 12000 g por 10 minutos.
9. Retirar el sobrenadante, cuidadosamente sin mover la pastilla (la cual puede ser invisible, esto indica que el DNA está muy limpio de sales).
10. Lavar con etanol al 70% agregando éste al tubo y centrifugar como en el paso anterior.
11. Repetir el paso 10 y disolver la pastilla que a menudo es invisible en el volumen deseado de TE o Agua destilada estéril.

Notas:

Si el fenol no esta bien equilibrado el DNA puede pasar a la fase orgánica.

Normalmente, la fase acuosa se forma en la fase superior, sin embargo, si la fase acuosa es densa a causa de sales se forma abajo. La fase orgánica es fácilmente identificable porque contiene el color amarillo de la hidroxiquinolina que se adiciona al fenol durante la equilibración.

Para realizar una mejor recuperación del DNA, la fase orgánica y la interfase pueden ser reextraídas después de que la fase acuosa ha sido transferida a otro tubo, adicione un volumen igual de TE pH 8.0, mezcle bien, separe las fases por centrifugación como en el paso 3. Combine esta segunda fase acuosa con la anterior. El DNA puede ser almacenado en solución etanólica a 0°C.

### **9.2.3.-Preparación de un Gel de Agarosa. (figura 23)**

1. Sellar los bordes de una placa de vidrio limpia y seca (o las terminaciones abiertas del dispositivo de plástico provisto con el aparato de electroforesis) con cinta adhesiva "maskingtape" para formar el molde como lo muestra la figura 23. Colocar el molde en una sección horizontal de la mesa, (verificar con un nivelador).

2. Preparar la cantidad suficiente de regulador de electroforesis (generalmente TAE 1X o TBE 0.5X) para llenar el tanque de electroforesis y para preparar el gel. Adicionar la cantidad correcta de agarosa en polvo de acuerdo a la concentración necesaria para lograr una separación adecuada de las moléculas de DNA ; medir la cantidad necesaria del regulador de electroforesis en un matraz Erlenmeyer o una botella de vidrio con tapa de rosca, el regulador no debe ocupar más del 50% del volumen del matraz o botella
3. Tapar el cuello del matraz con parafilm o si usa la botella asegurar que la tapa esté medio cerrada. Caliente la mezcla en un baño de agua hirviendo o en horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva.
4. Enfriar la solución a 60°C y adicionar el BrEt (de una solución stock de 10 mg/mL en agua) a una concentración final de 0.5 µg/mL y mezclar vigorosamente.
5. Utilizando una pipeta Pasteur selle los bordes del molde con una pequeña cantidad de la solución de agarosa, permita que selle; la posición del peine deberá estar de 0.5 a 1.0 mm arriba de la placa para que se forme un pozo completo cuando la agarosa sea adicionada. Si el peine está muy cerca de la placa de vidrio existe el riesgo de que la base del pozo se rompa cuando el peine sea retirado, permitiendo que la muestra quede entre el gel y la placa de vidrio.
6. Verter la solución de agarosa en el molde, el gel deberá ser de 3 a 5 mm de espesor; revisar para ver que no haya burbujas de aire debajo o entre los dientes del peine.
7. Después de que haya gelificado completamente, cuidadosamente retire el peine y la cinta adhesiva y colocar el gel en el tanque de electroforesis.
8. Adicionar solo la cantidad necesaria de regulador de electroforesis para cubrir el gel a una profundidad de 1 mm.
9. Mezclar las muestras de DNA con regulador de muestra (azul de bromofenol más sacarosa) y colocarlas en los pozos del gel sumergido.



10. Cerrar el tanque de electroforesis y permita que el DNA migre hacia el ánodo. Aplique un voltaje de 1-5 V/cm (mida la distancia entre los electrodos). Correr el gel hasta que el azul de bromofenol haya migrado a una distancia apropiada a través del gel.

11. Examinar el gel utilizando luz UV y fotografiar el gel. (figura 24)

Notas: Es importante que use el mismo regulador de electroforesis en el tanque y en el gel.

Pequeñas diferencias en la fuerza iónica o pH crean frentes en el gel que pueden afectar la movilidad de los fragmentos de DNA.

**Precaución :** El bromuro de etidio es un poderoso mutágeno, cancerígeno y es tóxico. Se deben usar guantes cuando se trabaje con soluciones que contienen este químico. Después de usarse los materiales deben descontaminarse antes de desecharlos.

La solución stock de bromuro de etidio debe protegerse de la luz.

Cuando prepare geles de agarosa de concentraciones arriba del 2% enfríe rápidamente a 70°C y vierta el gel inmediatamente.

La máxima cantidad de DNA que puede ser aplicado en el pozo del gel depende del número de fragmentos en la muestra y sus tamaños. La mínima cantidad del DNA que puede ser detectada por la fotografía en geles teñidos con bromuro de etidio es de 2 ng.

### **9.2.4.- Descontaminación de soluciones que contienen BrEt. (44)**

Existen diferentes métodos para descontaminar soluciones que contienen BrEt, aquí solo describiremos uno; otros pueden consultarse en la referencia 44.

#### 9.2.4.1.-Método de Bensaude (1988)

1. Adicionar 100 mg de carbon activado por cada 100 mL de solución.
2. Almacenar la solución 1 Hr a temperatura ambiente. Agitar la solución intermitentemente.
3. Filtrar la solución a través de papel Whatman No. 1. Eliminar el filtrado.
4. Colocar el filtro y el carbon activado en una bolsa, sellarla y eliminar la bolsa en un recipiente de desechos peligrosos.

#### Notas:

El tratamiento con hipoclorito de sodio a soluciones con BrEt no es recomendable como método de descontaminación, esto reduce la actividad mutagénica del BrEt en el ensayo de microsomas en Salmonella unas 1000 veces, pero lo convierte en un compuesto mutagénico en ausencia de microsomas.

El BrEt se descompone a 262°C y es poco probable que sea peligroso después de la incineración en condiciones estandares.

El carbon activado puede ser usado para descontaminar superficies contaminadas con BrEt.

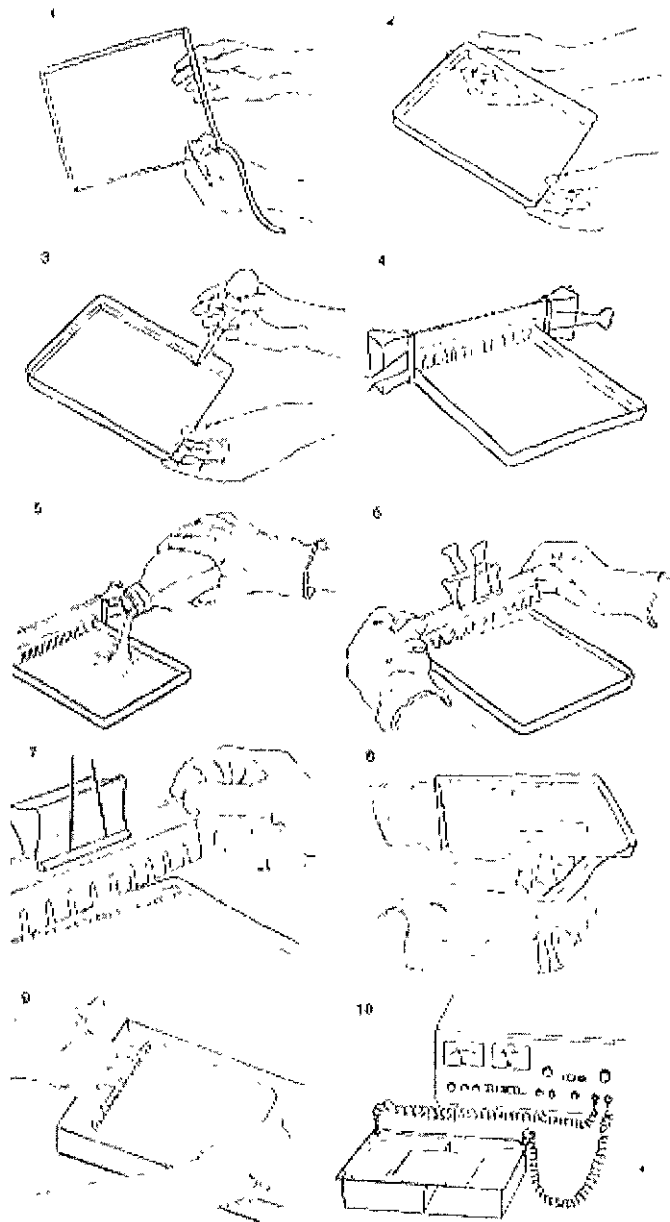


Fig. 23. Preparación de un gel de agarosa. (tomado de 44)

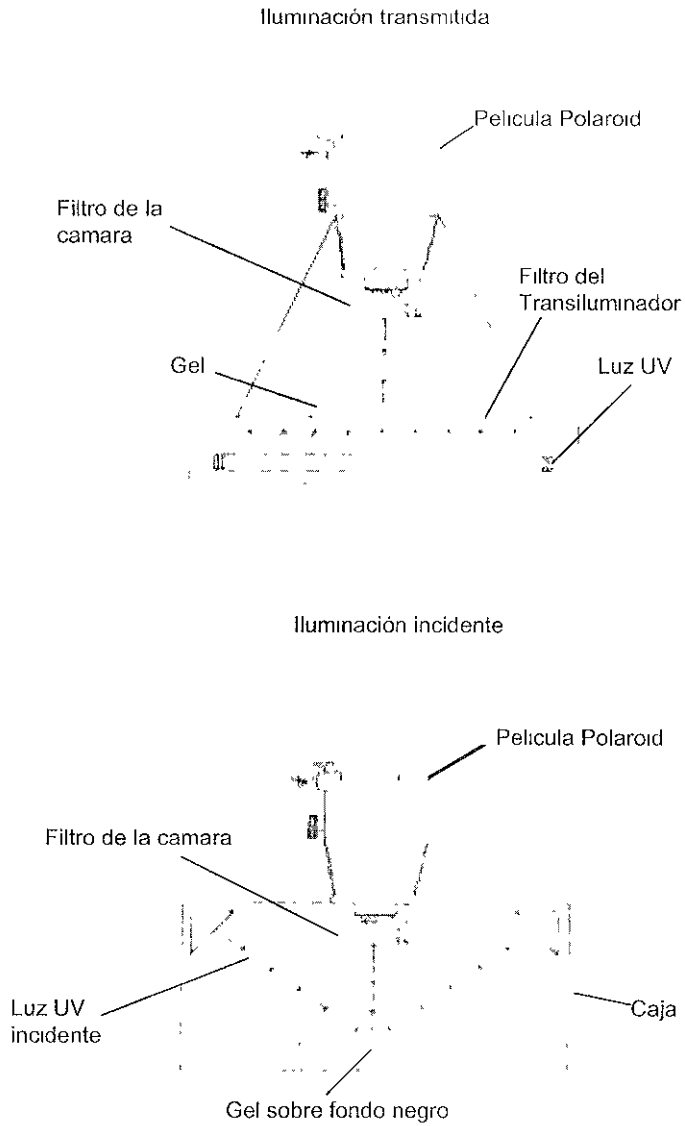


Fig.24. Observación y fotografiado del gel de agarosa (tomado de 44).

## 10.- REFERENCIAS

1. Adong Y, Dill J, Wirth SS, Huang G, Lee VII, Haworth IS, Mitas M.(1995). The trinucleotide repeat sequences d(GTC)<sub>15</sub> adopts a hairpin conformation. *Nucl Acids Res* 23:14, 2706-2714.
2. Adong Y, Dill J, Mitas M.(1995). The purine-rich trinucleotide repeat sequences d(CAG)<sub>15</sub> and d(GAC)<sub>15</sub> form hairpins. *Nucl Acids Res* 23:20, 4055-4057
3. Arenas-Aranda D, Peñalosa R, Salamanca-Gómez F (1999). Patología médica ocasionada por repetidos de trinucleótidos. *Gac Méd Méx.* 135:1, 53-65
4. Arenas-Aranda D, Salamanca-Gómez F (1999) Biología molecular del síndrome del cromosoma X frágil. *Gac Méd Méx.* 131:5-6 599-600.
5. Ashley, CT, Warren ST. (1995). Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet.* 29, 703-728.
6. Bacolla A, Gellibolian R, Shimizu M, Kang AS, Ohshima SK, et al. (1997). Flexible DNA: Genetically Unstable CTG-CAG and CGG-CCG from human hereditary neuromuscular disease genes. *J Biol Chem.* 272:27, 16783-16792.
7. Brossalina E, Demchenko E, Demchenko Y, Vlassov V, Toulme JJ. (1996). Triplex-forming oligonucleotides trigger conformation changes of a target hairpin sequence. *Nucl Acids Res.* 24:17, 3392-3398.
8. Caskey T, Pizzuti A, Ying-Hui F, Fenwick R, Nelson D. (1992). Triplet repeat mutations in human disease. *Science.* 256:784-789.
9. Charlesworth B, Sniegowski P, Sthephan W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eucaryotes. *Nature.* 371, 215-220.
10. Chastain PD, Eichler EE, Kang S, Nelson DL, Levene SD, Sinden RR. (1995) Anomalous Rapid Electrophoretic Mobility of DNA Containing Triplet Repeats Associated with Human Disease Genes. *Biochemistry.* 34 16125-16131
11. Chastain PD, Sinden RR. (1998). CTG Repeats Associated with Human Genetic Disease are inherently Flexible. *J Mol Biol.* 275 405-411
12. Darlow JM, Leach DRF. (1998). Secondary structures in d(CGG) and d(CCG) repeat tracts. Review. *J Mol Biol.* 275,3-16.
13. Darlow JM, Leach DRF. (1998). Evidence for two preferred hairpin folding patterns in d(CGG)-d(CCG) repeat tracts *in vivo*. Communication *J Mol Biol.* 275,17-23
14. Dionisios R, Alessi K, Marky LA. (1993) Thermodynamics of DNA hairpins: contribution of loop size to hairpin stability and ethidium binding. *Nucl Acids Res.* 21:11, 2683-2689.

15. Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Et al (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's Ataxia. *New Engl J Med* 335 16, 1169-1175.
16. Freudenreich CH, Stavenhagen JB, Zakian VA. (1997) Stability of a CTG/CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol Cell Biol*. 17, 2090-2098.
17. Freudenreich CH, Kantrow SM, Zakian VA. (1998). Expansion and Length-Dependent Fragility of CTG Repeats in Yeast. *Science*. 279, 853-856.
18. Fry M, Lawrence AL. (1994) The fragile X syndrome d(CGG)<sub>n</sub> nucleotide repeats form a stable tetrahedral structure. *Proc Nat Acad Sci* 99: 4950-4954.
19. Gacy AM, McMurray CI. (1998). Influence of Hairpins on Template Reannealing at Trinucleotide Repeat Duplexes: A Model for Slipped DNA. *Biochemistry*. 37, 9426-9434.
20. Gellibolian R, Bacolla A., Wells R. (1997). Triplet repeat instability and DNA topology: An expansion model based on statistical mechanics. *J Biol Chem*. 272:27, 16793-16797.
21. Hoffman EP, Jaffurs D. (1993) An expanding enigma. *Curr Biol*. 3:7, 456-459.
22. Hutton M, Greenwell P, Chin-Pin L, Norman A, Thomas DP. (1999). Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast. *Proc Natl Acad Sci*. 96, 1504-1509.
23. Jiuping J, Clegg NJ, Peterson KR, Jackson AL, Laird DC, Lawrence AL. (1996). In vitro expansion of GGC:GCC repeats: identification of the preferred strand of expansion. *Nucl Acids Res*. 24:14, 2835-2840.
24. Kenneth SG, Jie J, Fox GE, Xiaolian G. (1995). DNA CTG triplet repeats involved in dynamic mutations of neurologically related gene sequences form stable duplexes. *Nucl Acids Res*. 23:21, 4303-4311.
25. Kunkel TA. (1993). Slippery DNA and diseases. *Nature*. 365, 207-208.
26. Lenstra JA. (1995). The applications of the polymerase chain reaction in the life sciences. *Cell Mol Biol* 45:5, 603-614.
27. Massimo P, Montermini L. (1998). Molecular genetics of the hereditary Ataxias. *Adv Genet*. 38, 31-69.
28. Mitas M, Adong Y, Jeffrey D, Kamp TJ, Chambers EJ, Hawort IS. (1995) Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat (CTG)<sub>15</sub>. *Nucl Acids Res*. 23:6 1050-1059.
29. Mitas M (1997). Trinucleotide repeats associated with human disease. *Nucl Acids Res*. 25, 2245-2253.
30. Morell V. (1993) The Puzzle of the Triple Repeats. *Science*. 260, 1422-1423.

31. Murigia A, Polli R., Martella M, Vinanzi C., Opocher G (1999). **Molecular diagnosis of inherited diseases.** *Clinica Chimica Acta.* 280, 73-80.
32. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (1988). **Bioquímica de Harper.** 11ª edición. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. México, D.F. pág. 373
33. Nobuhiro T, Noboru S, Koichi S, Shoichi I. (1999). **Synthesis of long trinucleotide repeats in vitro.** *Neuroscience Letters* 262,45-48.
34. Nowak R. (1995). **Annual genetics meeting: some puzzles, some answers.** *Science.* 270,120.
35. Pearson CE, Sinden RR. (1996). **Alternative Structures in Duplex DNA Formed within the Trinucleotide Repeats of the Myotonic Dystrophy and Fragile X Loci.** *Biochemistry.* 35, 5041-5043.
36. Pearson CE, Eichler E, Lorenzetti D. (1998). **Interruptions in the triplet repeats of SCA1 and FRAXA reduce the propensity and complexity of slipped strand DNA (S-DNA) formation.** *Biochemistry.* 37:8, 2701-2708.
37. Pearson CE, Yuh-Itwa W, Griffith JD, Sinden RR. (1998). **Structural analysis of slipped-strand DNA (S-DNA) formed in (CTG)<sub>n</sub>\*(CAG)<sub>n</sub> repeats from the myotonic dystrophy locus.** *Nucl Acids Res.* 26:3, 816-823.
38. Petruska J, Hartenstine MJ, Goodman MF (1998). **Analysis of strand slippage in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease.** *J Biol Chem.* 273:9, 5204-5210.
39. Pujana MA, Volpini V, Estivill X. (1998). **Large CAG/CTG repeat templates produced by PCR, usefulness for the DIRECT method of cloning genes with CAG/CTG repeat expansions.** *Nucl Acids Res.* 26:5, 1352-1353.
40. Ravi RI, Wells RD. (1999). **Expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli* occur on the leading strand of DNA replication.** *J Biol Chem.* 274:6, 3865-3877.
41. Richards RI, Sutherland GR. (1997). **Dynamic mutation: possible mechanisms and significance in human disease.** *Reviews. TIBS* 22, 432-436.
42. Rosche W. (1996). **Single-stranded DNA-binding protein enhances the stability of CTG triplet repeats in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol.* 178: 16, 5042-5044.
43. Rosenberg, RN. (1996). **DNA-Triplet repeats and neurologic disease.** *New Engl J Med.* 17, 1222-1226.
44. Sambrook-Fritsch-Maniatis. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** (1989). 2a edición. Editorial: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
45. Sinden RR. (2000). **Alternative DNA Structures Associated with (CTG)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub>, (CGG)<sub>n</sub>, (CCG)<sub>n</sub>, and (GAA)<sub>n</sub>, (TTC)<sub>n</sub> Triplet Repeats: Biological Implications.** *Am J Hum Genet* In press.

46. Singer RH. (1996). **Triplet repeats and human disease** *Mol Med Today* 65-69
47. Singer RH. (1998). **Triplet-repeat transcripts: A role for RNA in disease.** *Science*. 280, 696-697
48. Strand M, Prolla T A, Liskay M R, Petes T D. (1993) **Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair.** *Nature*. 365:275-276
49. Sutherland GR, Richards Rl. (1995) **Simple tandem DNA repeats and human genetic disease.** *Proc Natl Acad Sci.* 92, 3636-3641
50. Sutherland GR, Richards RI. (1997). **Dynamic mutation: possible mechanisms and significance in human disease.** *TIBS* 22: 432-436
51. Tamarin RH.(1996). **Principios de genética.**Ed. Reverté pp.216.
52. Tara LD, Topal MD. (1999). **Effects of temperature, Mg<sup>+2</sup> concentration and mismatches on triplet- repeat expansion during DNA replication in vitro.** *Nucl Acids Res.* 27:11, 2235-2240.
53. Usdin K, Woodford KJ. (1995).**CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro.** *Nucl Acids Res* 23:20, 4202-4209.
54. Utz D, Behlke J, Birch-Hirschfeld E, Hartmut F. (1997) **Hairpin-dimmer equilibrium of a parallel-stranded DNA hairpin: formation of a four-stranded complex.** *Nucl Acids Res.* 25:4, 822-829.
55. Walker M, Rapley R. (1997). **Route maps in gene technology.** Ed. Blackwell Science. pp.208.
56. Wang J, Pegoraro E, Menegazzo E, Gennarelli M, Hoop R, et al.(1995).**Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation.** *Hum Mol Genet.* 4:4, 599-606.
57. White BA. (1997). **Methods in Molecular Biology** vol. 67, PCR cloning protocols. Humana press inc. Totowa, New Jersey. USA. Págs. 3,4,7.
58. Xian C, Santhana Mariappan SV, Catasi P, Ratliff R, Moyzis RK, Laayoun A, Smith SS, Bradbury EM, Goutam Gupta. (1995). **Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: Structure and biological implications.** *Proc Natl Acad Sci.* 92, 5199-5203.
59. Yotvat N, Weisman-Shomer P, Fry M. (1995). **The fragile X syndrome single strand d(CGG)<sub>n</sub> nucleotide repeats readily fold back to form unimolecular hairpin structures.** *J Biol Chem.* 270:48, 28970-28977.