



**Estudio de un pedigrí familiar de distrofia
muscular oculofaríngea (OPMD).**

*Studying a family's pedigree of
oculopharyngeal muscular dystrophy
(OPMD).*



Nuba Zamora Jordán.

Grado en Biología.

Julio de 2016.



SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

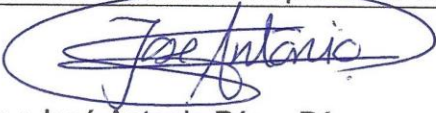
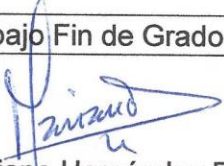
Nº DNI o pasaporte	Nombre y Apellidos:
78593893 H	Nuba Zamora Jordán
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
636810811	nu.zamjor@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Estudio de un pedigrí familiar de distrofia muscular oculofaríngea (OPMD)

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. José Antonio Pérez Pérez.	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
y D. Mariano Hernández Ferrer	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: José Antonio Pérez Pérez	 Fdo.: Mariano Hernández Ferrer

La Laguna, a 1 de julio de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

Índice

ESTUDIO DE UN PEDIGRÍ FAMILIAR DE Distrofia Muscular Oculofaríngea (OPMD).....	
RESUMEN	
<i>ABSTRACT</i>	
GLOSARIO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	
OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA OPMD	2
GENÉTICA DE LA OPMD	3
INCLUSIONES INTRACELULARES TÓXICAS DE PAB2 MUTANTES	4
LA OPMD COMO TRASTORNO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO.....	5
SINTOMATOLOGÍA.....	6
TRATAMIENTOS PALIATIVOS Y TERAPIAS COMPENSATORIAS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE ADN GENÓMICO (ADNg).....	8
<i>Frotis bucal</i>	8
<i>Muestras de cabello</i>	9
<i>Conservación de las muestras de ADNg</i>	9
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES.	9
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	10
ELECTROFORESIS DE AMPLICONES	10
SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES.....	11
GENOTIPADO DEL GEN QUE CODIFICA LA α -1-ANTITRIPSINA (<i>SERPINA1</i>)	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
.....	17
CONCLUSIONES	19
CONCLUSIONS.....	20
BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

La OPMD es una enfermedad miopática hereditaria de transmisión autosómica que muestra penetrancia incompleta y expresividad variable. Ha sido relacionada con variaciones dentro en un microsatélite que afecta a la región codificadora del gen *PABPN1* (Poly-(A) binding Protein Nuclear 1). Normalmente las mutaciones deletéreas en este microsatélite se comportan como dominantes. El objetivo del presente trabajo fin de grado es indagar en un pedigrí familiar afectado por OPMD, infiriendo el patrón de herencia, relacionando los fenotipos observados con el número de repeticiones dentro del microsatélite y estudiar una posible asociación con el déficit alfa-1-antitripsina (A1AT). Para la realización del estudio se obtuvieron muestras biológicas de un subconjunto familiar de 19 individuos, de las que se extrajo, por lisis alcalina, ADNg. Los amplicones de interés se obtuvieron, con cebadores propios, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El genotipo de los familiares estudiados se observó en geles de agarosa. El patrón de OPMD familiar sigue un modelo hereditario autosómico dominante, debido a la presencia del alelo (GCG)₁₁. Ninguno de los individuos estudiados porta los alelos deficientes *PI*S* y *PI*Z* con los que poder analizar la posible relación entre el cuadro sintomatológico de OPMD y el déficit de A1AT.

Palabras clave: *OPMD; PABPN1; pedigrí familiar de OPMD; SERPINA1*

ABSTRACT

OPMD is an autosomal dominant hereditary myopathic disease, with incomplete penetrance and variable expressivity. It is related with sequence changes in a short tandem repeat (STR) located on *PABPN1* (Poly-A Binding Protein Nuclear 1) gene's coding region. Usually, deleterious mutations act as a dominant allele. The main objective of this final project is to look into a family's OPMD pedigree in order to deduce the heritage pattern, correlate the observed phenotypes with the expansion length at STR and study the possible relation between *PABPN1* and a deficiency of alpha-1-antitrypsin (A1AT). In order to accomplish all the objectives, we collected biological samples of 19 family members and extracted the ADNg by alkaline lysis. We used PCR method to amplify the region of interest and the DNA fragments were observed through agarose electrophoresis gels. The family allele detected was (GCG)₁₁ which causes a hereditary autosomal dominant pattern. None of the studied individuals showed alleles *PI*S* or *PI*Z*, which means it was not possible to establish an association between OMPD symptoms and A1AT.

Keywords: Pedigree of OPMD family; *OPMD; PABPN1 gene; SERPINA1 gene*

GLOSARIO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS.

A1AT: Alfa-1-antitripsina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNg: ADN genómico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosín trifosfato.

CPK: Creatina fosfoquinasa.

dATP: Desoxiadenosina-5'-trifosfato

dCTP: Desoxicitidina-5'-trifosfato

dGTP: Desoxiguanosina-5'-trifosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dTTP: Desoxitimidina-5'-trifosfato

G/C: Guanina/Citosina.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

OPMD: Distrofia muscular oculofaríngea.

PABP2: *Poly(A) binding protein 2.*

PABPN1: *Poly(A) binding protein nuclear 1.*

PCR: Polymerase chain reaction.

UTR: Untranslated región.

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

El presente trabajo supone la primera aproximación al estudio de la distrofia muscular oculofaríngea en la población canaria, y su principal objetivo es la elaboración y estudio del pedigrí de OPMD de una familia de ascendencia Palmera-Majorera.

El estudio genealógico, que abarcará 6 generaciones, hace necesaria la recopilación de datos clínicos y de muestras biológicas para realizar análisis genético. El ADN_g analizado corresponde a un subconjunto de 19 individuos pertenecientes a las últimas 4 generaciones. En la tercera generación el análisis genético sólo podrá realizarse para uno de los progenitores difuntos que padeció OPMD, ya que es el único miembro generacional del que se pudieron conseguir muestras biológicas. Este estudio nos permitirá conocer si la herencia de OPMD en esta familia, sigue un patrón dominante o recesivo, y conocer qué miembros podrían manifestar la enfermedad una vez superada la edad umbral.

Adicionalmente, se comprobará si existe alguna relación entre mutaciones en el gen *SERPINA1* y la OPMD, ya que algunos autores sugieren que la expresión y/o gravedad de la patología pueden estar condicionadas por el genotipo en otros genes (Díaz et al, 2009; Tondo et al, 2011).

Por último, aparte de la carga práctica, en este trabajo se realizará una revisión bibliográfica en la que se resumirá información de interés, a modo de introducción, para un mejor entendimiento clínico, molecular y genético de la patología de estudio.

INTRODUCCIÓN

Descripción general de la OPMD

La distrofia muscular oculofaríngea (OPMD) es una enfermedad hereditaria degenerativa, de aparición tardía, que afecta a la musculatura estriada. Se trata de una enfermedad humana ocasionada por una expansión repetitiva de trinucleótidos en el seno de la región codificadora de un gen, en la que el número de repeticiones condiciona el patrón de herencia, la edad de aparición y la gravedad sintomatológica. Además, esta patología presenta expresividad variable y penetrancia incompleta lo que dificulta la realización de predicciones fenotípicas.

El origen genético de la enfermedad se encuentra en la expansión anómala del microsatélite $(GCG)_6$ del gen *poly(A)binding protein nuclear 1* (PABPN1), localizado en el cromosoma 14 en la posición 11.2 del brazo largo (Brais et al, 1998). El microsatélite presenta un contenido en Guanina-Citosina del 100% y su secuencia comienza justo corriente abajo del codón de inicio (ATG) (Figura 1).

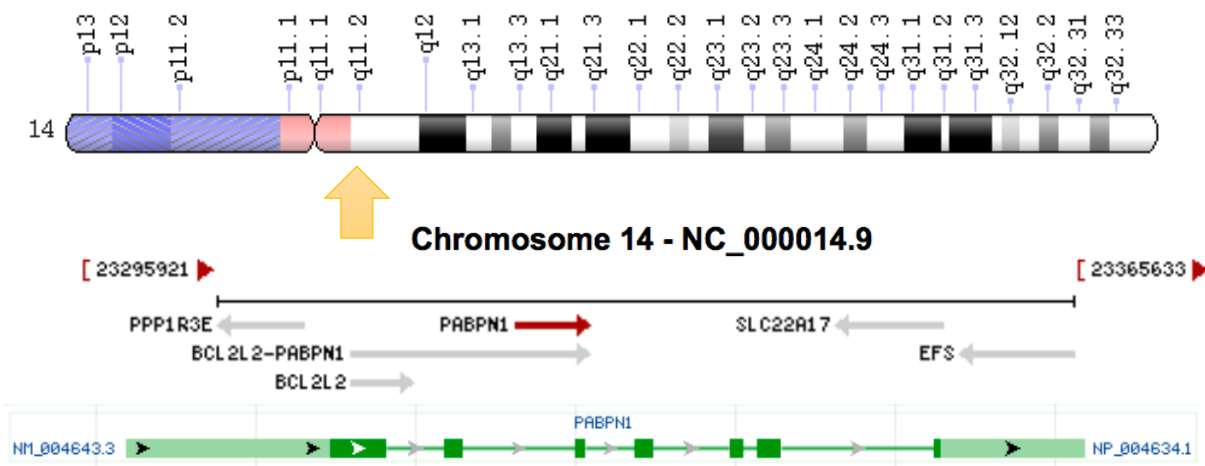


Figura 1. Localización del gen PABPN1. En la parte superior de la figura se muestra el esquema del cromosoma 14, dónde se señala con una flecha naranja, la posición del gen de interés. Resaltado en rojo se indica el contexto genómico del gen PABPN1 y su sentido de lectura. En la parte inferior se representa la estructura del gen cons 7 exones, 6 intrones y las 2 UTRs (en tono más claro).

La proteína codificada, *Poly(A)binding protein 2* (PABP2), ejerce su función en el núcleo de todas las células participando en la maduración del ARNm. Es la responsable de estimular la extensión de la cola de poli-A de los ARNm por parte de la poli-A polimerasa, que

los protege de la degradación (Figura 2). Por tanto, las mutaciones en *PABPN1* comprometen la estabilidad del ARNm, y una reducción o desregulación de su expresión ocasiona efectos negativos en el proceso de traducción. Estos efectos podrían verse reflejados en todas las vías metabólicas (Curinha et al, 2014).

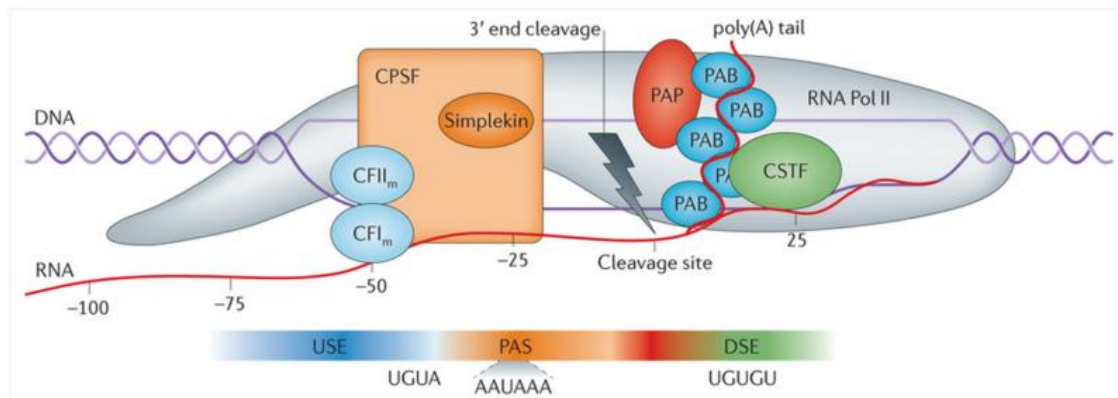


Figura 2. Esquema de la fase de terminación de la transcripción del ARNm. En el esquema se puede observar la interacción de PABP2 (PAB) con PAP (Poli-A-polimersa).

Genética de la OPMD

La secuencia $(GCN)_n$ del microsatélite implicado en la OPMD codifica para un tramo homopolimérico de 10 alaninas situado en el extremo N terminal de la proteína. En el alelo salvaje dicha secuencia está compuesta por $(GCG)_6 + (GCN)_4$, mientras que en los alelos mutantes implicados en esta patología el codón GCG se encuentra repetido entre 7 y 13 veces. El número de repeticiones GCG determina el patrón de herencia de la OPMD y condiciona la edad de aparición y la gravedad sintomatológica (Brais et al, 1998). El patrón de herencia puede ser autosómico dominante o recesivo en función del número de repeticiones. Así, en combinación con el alelo salvaje, el alelo $(GCG)_7$ se comporta como recesivo, mientras que los alelos $(GCG)_{8-13}$ son dominantes. Además, la variante $(GCG)_7$ tiene la particularidad de actuar como un modificador agravante del fenotipo en combinación con alguna de las variantes $(GCG)_{8-13}$. Así, por ejemplo, en un individuo con genotipo $(GCG)_9/(GCG)_7$ las manifestaciones de la OPMD serán más graves que si el genotipo es $(GCG)_9/(GCG)_6$ (Brais et al, 1998). Por último, aunque la OPMD suele presentarse entre los 50 y 60 años de edad, se observa un fenómeno de anticipación génica, es decir, a mayor número de repeticiones mayor severidad de los síntomas y manifestación más temprana de los mismos.

Los diferentes alelos $(GCG)_n$ en el gen *PABPN1* exhiben una alta estabilidad meiótica, estimándose una tasa de mutación de 1 por cada 598 meiosis (Brais et al, 1998), por lo que inferir el origen de un alelo mutante dentro de una población resulta relativamente sencillo, en comparación con otros microsatélites en los que se producen incrementos y reducciones, inter- e intrageneracionales, de la serie de repeticiones. Un ejemplo de tales mutaciones dinámicas es el caso del Corea de Huntington.

La OPMD es una enfermedad ampliamente distribuida. Los primeros estudios genéticos moleculares y poblacionales de la OPMD se llevaron a cabo en habitantes de la zona francesa de Canadá (Provincia de Quebec), donde se ha descrito una de las mayores frecuencias de afectados de OPMD (1/1.000) (Brais et al, 1998). En la Provincia de Quebec el alelo mutante más frecuente es el $(GCG)_9$, seguido por $(GCG)_7$ y $(GCG)_{12}$. Análisis llevados a cabo en habitantes del Reino Unido revelan que existe una proporción similar de los alelos $(GCG)_9$ y $(GCG)_{10}$ (Hill et al, 2001).

Inclusiones intracelulares tóxicas de PABP2 mutantes

Las proteínas PABP2 mutadas con el tramo de poli-alanina expandido no realizan su función correctamente, dado que son defectuosas. Además, da lugar a agregados filamentosos que se acumulan en el núcleo. Estos agregados se forman debido a la interacción entre los tramos de alanina, puesto que éste es un aminoácido altamente hidrófobo (Yahya et al, 2013). La formación de los agregados proteicos se debe a la tendencia de asociación de los compuestos hidrófobos para minimizar la superficie de contacto con el solvente polar. A mayor longitud del microsatélite $(GCG)_n$ mencionado, más largo será el tramo de poli-alanina y mayor tendencia a formar agregados.

La presencia de inclusiones nucleares, de diámetro variable, es la característica histopatológica identificativa de la OPMD. Estas inclusiones pueden apreciarse en muestras de tejido muscular estriado tanto con microscopía electrónica como óptica. Las inclusiones aumentan la “toxicidad celular”, entendida como una desregulación del equilibrio homeostático proteico, favoreciendo la apoptosis. Los agregados tóxicos no pueden ser eliminados por el sistema celular Ubiquitina-Proteasoma, puesto que los oligómeros de poli-alanina son extremadamente resistentes a la desnaturalización química y enzimática, produciéndose una

acumulación paulatina. Esta acumulación conlleva una reducción de la cantidad de PABP2 soluble, tanto la forma mutada y como la normal, que ocasiona un deterioro progresivo de las funciones celulares y metabólicas (Yaha et al, 2013)

A pesar de que las inclusiones nucleares son uno de los distintivos de OPMD, algunos autores afirman que éstas no son exclusivas de tejidos musculares afectados, sino que se pueden apreciar también en núcleos de músculo estriado sano pero envejecido (Yaha et al, 2013). Además, se han descrito para otras enfermedades degenerativas causadas por la repetición de tripletes, como la enfermedad de Huntington (Brais et al, 1998).

La OPMD como trastorno de envejecimiento acelerado.

La muerte celular temprana y el declive de las funciones de las células estriadas en la OPMD, se asemejan a los cambios moleculares observados en tejidos musculares envejecidos. Las vías metabólicas afectadas en la OMPD son similares a las que han sido asociadas con el envejecimiento muscular, y aproximadamente el 30% de los genes cuya expresión está alterada en la vejez también están desregulados en esta distrofia muscular. Estos genes están implicados en procesos celulares como la fosforilación oxidativa, la contracción muscular y el sistema Ubiquitín-Proteasoma, y su disfunción ocasiona una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, la disminución de la tasa metabólica mitocondrial, la reducción de la tasa de crecimiento celular y de la miogénesis. Tanto en la OPMD como en el envejecimiento, el proceso más afectado es el procesamiento del ARNm, concretamente el corte y empalme de exones, realizado por el ayustosoma (Yahal et al, 2013).

Los niveles de la proteína PABP2 disminuyen con la edad, al igual que lo hacen en la OPMD (Raz and Raz, 2014). Siendo la expresión de la proteína dependiente de la edad (Figura 3) y un factor determinante de la debilidad muscular, la OPMD debería considerarse como un trastorno de aceleración del envejecimiento celular (Yahal et al, 2013)

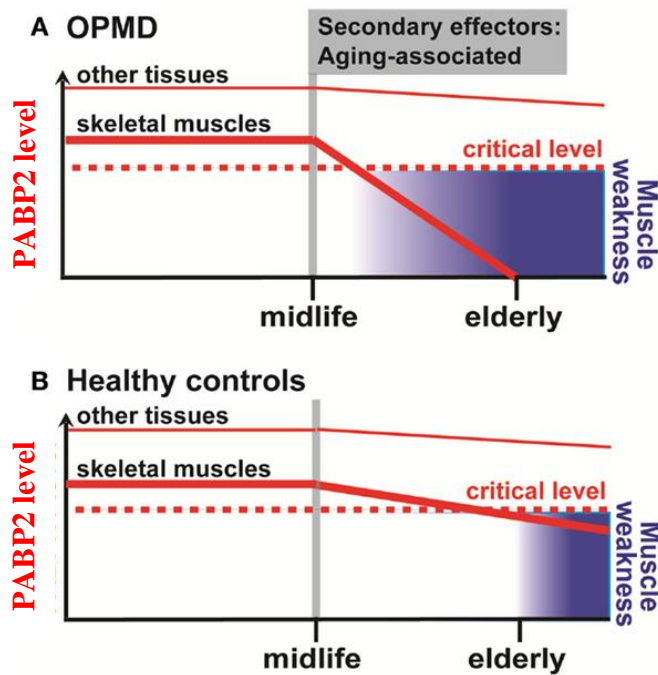


Figura 3. Gráficas comparativas de la reducción del nivel de PABP2. (A) Caso de OPMD dónde se representa la disminución acelerada y precoz, en el tejido muscular, de PABP2 soluble. (B) Caso de envejecimiento normal en el que la concentración de PABP2 disminuye paulatinamente. La reducción de la tasa de miogénesis, por déficit de la proteína PABP2, están directamente relacionadas con la debilidad muscular.

Sintomatología.

El cuadro sintomatológico de la OPMD es variable, solapando con otras dolencias, y el abanico de manifestaciones patológicas difieren en intensidad. Por ello, el diagnóstico no se considera firme hasta la realización del análisis genético. De manera general, los síntomas incluyen ptosis palpebral, disfonía, disfagia y debilidad muscular, sobre todo de las extremidades proximales. El orden de aparición de los síntomas varía, pero, en general, la ptosis es el primero en manifestarse. El procedimiento utilizado para determinar la severidad fenotípica consiste en contabilizar el tiempo necesario para ingerir un volumen determinado de agua fría (Brais et al, 1998).

Tratamientos paliativos y terapias compensatorias.

Dentro del tratamiento de la enfermedad podemos encontrar, además de las técnicas de intervención quirúrgica, terapias génicas, celulares y estrategias farmacológicas. Las

intervenciones quirúrgicas tienen como objetivo corregir síntomas, como la ptosis o la disfagia, para mejorar la calidad de vida de los afectados. Las terapias moleculares y celulares son prometedoras, pero aún están en fase de investigación. (Harish et al, 2015). La complejidad molecular de la patología hace difícil la elaboración de terapias génicas, aunque estas supondrían la cura definitiva la enfermedad (Harish et al, 2015).

MATERIAL Y MÉTODOS.

Extracción y conservación de ADN genómico (ADNg)

El protocolo exacto de extracción de ADNg dependió del origen biológico de la muestra. Con 18 de los familiares se realizaron frotis bucales, y en el caso del individuo difunto se emplearon muestras de cabello.

Frotis bucal

Esta recolección de muestras se realizó en la isla de La Palma, aprovechando que todos los miembros de la familia se encontraban de visita durante el periodo navideño. Los frotis se realizaron con un hisopo de algodón estéril durante 1 minuto, en horario de mañana y en estado de ayunas, procurando que el extremo de algodón rotara entre la pared bucal y la encía. A continuación, el extremo de algodón se cortó y se depositó en un tubo de 0'5 ml rotulado con un número identificativo. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su transporte, también en frío, a los laboratorios de Genética del Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (Universidad de La Laguna), dónde se mantuvieron a -20°C.

El protocolo de extracción (Ramos-Díaz et al., 2015) fue el siguiente:

1. Precalear un bloque térmico a 75°C.
2. Con ayuda de un bisturí, cortar una sección de la superficie del algodón de aproximadamente 3x3 mm, y depositarla en un tubo de 0'5 ml. Entre cada dos muestras el bisturí se limpió con etanol al 96%.
3. Lisar las células en presencia de 20 µl de NaOH 0'2 M e incubando a 75°C durante 5 min.
4. Añadir 180 µl de tampón Tris-HCl 40 mM, pH 8'0, EDTA 0'55 mM, y agitar enérgicamente durante 30 s. El Tris mantiene un pH adecuado y el EDTA protege al ADN de las desoxirribonucleasas.
5. Centrifugar a 18.000 x g durante 5 min.
6. Recoger 160 µl del sobrenadante, sin tocar el sedimento, y transferir a un tubo limpio.

Muestras de cabello

En este proceso de extracción de ADNg se utilizaron un número variable de secciones de 1 cm de longitud de la porción proximal de cada cabello. El protocolo que se aplicó es el mismo que se detalla arriba, pero las muestras fueron tratadas con la solución alcalina en un tubo de 0,2 ml e incubadas a 95°C durante 30 min en un termociclador con la tapa calefactora a 105°C.

Conservación de las muestras de ADNg

Los extractos de ADNg se subdividieron en dos alícuotas de 80 µl y se conservaron a -20°C. Puesto que la congelación y descongelación fragmenta el ADN, sólo se utilizaba una de estas alícuotas hasta su agotamiento.

Diseño de oligonucleótidos cebadores.

Los cebadores usados en las reacciones de amplificación o de secuenciación fueron diseñados, siguiendo las recomendaciones habituales, con el programa Gene Runner versión 5.1, a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *PABPNI* disponible en el GenBank (NG_008239). Puesto que la región genómica de interés tiene un elevado contenido en pares G/C, los cebadores finalmente elegidos presentan una elevada temperatura de fusión, con la intención de que puedan competir eficientemente con la reasociación de las cadenas del amplicón durante la etapa de anillado de la PCR. Dado que los diferentes alelos mutantes descritos con expansión de microsatélite, difieren de la variante salvaje en una longitud de entre 3 a 21pb, se procuró que el tamaño del amplicón fuese lo suficientemente pequeño como para facilitar la resolución de alelos mediante electroforesis. Los cebadores empleados en este trabajo se detallan en la Tabla 1, y la secuencia de los amplicones correspondientes se muestran en la Figura 4.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
D1	GGCGGGCCCCAGTCTGAGCGGCGAT	90'6
R1	CCACCGGCCCCGGGCACAAGATGG	89'0
D2	CGTGGCCGCGCAGCTCTCCAATCG	89'4
R2	CTCCAGTTCTCAGACTCCAGGCCGTTCCCGTA	89'5

Tabla 1. Detalles de los oligonucleótidos cebadores empleados en este estudio. En azul se resaltan las posiciones del cebador que discriminan al pseudogen de *PABPNI* localizado en el cromosoma 19. El cebador D2 no tiene sitio de unión en dicho pseudogen. D: cebador directo; R: cebador reverso; Tm: temperatura de fusión (*melting temperature*).

a)

GGCGGGCCCCAGTCTGAGCGGCGATG**GCGGGCGGGCGGGCGGGCGGCAGCAGCAGCG**GGGGCTGCGG
CGGGTCGGGGCTCCGGGCCGGGGCGGGCGGC**CCATCTTGTGCCCGGGGCCGGTGG**

b)

CGTGGCCGGCGCAGCTCTCCAATCGCCGGGCGGGCGGGCCCCAGTCTGAGCGGCGATG**GCGGGCGGGC**
GCGGGCGGGCGGCAGCAGCAGCGGGGGCTGCGGGCGGTTCGGGGCTCCGGGCCGGGGCGGGCGGCCAT
CTTGTGCCCGGGGCCGGTGGGGAGGCCGGGGAGGGGGCCCCGGGGGGCGCAGGGGA**CTACGGGAAC**
GGCTGGAGTCTGAGGAACGGAG

Figura 4. Secuencia de los amplicones analizados en el presente trabajo. El microsatélite objeto de estudio se encuentra subrayado, y se muestra la variante salvaje (GCG)₆. En color azul se destaca la secuencia que codifica el tramo de 10 residuos de alanina. Los lugares de unión de los cebadores se resaltan en negrita. **a)** Amplicón de 121 pb (85% G/C) esperado con la pareja de cebadores D1/R1. **b)** Amplicón de 222 pb (81'1% G/C) esperado con la pareja de cebadores D2/R2.

La especificidad de los cebadores diseñados, en especial su capacidad para discriminar el pseudogén de *PABPN1* localizado en el cromosoma 19, se comprobó con la aplicación web “Primer-Blast”, disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos de 0,2 ml y con un volumen final de 20 µl. La cantidad de muestra empleada fueron 2 µl de extracto de ADNg, o de agua en el caso del control negativo, y 18 µl de la mezcla maestra de reacción. La composición exacta de la mezcla de reacción, así como los parámetros del perfil térmico de amplificación, fueron objeto de una laboriosa optimización, cuyos detalles más importantes se indican en la sección de resultados.

Electroforesis de amplicones

La especificidad y rendimiento de las reacciones de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% y en tampón de electroforesis TBE 1X. El volumen de PCR analizado osciló entre 5- 15 µl, al que se le incorporó tampón de carga 6X. El marcador de peso molecular utilizado fue *DNA Ladder 50 bp* de *AppliChem*. Las electroforesis se dejaron correr hasta que el frente de azul de bromofenol salió del gel. Los resultados de la electroforesis se observaron y fotografiaron tras tinción con bromuro de etidio (agente intercalante cancerígeno), y exposición a luz ultravioleta (UV).

Secuenciación de amplicones

Los amplicones fueron preparados para secuenciar mediante tratamiento con un preparado comercial *ExoProStar* (Amershan, GE Healthcare), que incluye una actividad exonucleásica (degrada los cebadores no utilizados en la amplificación), y una fosfatasa alcalina (desfosforila los nucleótidos no utilizados). En concreto, 5 μ l de PCR se mezclaron con 1 μ l del preparado en un tubo de 0,2 ml. Esta reacción de limpieza se incubó en un termociclador a 37°C durante 30 min, con la tapa calefactora a 105°C para evitar la evaporación de la reacción. Finalmente, las enzimas mencionadas fueron inactivadas mediante calentamiento a 80°C durante 15 min. Las secuenciaciones fueron realizadas en un servicio externo (Macrogen, Inc). Los resultados de la secuenciación fueron visualizados mediante el programa MEGA6.

Genotipado del gen que codifica la α -1-antitripsina (*SERPINA1*)

La presencia de los alelos defectivos *PI*S* y *PI*Z* del gen *SERPINA1* se realizó con un método homogéneo basado en la PCR a tiempo real y en el análisis de la temperatura de fusión de amplicones, tal como se describe en la memoria de Trabajo de Fin de Grado de D^a Ana Díaz de Usera (Universidad de la Laguna, Grado de Biología, julio de 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras entrevistar a varios miembros de la familia objeto de estudio, se recopiló información de interés sobre 69 individuos que se muestra resumida en el árbol genealógico de la Figura 5. El pedigrí de 6 generaciones incluye 20 personas que han mostrado sintomatología típica de la OMPD sobrepasados los 50 años de edad. La mayoría de las personas afectadas padecieron de nódulos en las cuerdas vocales acompañados de periodos de afonía grave, como un anticipo a los síntomas típicos de la enfermedad recogidos en las guías médicas.

El patrón de herencia observado concuerda con un carácter autosómico, ya que afecta por igual a ambos sexos, y en varios casos el carácter es transmitido desde un progenitor varón a un descendiente masculino. También parece que el alelo mutante implicado es dominante, puesto que su manifestación no salta generaciones. Para realizar esta última inferencia, se debe de tener en cuenta que ningún individuo de las dos últimas generaciones ha alcanzado la edad a partir de la cual comienzan a aparecer los síntomas de la OMPD. La suposición contraria implicaría que en 9 casos un individuo externo al pedigrí aportara un alelo mutante recesivo y raro, lo cual es altamente improbable.

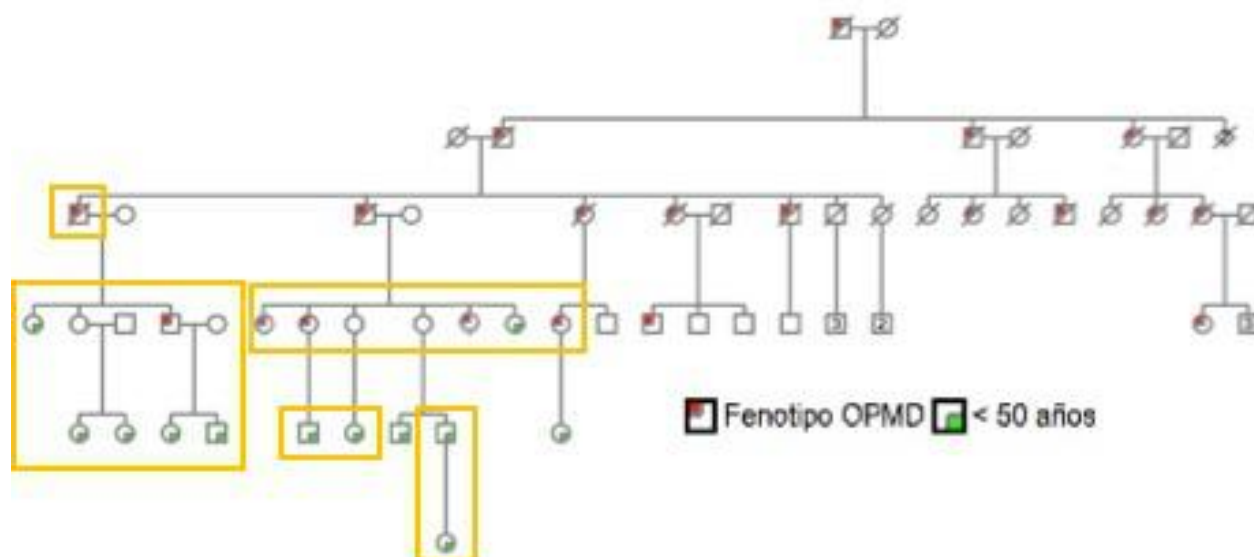


Figura 5. Genealogía de OMPD en la familia objeto de estudio. Los símbolos marcados con una línea oblicua corresponden a personas fallecidas. Aquellos miembros de la familia de los que se pudo obtener muestras biológicas se incluyen en los recuadros de color naranja.

Una vez extraído el ADN_g a partir de la colección de muestras biológicas (Figura B), se procedió a la amplificación del locus de interés con la primera pareja de cebadores diseñada (D1/R1; Tabla 1). La composición de la mezcla de reacción y el perfil térmico utilizado en la PCR se detalla en la Tabla 2. Dicha mezcla incluyó dimetilsulfóxido (DMSO), compuesto que debilita los puentes de hidrógeno entre pares de bases del ADN, con la intención de facilitar la amplificación de un fragmento de alto contenido en pares G/C (Figura 4).

Mezcla de reacción	
Reactivos	Concentración final
Tampón de reacción (Phire)	1X (MgCl ₂ 1'5 mM)
dNTP	0'2 mM cada uno
Cebador D1	0'2 μM
Cebador R1	0'2 μM
DMSO	3%
Phire® Hot Start II ADN Polimerasa	0'4 μl/reacción

Programa de amplificación		
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	30
40 ciclos de amplificación		
Desnaturalización	98	10
Anillado	80	20
Extensión	72	10
Extensión final	72	120

Tabla 2. Condiciones iniciales de la mezcla de PCR y del perfil térmico de amplificación.

El ensayo de amplificación con los cebadores D1/R1 se realizó con dos muestras aleatorias de ADN_g obtenidas a partir de frotis bucales y su resultado se muestra en la Figura 6. Tras la secuenciación de los amplicones obtenidos, se comprobó que en ambos casos se había originado el mismo artefacto, resultante de la recombinación *in vitro* entre secuencias del gen *PABPN1* y su pseudogén en el cromosoma 19, tal como se muestra en la Figura 6. Ante la observación de que una pequeña secuencia (TGGCGG), en parte localizada en el seno del microsatélite, parece haber favorecido la formación de la molécula recombinante, se decidió diseñar una nueva pareja de cebadores (D2/R2) más alejados de dicha secuencia. A diferencia de los cebadores

anteriores, el cebador D2 no tiene un potencial sitio de unión en el pseudogén y el cebador R2 presenta en su extremo 3' dos emparejamientos incorrectos con respecto al pseudogén.

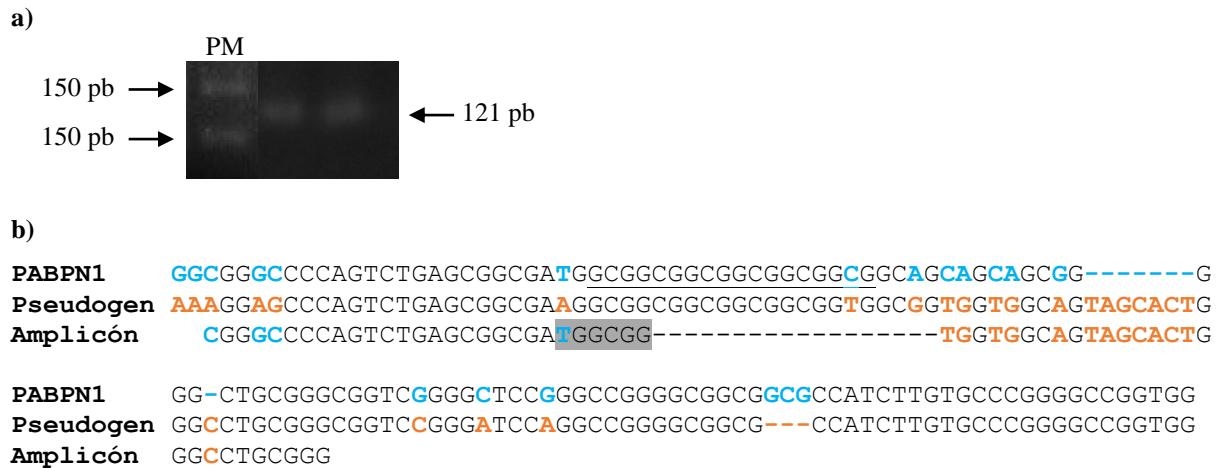


Figura 6. Análisis genético con los cebadores D1 y R1. a) Electroforesis de los amplicones obtenidos con dos muestras de ADN_g tomadas al azar. PM: marcador de peso molecular. b) Comparación de la secuencia deducida para el amplicón con las secuencias de interés del gen *PABPN1* y la homóloga del pseudogén que interfiere en el análisis. Se resaltan con diferentes colores las posiciones que distinguen a estos dos loci y en fondo gris la secuencia que parece haber mediado en el evento de recombinación *in vitro*. Se muestra subrayado el microsatélite (GCG)₆.

Cuando los oligonucleótidos cebadores D2/R2 fueron probados en las condiciones recogidas en la Tabla 2 los resultados fueron insatisfactorios, con bajo rendimiento del amplicón de interés y abundancia de dímeros de cebador y otros productos de amplificación inespecíficos. Por ello se procedió a realizar una optimización, incrementando la cantidad de DNA polimerasa (0`8 µl de Phire/reacción), y probando diferentes temperaturas de anillado (70, 75 y 80°C) y números de ciclos (40 y 45). Los mejores resultados se obtuvieron con 80°C durante la etapa de unión de los cebadores y con 40 ciclos de amplificación (Figura 7). En el caso de las muestras de ADN_g procedentes de cabello sólo se obtuvo un resultado positivo con los extractos preparados a partir de 10 secciones de cabello y con 45 ciclos de amplificación.

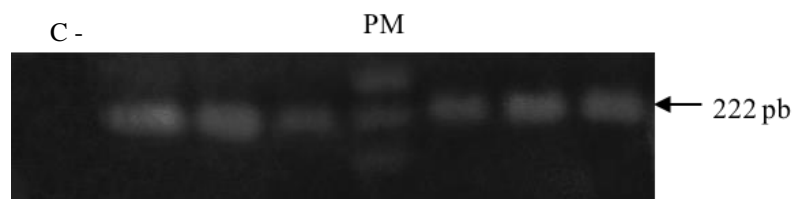


Figura 7. Amplicones obtenidos con los cebadores D2 y R2 en las condiciones optimizadas. Se presentan los resultados obtenidos con 6 muestras de ADN_g procedentes de frotis bucales. Las bandas del marcador de peso molecular (PM) que se observan corresponden, de abajo hacia arriba, a fragmentos de 150, 200 y 250 pb. Control negativo (C -).

una vez incorporado al amplicón, debilita la fuerza de unión entre las cadenas de ADN, ya que forma dos puentes de hidrógeno con la citosina en lugar de tres. Además, se testaron diferentes variables: concentración de DMSO en la mezcla de reacción (3, 5 y 7'5%), temperatura de anillado (70, 73, 76 y 79°C) y número de ciclos de amplificación (40 y 45). Las condiciones finalmente elegidas como óptimas, que se muestran en la Tabla 3, son aquellas que minimizaron la diferencia de rendimiento entre los amplicones obtenidos con el individuo heterocigótico.

Mezcla de reacción	
Reactivos	Concentración final
Tampón de reacción (AmpliTaq Gold)	1x
MgCl ₂	1'5 mM
dATP, dCTP y dTTP	200 µM cada uno
dGTP: 7-deaza-dGTP	100:100 µM
Cebador D2	1 µM
Cebador R2	1 µM
DMSO	5%
AmpliTaq Gold DNA Polimerasa	2 unidades/reacción

Programa de amplificación		
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	5
40 ciclos de amplificación		
Desnaturalización	95	20
Anillado	70	20
Extensión	72	30
Extensión final	72	300

Tabla 3. Condiciones optimizadas para la amplificación con los cebadores D2/R2. Con la muestra de ADN_g obtenida a partir de cabello fue necesario aplicar 45 ciclos de amplificación.

El resultado de aplicar el protocolo de amplificación optimizado se muestra en la Figura 9. De los 19 individuos analizados, 7 son portadores del alelo mutante (GCG)₁₁, sin embargo, la supuesta muestra procedente del individuo difunto presentó un patrón de bandas que se corresponde con el de un genotipo homocigótico salvaje. Puesto que dicho individuo padeció OMPD, se deduce que las muestras de cabello pertenecen a otra persona. En la Figura 10 se reúnen los datos de genotipo inferidos en el presente estudio con los datos genealógicos. El alelo (GCG)₁₁ fue detectado en todos los individuos analizados que padecen OMPD, y en dos

de individuos que aún no han manifestado los síntomas de la enfermedad. Aunque no se pudo conseguir muestras biológicas de los individuos III-7 y III-9 se pueden realizar ciertas predicciones. Por un lado, el individuo III-7 no tiene el alelo $(GCG)_{11}$ ya que ninguno de sus progenitores es portador del mismo. Por otro lado, el individuo III-9 tiene una probabilidad del 50% de ser heterocigótico $(GCG)_6 / (GCG)_{11}$.

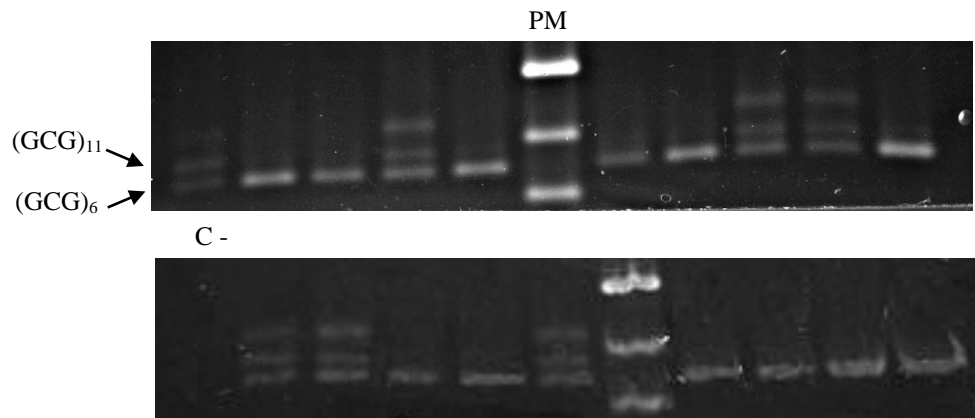


Figura 9. Genotipado del microsatélite $(GCG)_n$ implicado en OPMD en 19 individuos de la familia analizada. Además de las bandas correspondientes a los alelos $(GCG)_6$ y $(GCG)_{11}$, en los individuos heterocigóticos se puede observar una tercera banda de moléculas de ADN heterodúplex originadas durante la amplificación. Las bandas del marcador de peso molecular (PM) que se observan corresponden, de abajo hacia arriba, a fragmentos de 150, 200 y 250 pb. El control negativo (C -) no muestra signos de contaminación

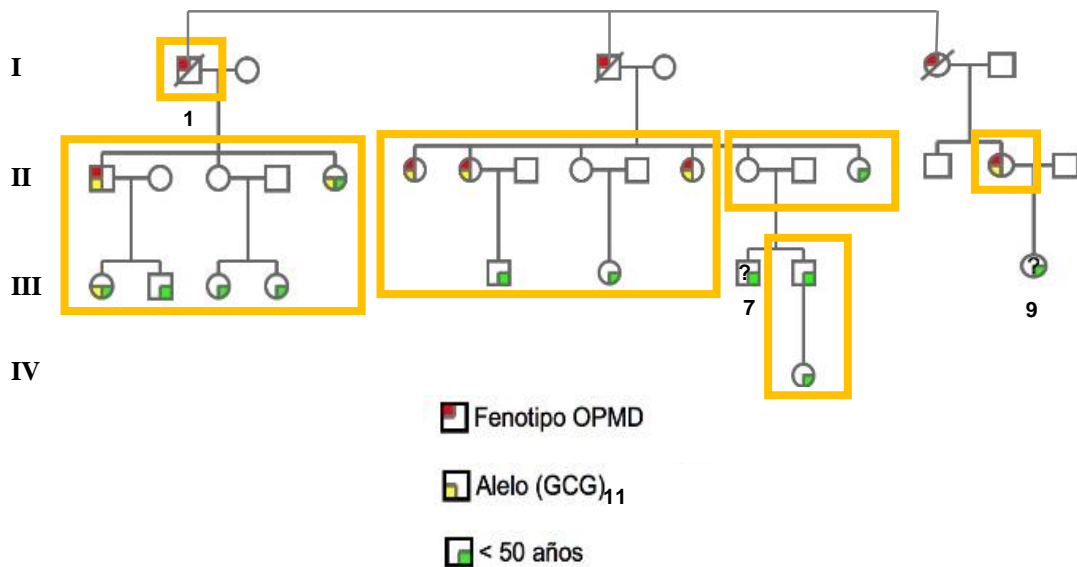


Figura 10. Genealogía mostrando genotipos y fenotipos de los individuos analizados. Los subconjuntos de familiares estudiados están incluidos en los recuadros naranjas. Aunque el individuo II-1 no pudo ser analizado, se asume que es heterocigótico $(GCG)_6 / (GCG)_{11}$.

Para finalizar el presente estudio, se analizó la presencia de los alelos mutantes más frecuentemente asociados con la deficiencia en α -1-antitripsina. Como se muestra en la Figura 11, no detectamos los alelos PI^*S y PI^*Z en los individuos genotipados. Por tanto, no tenemos evidencias que asocien la OPMD con el déficit de α -1-antitripsina. Esto no descarta que en la familia estudiada exista alguna otra mutación que afecte al correcto funcionamiento del gen *SERPINA1*.

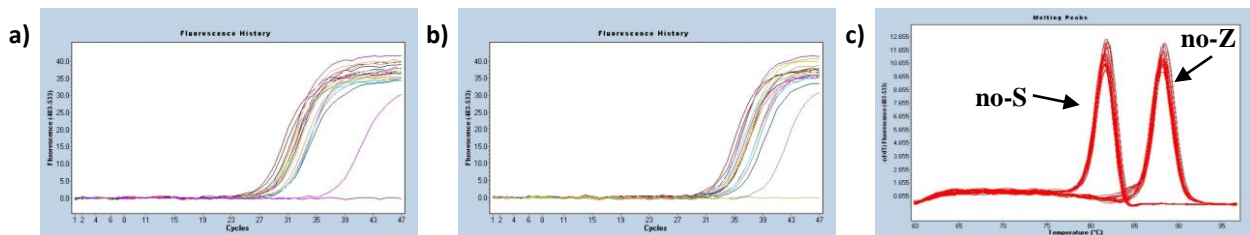


Figura 11. Genotipado del locus *SERPINA1* en los 19 familiares. Se muestra el seguimiento a tiempo real de la amplificación en el ensayo de genotipado para las variantes no-S/S (a) y no-Z/Z (b). La amplificación a ciclos más tardíos corresponde a la muestra de ADN_g obtenida de cabello. El análisis de fusión (c) sólo detecta las variantes salvajes.

CONCLUSIONES

Atendiendo a los resultados obtenidos, podemos concluir:

- 1) La herencia de OPMD en la familia estudiada sigue un patrón autosómico dominante.
- 2) Se ha conseguido extraer ADN_g a partir de muestras de pelo usando mediante tratamiento con hidróxido sódico a alta temperatura.
- 3) A pesar del alto contenido en pares G/C de la repetición en tándem corta (STR), conseguimos amplificar esta región usando DMSO y 7-deaza-dGTP.
- 4) El alelo mutante que afecta a la familia es (GCG)₁₁, lo cual es concordante con la herencia autosómica dominante deducida.
- 5) Todos los miembros de la familia que presentan síntomas de OPMD son portadores del alelo (GCG)₁₁ y dos familiares menores de 50 años también presentan el alelo mutante.
- 6) El conocimiento del genotipo de los familiares y del patrón de herencia nos permite deducir la probabilidad de que miembros no muestreados sean portadores. Por ejemplo, el individuo III-7 es homocigótico salvaje, mientras que el III-9 tiene un 50% de probabilidad de ser portador.
- 7) Ninguno de los miembros familiares analizados porta las variantes *PI*S* o *PI*Z* del gen *SERPINA1*, por lo que no encontramos ninguna asociación entre el déficit de alfa-1-antitripsina y el desarrollo de la OPMD.

CONCLUSIONS

In the light of our results, we can conclude that:

- 1) Inheritance pattern of OPMD behaves like a dominant autosomic one in the studied family.
- 2) We managed to extract ADNg from hair samples using the extraction method with sodium hydroxide at high temperature.
- 3) Despite the high percentage on G/C pairs of the short tandem repeat (STR), we achieved to amplify this region using DMSO and 7-deaza-dGTP.
- 4) The present PABPN1 mutant allele affecting family members is (GCG)₁₁ which is in agreement with the autosomic dominant inheritance deduced.
- 5) All the studied symptomatic individuals carry the (GCG)₁₁ allele and two asymptomatic relative, but younger than 50 years old too.
- 6) Knowledge of relatives' genotype and inheritance pattern allows us to deduce the probability of non-sampled family members to be carriers. For example, the individual III-7 is homocigotic wild type, while III-9 has a 50% probability of being carrier.
- 7) Neither of the analyzed family members carry *PI*S* or *PI*Z* variants of *SERPINA1* gene, therefore, we did not find any association between alpha-1antitrypsin deficiency and OPMD onset.

BIBLIOGRAFÍA

- Brais B**, Bouchard J. P, Xie Y. G, Rochefort D. L, Chrétien N, Tomé F. M, Lafrenière R. G, Rommens J. M, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korczyn A. D, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codère F, Fardeau M and Rouleau G. A (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature*. 18: 164-167
- Curinha A**, Oliveira Braz S, Pereira-Castro I, Cruz A and Moreira A (2014). Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus*. 6: 508-519.
- Díaz de Liano A**, Fernández R. L, Concepción Yáñez C. A, González A. G, Artajona R. A and Ortiz H. H (2009). Distrofia muscular oculofaríngea: Tratamiento quirúrgico. *Rev. Chilena de Cirugía*. 4:360-365.
- Harish P**, Malerba A, Dickson G and Bachtarzi H (2015) Progress on gene therapy, cell therapy, and pharmacological strategies toward the treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human Gene Therapy*. 26: 286-92.
- Hill ME**, Creed GA, McMullan TF, Tyers AG, Hilton-Jones D, Robinson DO and Hammans SR (2001). Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain*. 124: 522-526.
- Ramos-Díaz R**, Gutiérrez-Nicolás F, Nazco-Casariago GJ, González-Perera I and Pérez JA (2015). Validation of a fast and low-cost alkaline lysis method for gDNA extraction in a pharmacogenetic context. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 75: 1095-1098.
- Raz Y** and Raz V (2014). Oculopharyngeal muscular dystrophy as a paradigm for muscle aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 6 Supl 317: 1-5.
- Tondo M**, Gámez J, Gutiérrez-Rivas E, Medel-Jiménez R and Martorell L (2012). Genotype and phenotype study of 34 Spanish patients diagnosed with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol*. 259:1546–1552.

Yahya Anvar S, Raz Y, Verwey N, Van der Sluijs B, Venema A, Goeman J. J, Vissing J, Van der Maarel M. S, 'T Hoen A.C. P, Van Engelen G.M. B and Raz V (2013). A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in Oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. *AGING*. 5: 412-426.