

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA DE  
REPETIÇÕES DO TRINUCLEOTÍDEO CTG NO GENE *DMPK* EM  
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E EM PACIENTES COM DISTROFIA  
MIOTÔNICA TIPO 1**

**Luiza Paulsen Rodrigues**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Saraiva-Pereira.

Porto Alegre, novembro de 2016

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisa Experimental e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira, pela orientação, oportunidade, confiança e por todos os ensinamentos que foram essenciais para o meu crescimento profissional e científico.

Aos colegas de Laboratório de Identificação Genética, pela convivência diária, motivação e amparo nessa etapa.

Aos meus pais e meu irmão, meus principais incentivadores, pelo apoio incondicional e por serem a minha fonte de força.

Aos meus amigos, pela torcida incessante, encorajamento e companheirismo.

À UFRGS e órgãos de fomento que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos pacientes e familiares por proverem amostras biológicas para este estudo.

A todos, que de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## ÍNDICE

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de Figuras.....	7
Lista de Abreviaturas.....	8
1 Introdução.....	10
1.1 A Organização do Genoma Humano .....	10
1.2 Os Microsatélites.....	11
1.3 O Gene DMPK.....	12
1.4 A Proteína DMPK.....	13
1.5 As Doenças de Expansão de Repetições Trinucleotídicas .....	15
1.6 A Distrofia Miotônica Tipo 1 .....	17
1.6.1 Manifestações Clínicas da DM1.....	18
1.6.2 A Genética Molecular da DM1 .....	20
1.6.3 Mecanismos de Patogênese da DM1 .....	23
1.6.4 Diagnóstico e Terapia da DM1 .....	28
2 Objetivos .....	30
2.1 Objetivo Geral .....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3 Capítulo I.....	31
Distribution of allelic frequencies of CTG repeats at <i>DMPK</i> gene in myotonic dystrophy type 1 patients and healthy individuals from Brazil and Peru.....	32
4 Discussão Geral.....	50
5 Conclusões.....	54
6 Referências .....	55
Anexo .....	63

## RESUMO

O gene *DMPK* (*Dystrophia Myotonica-Protein Kinase*) humano está localizado no *locus* 19q13.3, sendo dividido em 15 éxons, com uma região polimórfica de repetições CTG em sua região 3' não traduzida. Indivíduos normais apresentam de 5 a 34 repetições CTG. Indivíduos com alelos com mais de 50 repetições CTG apresentam distrofia miotônica tipo 1 (DM1), uma doença multissistêmica de herança autossômica dominante. Os sintomas incluem miotonia, fraqueza muscular progressiva, hipogonadismo, entre outros. Neste trabalho, a distribuição dos alelos do gene *DMPK* em indivíduos controles foi estabelecida em duas populações (brasileira e peruana), por meio de PCR convencional utilizando iniciadores fluorescentes e *repeat-primed* PCR. O protocolo confirmou 93 casos não relacionados de DM1 (76 brasileiros e 17 peruanos) após a análise de 224 amostras com suspeita clínica. A distribuição e as frequências dos alelos normais foram estabelecidas em ambas as populações e os alelos mais frequentes foram 5 (frequência = 0,326) e 13 (frequência = 0,545) repetições de CTG em brasileiros e peruanos, respectivamente. A frequência de alelos normais grandes (aqueles com mais de 45 repetições CTGs) foi de 9% e 4% em brasileiros e peruanos, respectivamente. Neste trabalho é descrita a análise molecular de DM1 na maior coorte brasileira até o momento e é o primeiro trabalho em que foi analisada a população peruana. A distribuição e a frequência de alelos normais também foram estabelecidas e alelos mutáveis foram detectados entre os indivíduos controles.

**Palavras-chave:** Distrofia miotônica tipo 1, repetições CTG, gene *DMPK*

## ABSTRACT

The human *DMPK* (Dystrophia Myotonica-Protein Kinase) gene is located at 19q13.3 locus, being organized into 15 exons, with a polymorphic tract of CTG repeats in its 3' untranslated region. Normal individuals have 5-34 CTG repeats. Individuals carrying alleles with more than 50 CTG repeats have myotonic dystrophy type 1 (DM1), a multisystemic disease of autosomal dominant inheritance. Symptoms include myotonia, progressive muscle weakness, hypogonadism, among others. Disease prevalence is variable among populations and may be related to the frequency of large normal alleles (those with more than 18 CTG repeats). Here we determined here the distribution of alleles of *DMPK* gene in healthy and DM1 patients in Brazilian and Peruvian populations, through conventional PCR using fluorescent primers and repeat-primed PCR. This protocol confirmed 93 unrelated cases of DM1 (76 Brazilians and 17 Peruvians) following the analysis of 224 samples with clinical suspicion. Distribution and frequencies of normal alleles were also established in both populations and the most frequent alleles were 5 (frequency of 0.326) and 13 (frequency of 0.545) CTG repeats in Brazilians and Peruvians, respectively. Frequency of large normal alleles (those with more than 45 CTG repeats) was established to be 9% and 4% in Brazilians and Peruvians, respectively. This report describes molecular analysis of DM1 in the largest Brazilian cohort so far, and is the first to report any data in the Peruvian population. Distribution and frequency of normal alleles were also established and mutable alleles were detected among controls.

**Keywords:** Myotonic dystrophy type 1, CTG repeats, *DMPK* gene.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do gene <i>DMPK</i> e proteína DMPK.....	14
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da causa genética de DM1 e a relação o fenótipo.....	21
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática dos principais possíveis mecanismos de patogênese de DM1.....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CELF1	<i>CUGBP, Elav-like family member 1</i>
CIC-1	Canal de cloreto 1
cTnT	Troponina cardíaca T
CUGBP1	<i>CUG Triplet Repeat, RNA Binding Protein 1</i>
DM1	Distrofia miotônica tipo 1
DM2	Distrofia miotônica tipo 2
DMPK	<i>Dystrophia Myotonica-Protein Kinase</i>
DMWD	<i>Dystrophia Myotonica WD repeat-containing</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IR	Receptor de insulina
FMR1	<i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
GSK3B	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
hnRNP	Partículas de ribonucleoproteínas heterogêneas
kb	Quilobases
MBNL	<i>Muscleblind Like Splicing Regulator 1</i>
MRI	Imagem por ressonância magnética
mRNA	RNA mensageiro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PKC	Proteína cinase C
PKR	Proteína cinase dependente de RNA de dupla fita

RAN	<i>Repeat associated non-ATG</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RP-PCR	<i>Repeat-Primed PCR</i>
SIX5	<i>SIX Homeobox 5</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Organização do Genoma Humano

O genoma humano abrange a informação genética da espécie, sendo constituído por  $3,2 \times 10^9$  pb. A grande maioria dessa informação pode ser encontrada no genoma nuclear, o qual é dividido em 46 cromossomos, sendo 22 pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais. O restante dessa informação está contida no genoma mitocondrial. Considerando o genoma nuclear, a informação do genoma humano está organizada em cromossomos, os quais apresentam um conjunto de genes, cada um localizado no seu *locus*, ocorrendo regiões que apresentam um conteúdo elevado de genes e outras um conteúdo mais baixo (Lander *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2010).

Os genes humanos apresentam, em média, um grande número de nucleotídeos, cerca de 27.000 pb, quando comparado a outras espécies. A grande maioria destes pb são segmentos de DNA não-codificante (íntrons), os quais não serão transcritos em mRNA e, posteriormente, traduzidos em proteínas, que se intercalam entre sequências curtas de DNA codificante (éxons), todos associados a regiões reguladoras de DNA (Lander *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2010).

Mais da metade do genoma humano é constituído por sequências repetitivas. Os dois maiores grupos de sequências repetitivas são as repetições em *tandem* (isto é, adjacentes uma à outra) e os elementos intercalados repetitivos. As repetições em *tandem* são compostas por duas ou mais cópias de padrões de nucleotídeos e incluem DNA satélite, microssatélite e sequências de baixa

complexidade. Os elementos intercalados são elementos transponíveis, os quais são divididos em categorias de acordo com o seu mecanismo de transposição e sequência nucleotídica, incluindo os transposons de DNA e os elementos semelhantes a retrovírus (Lander *et al.*, 2001; Margulies *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2010).

## 1.2 Os Microssatélites

Os microssatélites, ou sequências simples repetitivas (SSRs), são sequências de repetição de 2 a 6 pb de DNA as quais são altamente variáveis intrinsecamente e constituem cerca de 1,7% do genoma humano (Rollins *et al.*, 2006). Os microssatélites são considerados uma importante ferramenta na caracterização individual de genomas por serem regiões altamente variáveis. A variabilidade destas regiões gênicas pode ser explicada pela presença das repetições, as quais aumentam a probabilidade de ocorrência de deslize da enzima DNA polimerase durante a replicação de DNA, levando à alteração no número de repetições de pb. Esta variabilidade pode ocorrer uma vez a cada 1.000 gerações, evento mais comum que mutações de ponto (Weber & Wong, 1993).

Embora as repetições em *tandem* possuam pouca complexidade e alta instabilidade genética, diversas funções no genoma humano são atribuídas a este tipo de repetição. Estas funções incluem componentes de isoladores, silenciadores e acentuadores, assim como associação a mecanismos como regulação de *splicing*

alternativo, estabilidade de mRNA e recombinação e reparo de DNA (Bhargava & Fuentes, 2010).

A distribuição genômica dos microssatélites não ocorre aleatoriamente, considerando que a presença dos microssatélites causam alterações na organização da cromatina, na regulação gênica, na replicação e na recombinação de DNA, no ciclo celular e na reparação de DNA. Os microssatélites que se localizam em regiões codificantes e passam por mutações as quais levam à expansão ou à contração das repetições em *tandem* podem causar a perda ou o ganho de função do gene devido a mutação de erro de leitura ou à geração de mRNA mais longo e potencialmente tóxico. As mutações nos microssatélites presentes em íntrons podem afetar a transcrição gênica, o *splicing* de mRNA e o seu envio ao citoplasma. As mutações em microssatélites presentes na região 5' não traduzida podem causar alterações na transcrição e na tradução de genes. Por outro lado, quando elas ocorrem na região 3' não traduzida, podem causar alteração na transcrição ou na formação de mRNA expandido, como exemplo de microssatélite presente nesta região tem-se as repetições da sequência trinucleotídica CTG no gene *DMPK* (Aslanidis *et al.*, 1992; Bhargava & Fuentes, 2010).

### **1.3 O Gene *DMPK***

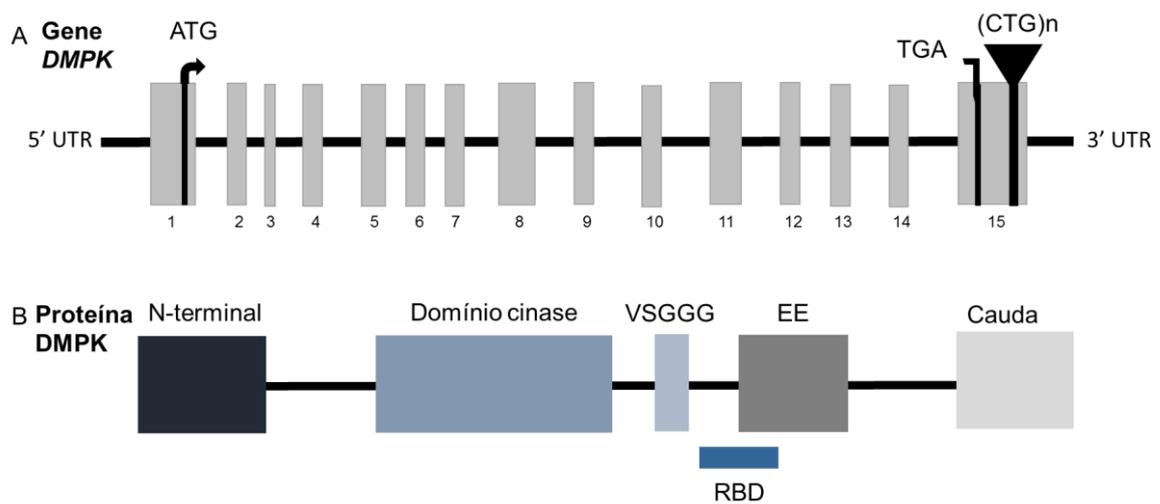
O gene *DMPK* (*Dystrophia Myotonica-Protein Kinase*) humano está localizado no braço longo (q) do cromossomo 19 na posição 13.3 e apresenta

13 kb. O gene está dividido em 15 éxons, os quais codificam uma proteína de 692 aminoácidos (Figura 1A). A transcrição deste gene ocorre na orientação telômero-centrômero e os transcritos gerados neste processo estão sujeitos a um grande processo de *splicing* alternativo. A região promotora do gene contém uma sequência conservada GC que é o ponto de ligação do fator de transcrição Sp1, o qual é específico para a RNA polimerase II com afinidade em regiões GC. Uma das características deste gene é apresentar repetições da sequência trinucleotídica CTG na região 3' não traduzida, no éxon 15 a jusante do códon de parada e aproximadamente 500 pb a montante da cauda poli-A (Aslanidis *et al.*, 1992; Groenen *et al.*, 2000; Wansink *et al.*, 2003).

#### **1.4 A Proteína DMPK**

A proteína codificada pelo gene *DMPK* é uma cinase serina-treonina dependente de AMP-cíclico pertencente à família de proteínas Rho. Os 15 éxons presentes no gene codificam proteínas que variam de tamanho entre 42 a 84 kDa, com mais de sete isoformas tecido-específicas possíveis, as quais são geradas a partir de eventos de *splicing* alternativo. Cada isoforma de DMPK tem especificidade para um substrato e localização celular característica, o que determina funções diferentes. Além do domínio serina-treonina cinase, todas apresentam um domínio N-terminal rico em leucina, constituído por 40 aminoácidos, um domínio  $\alpha$ -hélice, formando uma estrutura espiral enrolada, e um domínio C-terminal. O *splicing* alternativo altera a presença ou ausência do motivo de cinco aminoácidos VSGGG, o qual atua na modulação da atividade

da autofosforilação de DMPK e a natureza da região C-terminal, a qual está relacionada com a especificidade de substratos e a localização intracelular da proteína, podendo estar presente na mitocôndria, retículo endoplasmático ou citoplasma (Figura 1B) (Wansink *et al.*, 2003; Groenen *et al.*, 2000).



**Figura 1. Representação esquemática do gene *DMPK* (A) e proteína *DMPK* (B).** A) Os éxons estão representados por retângulos e os íntrons por linhas. O códon de iniciação e o códon de parada estão sinalizados, assim como a região do trinucleotídeo CTG. B) VSGGG representa o domínio de cinco aminoácidos característico. RBD representa um possível domínio de ligação Rho e EE representa o domínio espiral (Adaptado de Wansink *et al.*, 2003).

A síntese da proteína DMPK ocorre majoritariamente em células do músculo liso, esquelético e cardíaco e, em menor quantidade, em células de diferentes regiões do cérebro, tanto em células neuronais como em células gliais. Não foi detectada presença de DMPK nos ovários, no pâncreas e nos rins

(Jansen *et al.*, 1992; van der Ven *et al.*, 1993; O'Coirlain *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2004).

A função de DMPK não está completamente elucidada. A proteína tem sido associada com a miogênese e a homeostase celular. A DMPK tem preferência por substratos com resíduos de arginina a montante do sítio aceptor, seguido de um resíduo hidrofóbico e outro resíduo de arginina (Bush *et al.*, 2000). A proteína DMPK atua fosforilando o domínio C-terminal de miosina-fosfatase (MYPT1) (Muranyi *et al.*, 2001). Em relação à homeostase celular, a qual é influenciada pela regulação da permeabilidade da membrana a cátions e ânions, a DMPK tem como substratos, por exemplo, o receptor de di-hidropiridina (DHPR), o qual é um canal de cálcio presente, principalmente, em células do músculo esquelético, onde atua na liberação de cálcio no processo de excitação e contração muscular, e a proteína fosfolema, uma proteína reguladora da atividade da NaK-ATPase (Benders *et al.*, 1997; Mounsey *et al.*, 2000).

### **1.5 As Doenças de Expansão de Repetições Trinucleotídicas**

As mutações causadas por expansões trinucleotídicas pertencem à classe das mutações dinâmicas. Este tipo de mutação caracteriza-se pelo aumento do número de unidade repetitivas de nucleotídeos presentes em determinados genes. Estas repetições podem ocorrer em genes diferentes e codificar aminoácidos diferentes, e podem se localizar tanto em regiões codificadoras como em íntrons ou em regiões não traduzidas. A instabilidade do tamanho das unidades repetitivas

poderá levar à expansão gradual e, assim, os efeitos destas expansões podem causar diferentes doenças (Kim & Mirkin, 2013).

A descoberta das doenças causadas pela expansão de repetições trinucleotídicas iniciou com a identificação da causa da Síndrome do X-frágil em 1991, onde repetições CGG na região 5' não traduzida do gene FMR1 (*Fragile X Mental Retardation 1*) encontram-se expandidas. No mesmo ano, associou-se uma repetição CAG expandida na região codificadora do gene do receptor de andrógeno à pacientes com doença de Kennedy. Nos anos seguintes, houve a identificação de diversas doenças, como Distrofia Miotônica de Steinert, doença de Huntington e ataxia de Friedreich. Atualmente, a expansão de repetições trinucleotídicas está associada a pelo menos 22 doenças neurológicas (La Spada *et al.*, 1991, Verkerk *et al.*, 1991; La Spada & Taylor, 2010).

As doenças causadas por expansão de repetições trinucleotídicas podem ser divididas em duas categorias de acordo com o local da repetição no gene: doenças que envolvem repetições em regiões não codificantes e doenças que envolvem repetições inseridas em regiões codificantes. A localização da repetição no gene irá influenciar o mecanismo causador da doença, o qual pode ser: (1) perda de função do gene onde a repetição se localiza; (2) ganho de função devido à formação de proteína contendo a expansão (como, por exemplo, poliglutamina ou polialanina); e (3) ganho de função devido à formação de mRNA contendo a expansão. Convém salientar que mecanismos moleculares mais complexos estão envolvidos na patogênese destas doenças como modificações pós-traducionais, autofagia, transcrição bidirecional e modificações na estrutura da cromatina (La Spada & Taylor, 2010).

## 1.6 A Distrofia Miotônica Tipo 1

A distrofia miotônica de Steinert ou distrofia miotônica tipo 1 (DM1) foi descrita pela primeira vez em 1909, por Hans Gustav Wilhelm Steinert, o qual identificou a doença como sendo uma atrofia que atingia grupos musculares específicos em indivíduos com miotonia, dando origem ao nome distrofia miotônica (Wagner & Steinberg, 2008). Em 1912, ocorrência de catarata foi associada a indivíduos com DM1. Em 1936, Hans Curschmann associou o acometimento de outros órgãos a doença, classificando-a como uma doença multissistêmica (Schara & Schoser, 2006).

DM1 é uma miopatia de herança autossômica dominante, caracterizada principalmente pelo fenômeno miotônico, isto é, dificuldade de relaxamento muscular após contração. Indivíduos afetados também apresentam outros sintomas, como distrofia muscular, catarata, hipogonadismo e alterações eletrocardiográficas. A DM1 é distrofia muscular mais comum em adultos e se distingue das demais distrofias musculares por apresentar, predominantemente, sintomas que afetam os músculos da face, pescoço, dos membros distais, além de afetar outros sistemas, e pela presença do fenômeno miotônico (Harper & Johnson, 2014).

A prevalência mundial de DM1 é de 1 por 20.000 habitantes, variando de 1 por 100.000 em populações do Japão e 1 por 10.000 em populações da Islândia. A razão pela qual se observa tanta variabilidade é desconhecida (Theadom *et al.*, 2014). A prevalência é maior em regiões como Quebec (Canada), possivelmente devido a um efeito causador (Turner & Hilton-Jones, 2014; Yotova *et al.*, 2005).

### **1.6.1. Manifestações Clínicas de DM1**

As manifestações clínicas de DM1 são variáveis, sendo possível a identificação de quatro formas fenotípicas: congênita, início na infância, início em fase adulta e início tardio/assintomático (Meola & Cardani, 2014). Entre as diferentes categorias, a DM1 congênita apresenta um fenótipo clínico distinto. É considerada a forma mais grave e possui uma taxa de mortalidade de até 25%. Os pacientes com este tipo de distrofia geralmente apresentam, antes do nascimento, aumento no líquido amniótico e movimentos fetais reduzidos. Após o nascimento, os pacientes apresentam fraqueza generalizada grave, hipotonia e complicações respiratórias. Devido à fraqueza muscular grave, estes indivíduos apresentam o lábio superior em forma de “peixe”, isto é, com a forma de “V” invertido (Meola & Cardani, 2014). O retardo mental está presente em cerca de metade dos pacientes com este tipo de distrofia miotônica, alguns devido a atrofia cerebral e outros causado por dilatação ventricular (Kinter & Sinnreich, 2014).

Os indivíduos que apresentam as manifestações da DM1 na infância geralmente apresentam deficiência cognitiva, problemas no aprendizado e dificuldades na fala. Frequentemente ocorre dificuldade no diagnóstico desta forma devido à falta de sintomas característicos das distrofias musculares (Meola & Cardani, 2014).

A forma da doença com início na idade adulta é a mais frequente, com a manifestação dos sintomas ocorrendo geralmente entre 30 e 40 anos. O sintoma

mais característico é a presença da miotonia, ocorrendo mais comumente nas mãos, mas podendo atingir músculos orofaríngeos, o qual leva a sintomas como disfagia e disartria. A fraqueza muscular ocorre principalmente em músculos da face e em músculos distais, geralmente com progressão lenta. Podem ocorrer complicações respiratórias, caso os músculos respiratórios sejam acometidos por miotonia e miopatia, e complicações cardíacas, como anormalidades na condução intraventricular e atrioventricular. Os pacientes também apresentam catarata bilateral, problemas endócrinos que podem se manifestar como a atrofia testicular ou a hipotestosteronemia em homens, dismenorreia, menopausa precoce e abortos espontâneos e resistência à insulina. Pode ocorrer acometimento do sistema nervoso central levando a problemas cognitivos como apatia, embora seja mais frequente a presença destes sintomas nas formas mais severas da doença (Schara & Schoser, 2006; Turner & Hilton-Jones, 2014).

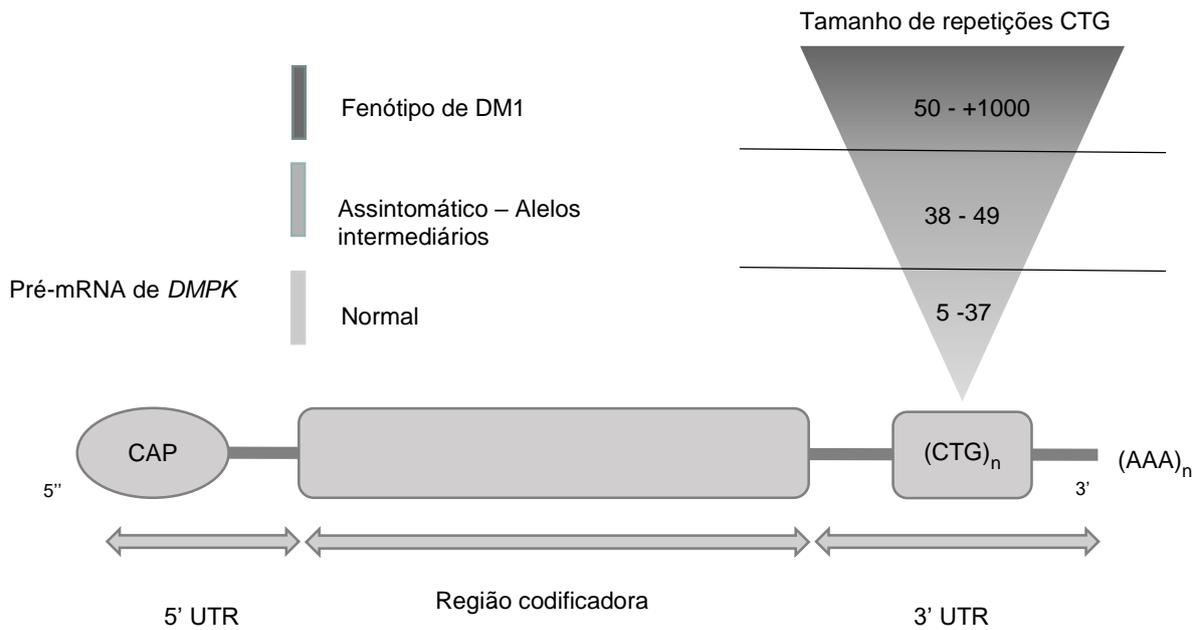
Em relação à forma de DM1 com início tardio, os sintomas limitam-se ao aparecimento de catarata bilateral e calvície em homens. Os músculos são pouco atingidos nesta forma da doença, porém podem ocorrer problemas cardíacos (Schara & Schoser, 2006).

A causa mais comum de morte em pacientes com DM1 é devido a insuficiência respiratória em razão do comprometimento do diafragma e dos músculos intercostal e orofaríngeal. O comprometimento cardíaco, como arritmia ventricular e bloqueio cardíaco, é a segunda maior causa de morte entre estes pacientes (Kinter & Sinnreich, 2014).

### 1.6.2 A Genética Molecular da DM1

A identificação da causa genética de DM1 iniciou em 1991, quando houve a identificação de fragmentos de restrição específicos em pacientes de DM1, os quais apresentaram fragmentos maiores do que os de indivíduos normais e de tamanho variável entre si (Harley *et al.*, 1991). Posteriormente, utilizando os marcadores ERCC1 proximal e D19S51 distal, a sequência do gene foi isolada no cromossomo 19 e, posteriormente, clonada. A causa genética de DM1 foi identificada por meio de clonagem posicional como sendo a expansão de repetições CTG em uma região 3' não traduzida do gene *DMPK* (Aslanidis *et al.*, 1992; Brook *et al.*, 1992; Buxton *et al.*, 1992).

Após a identificação dessa região variável do gene *DMPK*, foi verificado que indivíduos saudáveis apresentam de 5 a 34 repetições CTG nesta região, enquanto que mais de 50 repetições estão presentes em pacientes com DM1. Indivíduos com alelos intermediários (entre 35 e 49 repetições) não apresentam sintomas, porém possuem maiores chances de gerar filhos com um número aumentado de repetições devido ao fenômeno chamado de antecipação genética (Figura 2) (Pettersson *et al.*, 2015).



**Figura 2. Representação esquemática da causa genética de DM1 e a relação com o fenótipo.** (Adaptado de Turner & Hilton-Jones, 2014).

O tamanho das expansões pode ser considerado um preditivo de idade de início da doença e gravidade clínica. (Harper & Johnson, 2014; Turner & Hilton-Jones, 2014). O processo de antecipação foi proposto pela primeira vez em 1918 baseado em estudos que indicavam uma piora na gravidade dos sintomas e idade de início mais precoce da doença em gerações subsequentes. A comprovação deste mecanismo ocorreu em 1948, quando diversas doenças genéticas foram estudadas e o processo de antecipação foi mais evidente em DM1 (Penrose, 1948). Embora menos comum, o processo de contração, onde o tamanho da expansão diminui ao passar de geração, também pode ocorrer (Pratte *et al.*, 2015).

Na DM1, a maioria dos alelos expandidos é herdada de forma materna, embora herança paterna não possa ser excluída. Este é um padrão diferente do

que ocorre na doença de Huntington, a qual, assim como DM1, é uma doença de expansão de repetições trinucleotídicas. A forma congênita de DM1, onde os pacientes apresentam um número elevado de repetições nucleotídicas, é, na grande maioria, herdada de forma materna, gerando a hipótese de que as grandes expansões nucleotídicas são tóxicas ou levam à seleção negativa dos espermatozoides (Turner & Hilton-Jones, 2014).

Um mesmo indivíduo pode apresentar diferentes tamanhos da expansão CTG em células do mesmo tecido ou de tecidos diferentes (Wong *et al.*, 1995). Pacientes com início tardio do aparecimento das manifestações clínicas, além de um número menor de repetições nucleotídicas, tendem a apresentar uma maior heterogeneidade destas repetições entre as células, enquanto os pacientes com acometimento precoce dos sintomas, além de um número maior de repetições CTG, apresentam um padrão mais homogêneo. O mosaïcismo somático pode ser observado principalmente em tecidos relacionados com a patologia de DM1. Expansões de 2 a 13 vezes maiores podem ser encontradas no músculo esquelético e no coração em relação ao tamanho da expansão presente no sangue periférico no mesmo indivíduo (Jansen *et al.*, 1994; Monckton *et al.*, 1995).

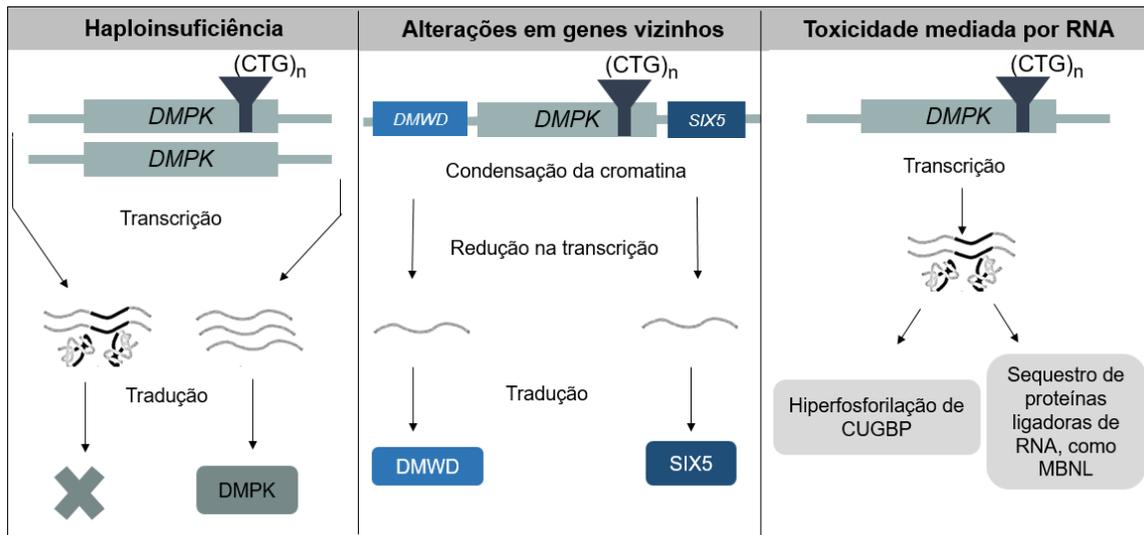
A identificação de padrões CCG e CTC (interrupções) entre as repetições CTG pode acarretar instabilidade no tamanho de repetições entre as gerações. A presença destas interrupções pode tornar a mutação mais estável, ocasionando até mesmo a contração do número de repetições entre as gerações. Pacientes com interrupções de diferentes padrões, embora apresentem o fenótipo semelhante ao fenótipo clássico da doença, não

apresentam distrofia muscular, e o aparecimento dos sintomas é mais tardio que o esperado, baseado no número de repetições CTG (Musova *et al.*, 2009).

A DM1 pode afetar a aptidão reprodutiva dos pacientes, principalmente devido a sintomas como alterações hormonais. Sendo assim, permanece a questão da forma como a doença é mantida na população ao longo das gerações, considerando que os indivíduos afetados podem apresentar dificuldade de reprodução. Por outro lado, indivíduos saudáveis que apresentam alelos com mais de 19 repetições CTG tendem a gerar filhos com alelos expandidos, sendo considerados reservatórios de possíveis mutações novas na população (Imbert *et al.*, 1993). O tamanho das repetições CTG no gene *DMPK* apresenta uma distribuição tri-modal. São observados alelos com 5 repetições, alelos com 9 a 18 repetições e alelos com mais de 18 repetições. Os dois primeiros grupos são herdados de forma estável, enquanto os alelos com mais de 18 repetições CTG são mais instáveis e potencialmente expandidos em gerações posteriores (Imbert *et al.*, 1993).

### **1.6.3 Mecanismos de Patogênese da DM1**

Diferentes hipóteses justificam o efeito gerado pela expansão CTG no gene *DMPK* (Figura 3). Entre estas hipóteses, podemos citar a haploinsuficiência, as alterações em genes vizinhos e a toxicidade mediada por RNA.



**Figura 3. Representação esquemática dos principais possíveis mecanismos de patogênese de DM1.** (Adaptado de Mateos-Aierdi *et al.*, 2015).

A hipótese da haploinsuficiência é decorrente do fato que indivíduos afetados pela doença apresentam apenas uma cópia funcional do gene em questão, uma vez que a outra cópia está comprometida com as repetições patogênicas que levam à formação de *foci* nucleares, reduzindo assim a quantidade de proteína sintetizada do gene afetado. Além disto, pacientes com DM1 apresentam diminuição de transcritos e de proteínas *DMPK* e esta diminuição é inversamente correlacionada ao tamanho da repetição *CTG* (Fu *et al.*, 1993).

A função da proteína *DMPK* não está completamente elucidada. Esta cinase é encontrada na membrana celular onde interage com proteínas lâmina A e lâmina C, as quais são proteínas estruturais componentes do envelope nuclear, especificamente na lâmina nuclear. Em conjunto com outras proteínas, estas atuam regulando a passagem de moléculas para o núcleo e também para o citoplasma e membrana celular durante a divisão celular e diferenciação de cardiomiócitos. A redução da expressão da proteína miogenina e erros na diferenciação de

mioblastos foi observada em animais nocaute para *DMPK* (Harmon *et al.*, 2008). Porém, ratos nocautes para *DMPK* não reproduzem o fenótipo de DM1, desenvolvendo apenas miopatia tardia (Berul *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 1996), sugerindo que a patogênese de DM1 não pode ser inteiramente explicada por haploinsuficiência do gene.

Alterações na estrutura da cromatina geradas devido à presença de repetições em *tandem* são outra possível explicação para a patogênese de DM1. Os nucleossomos localizam-se geralmente em regiões genômicas altamente repetitivas e levam à condensação da cromatina, o que pode ocasionar alterações na transcrição de genes vizinhos. A expressão diminuída de genes flanqueadores pode contribuir para a patogênese da doença. No caso de *DMPK*, o gene localizado a jusante, *SIX5*, o qual codifica um fator de transcrição, tem expressão reduzida em pacientes com DM1 (Westerlaken *et al.*, 2003). Enquanto o gene localizado a montante, *DMWD*, tem redução de expressão a nível citosólico, porém seus níveis nucleares permanecem os mesmos (Frisch *et al.*, 2001). Ratos nocaute para *SIX5* apresentaram catarata, redução na fertilidade e alteração da função cardíaca. Porém, não foi identificado inteiramente o fenótipo multissistêmico apresentado em DM1 (Klesert *et al.*, 2000; Wakimoto *et al.*, 2002; Sarkar *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2004).

Entre as hipóteses propostas com o intuito de explicar a patogênese desta doença, há também a possibilidade do ganho de função do RNA. A transcrição de RNA anormais parece ser necessária e suficiente para levar ao desenvolvimento da doença (Lee & Cooper, 2009; Udd & Krahe, 2012). A perda de função do gene *DMPK* e de genes ao redor dele não são capazes de

reproduzir completamente as características da doença (Jansen *et al.*, 1996) e repetições CTG transcritas em CUG acumulam-se em *foci* nuclear (Davis *et al.*, 1997).

RNAs mutados, ou seja, com repetições CUG expandidas, formam estruturas de dupla-fita que causam a agregação do mRNA, o qual fica aprisionado no núcleo celular formando *foci* de RNA possivelmente tóxico. Os *foci* de RNA levam a desregulação de diversos fatores de ligação ao RNA (como fatores de transcrição e fatores de *splicing* alternativo). Como por exemplo, MBNL (proteínas *muscleblind-like*), CUGBP1, hnRNP e proteínas *Staufen* (Bondy-Chorney *et al.*, 2016; Pettersson *et al.*, 2015). O aumento na expressão de CUGBP1/*Elav-like Family member 1* (CELF1) e a redução na atividade de MBNL pode ser observada nesta situação. A atividade de MBNL diminui porque a proteína é sequestrada em *foci* ribonucleares. Enquanto que a atividade de CELF1 é aumentada devido a hiperfosforilação por meio de diferentes vias de sinalização, que incluem as proteínas-quinase C (PKC), ciclina D3, glicogênio sintase cinase-3-beta (GSK3B) e proteína-quinase dependente de RNA de dupla fita (PKR). A desregulação de ambas proteínas levam a expressões gênicas anormais que são seus alvos, podendo ocasionar a patogênese de DM1 (Udd & Krahe, 2012).

A desregulação do *splicing* alternativo apresenta relação direta com os sintomas apresentados pelos indivíduos como, por exemplo, a miotonia observada em pacientes explicada pelo *splicing* anormal de CIC-1 (canal de cloreto 1) específico de músculo esquelético. Neste caso, ocorre a inclusão de éxons que contém códons de parada prematuros, gerando uma proteína truncada, a qual acarreta a produção diminuída de mRNA e da proteína codificada por este gene.

Também se observa *splicing* anormal do éxon 11 do receptor de insulina (IR), o *splicing* deste éxon pode gerar duas isoformas: IR-A, a qual não possui o éxon 11 e IR-B, a qual possui o éxon 11. A expressão das duas isoformas é regulada no organismo de acordo com o tecido, o gene IR-B é mais expresso em tecidos responsáveis por homeostase da glicose como fígado, tecidos adiposos e músculo esquelético, enquanto IR-A é menos expressa nestes tecidos. IR-A possui uma menor capacidade de sinalização celular. O *splicing* anormal de IR pode gerar uma maior presença de IR-A, o qual relaciona-se com uma baixa eficiência de sinalização, o qual pode estar relacionado com a resistência à insulina em pacientes (Savkur *et al.*, 2001).

Os defeitos cardíacos podem ser relacionados com a desregulação do *splicing* em cTNT (troponina cardíaca T). A regulação da contração de músculos estriados é feita pela ligação de cálcio ao complexo troponina (troponina T, I e C) e a interação das proteínas actina e miosina. A troponina cardíaca T é sintetizada em tecidos embrionários esqueléticos, tecidos embrionários musculares cardíacos e tecidos musculares cardíacos de adultos. Na fase embrionária, o *splicing* alternativo atua incluindo o éxon 5 no mRNA. Porém, na fase adulta, este éxon é excluído. Quando ocorre a desregulação do *splicing* alternativo, o éxon 5 é mantido na fase adulta, e sabe-se que as duas isoformas possuem diferentes sensibilidades ao cálcio. Assim, esta desregulação pode afetar a contração em músculos maduros e pode estar relacionada com as anormalidades cardíacas observadas em pacientes de DM1 (Lee & Cooper, 2009).

A tradução do tipo RAN (*Repeat Associated Non-ATG* ou *RAN translation*) pode ocorrer em distrofia miotônica, isto é, é possível a tradução de sequências de

nucleotídeos sem seguir as regras convencionais de tradução (pelo uso do códon de iniciação), gerando proteínas inesperadas (Cleary & Ranum, 2013; Udd & Krahe, 2012). A tradução RAN leva à expressão de proteínas homopoliméricas como, por exemplo, polileucina, polialanina e poliserina, por meio de diferentes fases de leitura. Um número maior de repetições gera uma ocorrência maior deste tipo de tradução. Em DM1, foi observado a presença de poli-glutamina gerada a partir de um transcrito anti-senso contendo a repetição CAG. A tradução RAN foi detectada em mioblastos, músculo esquelético e leucócitos de tecidos humanos, enquanto em ratos modelos (com 55 repetições CTG) foi observado em cardiomiócitos e leucócitos (Zu *et al.*, 2010). Porém, a contribuição destes polipeptídeos gerados pela tradução RAN para a patogênese de DM permanece desconhecida (Udd & Krahe, 2012).

#### **1.6.4 Diagnóstico e Terapia da DM1**

O diagnóstico molecular de DM1 é realizado pela determinação do número de repetições CTG nos alelos do gene *DMPK*. Os alelos normais podem ser identificados por meio de PCR convencional, com a limitação de amplificação de fragmentos pequenos de nucleotídeos apenas. Alelos com uma expansão do trinucleotídeo CTG podem ser identificados por *Southern Blot*, uma metodologia trabalhosa e demorada com pouca aplicabilidade como técnica de diagnóstico. Há alguns anos, a metodologia denominada RP-PCR (*Repeat-Primed PCR*) foi desenvolvida para casos semelhantes a este, a qual

apresenta a vantagem de ser mais rápida que a técnica de *Southern Blot* (Singh *et al.*, 2014).

A terapia para distrofias miotônicas é a monitoração de complicações associadas à doença. Os sintomas cardiorrespiratórios são responsáveis por 70% da mortalidade em DM1. Sendo assim, estes sintomas são prioridade para cuidados médicos (Meola & Cardani, 2014).

Por ser uma doença relacionada com a desregulação do *splicing*, diversas potenciais terapias vem sendo foco de estudo. Além disto, os efeitos nos músculos não são muito severos na fase inicial da doença e se apresentam de forma progressiva, sugerindo a possibilidade da recuperação deste tecido por meio de terapia (Kinter & Sinnreich, 2014). Um dos possíveis alvos são os grampos de expansão de CUG que atuam no sequestro de proteínas. Como exemplo, podemos citar a utilização de terapia com oligonucleotídeos de DNA anti-senso. A ação clássica dos oligonucleotídeos anti-senso é o silenciamento pós-transcrição por intermédio da enzima RNase H1, a qual cliva a fita de RNA quando o RNA está associado a oligonucleotídeos de DNA anti-senso. Embora exista dificuldade de realização de testes em humanos, os testes em animais modelos como ratos mostraram resultados satisfatórios. Nestes animais modelos, a administração de oligonucleotídeos de DNA anti-senso foi capaz de levar ao nocaute das repetições CUG expandidas em células do músculo esquelético, gerando melhoras na fisiologia, na histopatologia e em características do transcriptoma (Carrel *et al.*, 2016; Turner & Hilton-Jones, 2014). Estratégias como RNA de interferência e riboenzimas também vem sendo estudadas (Kinter & Sinnreich, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição alélica de repetições CTG no gene *DMPK* em pacientes com suspeita clínica de distrofia miotônica tipo 1 e em indivíduos saudáveis nas populações brasileira e peruana.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar o alelo mutante no gene *DMPK* em indivíduos brasileiros e peruanos com suspeita clínica de DM1;
- b) Avaliar o tamanho das repetições CTG no gene *DMPK* em indivíduos sem suspeita clínica de DM1 (controles) de origem brasileira e peruana;
- c) Calcular a frequência de cada um dos alelos dentro da faixa de normalidade nas duas populações;
- d) Comparar a distribuição alélica de repetições CTG do gene *DMPK* entre as duas populações e com os dados da literatura.

### **3. CAPITULO I**

Os resultados serão apresentados a seguir sob a forma de manuscrito, o qual será submetido à publicação no periódico *Journal of Human Genetics*.

## **Distribution of allelic frequencies of CTG repeats at *DMPK* gene in myotonic dystrophy type 1 patients and healthy individuals from Brazil and Peru**

Luiza Paulsen Rodrigues<sup>1,2,3</sup>; Marcia Polese-Bonato<sup>1,2,4</sup>; Gabriel Vasata Furtado<sup>1,2,5</sup>; Mario Cornejo-Olivas<sup>6</sup>; Pilar Mazzetti-Soler<sup>6</sup>; Jonas Alex Morales Saute<sup>1,2</sup>; Laura Bannach Jardim<sup>1,2,7</sup>; Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,2,3,4,5,8</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Centro de Investigación en Neurogenética, Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas – Lima, Peru;

<sup>7</sup>Departamento de Medicina Interna, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>8</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding Author: Maria Luiza Saraiva-Pereira

Electronic address: mlpereira@hcpa.edu.br

## Abstract

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a neuromuscular disease inherited as an autosomal recessive trait, caused by CTG expansion in the 3' untranslated region of the *DMPK* gene. Normal alleles present 5-34 CTG repeats, while full penetrant alleles present more than 50 CTG repeats. Disease prevalence is highly variable, and there is a correlation between frequency of large size normal alleles and prevalence of the disorder within a specific population. We determined here the distribution of alleles of *DMPK* gene in healthy and DM1 patients in Brazilian and Peruvian populations, through conventional PCR using fluorescent primers and repeat-primed PCR. This protocol confirmed 93 unrelated cases of DM1 (76 Brazilians and 17 Peruvians) following the analysis of 224 samples with clinical suspicion. Distribution and frequencies of normal alleles were also established in both populations and the most frequent alleles were 5 and 13 CTG repeats in Brazilians and Peruvians, respectively. This report describes the molecular analysis of DM1 in the largest Brazilian cohort so far. Distribution and frequency of normal alleles were also established and mutable alleles were detected among controls. We have also reported the distribution of normal alleles in a Peruvian control population, and confirmed new cases of DM1 patients in Peru.

## Introduction

Myotonic Dystrophy (DM1) is a multisystem disorder mainly characterized by muscle atrophy, weakness, and myotonia, although clinical manifestations may be variable<sup>1</sup>. A continuous spectrum of symptoms from mild to severe is observed and three major phenotypes are generally found in DM1 patients. In mild cases, cataracts and mild myotonia is a common presentation. In the classical form of the disease, symptoms include myotonia, cardiac conduction defects, cataracts, and progressive skeletal muscle loss, while in the congenital form there is cognitive impairment as well as behavior disturbances<sup>2</sup>.

DM1 is inherited as an autosomal dominant trait, being the most common form of adult muscular dystrophy. However, prevalence of the disease is highly variable between populations, reaching 1:100,000 in the Japanese population and 1:10,000 in Iceland<sup>3</sup>. In some specific areas, such as Quebec, the prevalence increases to 1:500, probably due to founder effects<sup>4</sup>.

The biological cause of DM1 is an expansion of a CTG repeat in the 3' untranslated region of the dystrophy myotonic protein kinase (*DMPK*) gene, which maps to *locus* 19q13.3. This CTG repeat is polymorphic in the general population, ranging from 5-34, while alleles of DM1 patients present more than 50 CTG repeats. Intermediate alleles, that are also called mutable normal alleles, range from 35-50 CTG repeats and are usually found in healthy individuals, but this stretch is genetically unstable, therefore prone to be expanded in the next generation. The expanded allele length is associated to age of onset and severity of the disease<sup>1,5</sup>. Few studies addressing laboratorial issues were previously performed in the Brazilian population<sup>6-8</sup>. In one of those, distribution of normal alleles was established using healthy individuals from the Rio de Janeiro state only. Therefore, considering the high degree of admixture in Brazil, those frequencies should be applied with care in other regions or additional studies have to be done to established regional frequencies.

Molecular diagnosis of DM1 is highly relevant for those cases with clinically uncertain symptoms, and may be a prediction of case severity. Mutation analysis was first established using Southern Blot analysis in order to detect the mutant allele. Following the development of repeat-primed PCR (RP-PCR)<sup>9</sup>, an alternative method used in the identification of long nucleotide repeats, this protocol was also introduced to the *DMPK* gene in different laboratories.

Distribution of CTG repeat alleles in the Brazilian population might be variable due to ethnic variability, which is the outcome of a unique admixture as previously reported<sup>10</sup>. An allelic distribution was previously established in a sample population from Rio de Janeiro city<sup>8</sup>, which can be used as a reference locally but it might not be representative of other regions from Brazil.

Therefore, a more comprehensive study including samples from different regions in Brazil is still required. Higher frequencies of longer alleles have been reported to be associated to new cases of DM1, i.e., estimation of frequency of these alleles can be used as an estimator of DM1 prevalence in some populations<sup>11,12</sup>. The aim of the present study was to identify CTG repeat length in the *DMPK* gene of Brazilian and Peruvian patients with clinical suspicion of DM1 as well as in healthy individuals from same populations, in order to determine allelic distribution and to confirm clinical suspicion of DM1.

## Material and Methods

### Patients and samples

We have included a total of 224 individuals with clinical suspicion of DM1, being 198 Brazilians and 26 Peruvians. The great majority of Brazilian cases (156) were seen in the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), while the remaining 42 Brazilian cases as well as all 26 Peruvian cases had their biological material (blood or DNA) sent to our laboratory through a research project called “Rede Neurogenética”. Furthermore, 621 samples from individuals that do not have clinical suspicion of DM1, originally from biorepositories, were also included in this study (523 Brazilians and 98 Peruvians) to be used for evaluating distribution of normal alleles; those samples will be referred as controls throughout this work. This study is part of a more comprehensive project, which was approved by the Ethics Committee of Clinical Hospital of Porto Alegre (#07-259).

Genomic DNA was isolated from an aliquot of blood by standard procedures. DNA concentration was estimated and samples were diluted to 50 ng/uL and maintained at -20 °C until further analyzes.

### Identification of CTG repeats in the *DMPK* gene by PCR analysis

Amplification of fragment of interest was carried out using a pair of primers flanking the CTG tract region of *DMPK* gene, being one of them fluorescently labeled. Different amounts of reagents as well as amplification parameters were tested and final protocol for optimal amplification is described below.

Reaction was carried out in a total volume of 25 uL, using 100 ng of genomic DNA, with 400 pmol/L dNTPs, 2.3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.8 pmol/L DMSO, 1 U of AmpliTaqGold in 1X AmpliTaqGold buffer in the presence of 0.8 pmol of primers DMF (5' NED-AACGGGGCTCGAAGGGTCCTTG 3') and DMR (5' GGCCTCAGCCTGGCCGAAAG 3'). PCR cycling parameters were as follows: initial denaturation step of 10 minutes at 95 °C, followed by five cycles at 94°C for 30

seconds and 72 °C for 3 minutes, five cycles at 94 °C for 30 seconds and 70 °C for 3 minutes, five cycle of 94 °C for 30 seconds, 68 °C for 1 minute and 72 °C for 2 minutes, twenty cycles at 94 °C for 30 seconds, 61 °C for 1 minute and 72 °C for 3 minutes and final extension of 15 minutes at 72 °C.

### **Capillary electrophoresis for resolving PCR products**

After amplification, an aliquot (0.5 µL) of PCR products were mixed with 9.35 µL of formamide (HiDye formamide, Applied Biosystems) and 0.15 µL GeneScan™ 500 LIZ (Applied Biosystems). Denaturation was carried out for 5 minutes at 95 °C, and samples were left on ice for 5 minutes before injection. Fragments were resolved by capillary electrophoresis that was performed at 3 kV during 40 minutes at 60 °C, after sample injection during 22 seconds, using POP7 polymer (Applied Biosystems) in an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Amplicon lengths were estimated using GeneMapper® software (version 3.2, Applied Biosystems), using internal size standard as a reference, and additional control samples.

### **Repeat-primed PCR (RP-PCR) analysis**

For RP-PCR, different conditions were also tested aiming amplification of longer alleles; i.e., alleles carrying a expanded CTG tract (mutant allele). Primers applied at this step follows parameters previously described for *DMPK* gene<sup>8</sup>.

Reaction was carried out in a total volume of 25 uL, using 100 ng of genomic DNA, with 200 pmol/L dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mol/L DMSO, 2 U of AmpliTaqGold in 1X AmpliTaqGold buffer in the presence of 0.04 pmol of primer DMTPR1 (5' TACGCATCCCAGTTTGAGACGAGCAGCAGCAGCA 3'), and 0,4 pmol of primers DM1 (5' 6-FAM-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG 3') and TPR2 (5' TACGCATCCCAGTTTGAGACG 3'). PCR cycling parameters were as follows: initial denaturation for 10 minutes at 94 °C, 30 cycles of 94 °C for 1 minute, 60 °C for 1 minute and 72 °C for 2 minutes, and a final extension cycle for 10 minutes at 72 °C.

After amplification, fragments were also resolved by capillary electrophoresis as described above, taking into account slight differences in data interpretation.

### **Statistical analysis**

Allelic and genotypic frequencies were determined by direct counting. Chi-square test ( $\chi^2$ ) was used to compare alleles and genotypic frequencies between different groups of samples within SPSS v.18. The null hypothesis was rejected at  $p < 0.05$ .

## Results

Both laboratorial analyses, PCR using one fluorescent primer for amplifying normal size alleles as well as RP-PCR aiming the amplification of expanded alleles, were successfully introduced in our laboratory setting. In this current study, two distinct groups were submitted to our laboratory scheme: a group of anonymous healthy individuals and a group of individuals with clinical suspicion of DM1. In both cases, individuals belong to two different geographical regions: from Brazil, mainly represented by individuals from Rio Grande do Sul state, and from Peru.

Figure 1 shows different profiles obtaining from genotyping of CTG repeats in the *DMPK* gene.

Through those analyses, we have confirmed 129 cases carrying a mutant allele by molecular analysis among 224 individuals included in this study (Figure 2). Amidst these, 93 were unrelated cases, and the remaining analyses will focus on those families.

Considering just confirmed, unrelated cases of DM1, gender distribution was 43.1% (40/93) females and 56.9% (53/93) males. The great majority of cases carry a long expanded allele that was just detected by RP-PCR, exception being 2 cases whose expanded alleles were 71 and 76 CTG repeats long which were already seen in the conventional PCR and confirmed by RP-PCR.

Although we have not performed an extended clinical evaluation, in general terms we were able to identify common clinical features in approximately half of cases. More common symptoms were muscular weakness (45%), myotonia (43%), dysphagia (40%), dysarthria (40%), abnormal motor and sensorial conduction (40%), and amyotrophy (33%); all of those are characteristic symptoms present in patients with the disease. Age of onset (AO) of the disease was not available from all patients and we were able to obtain this data from 52% (48/93). Distribution of AO can be seen below (Table 1).

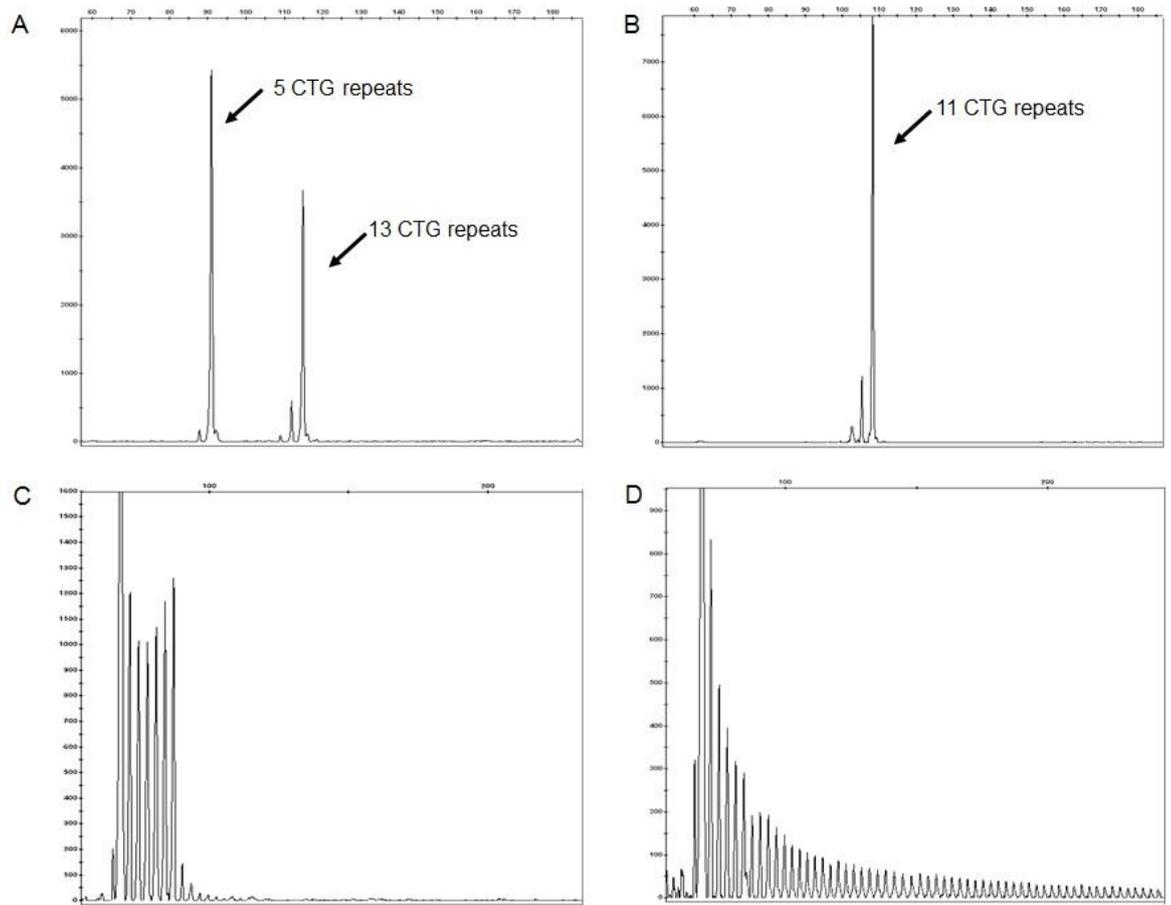


Figure 1. Genotyping of CTG repeats at the DMPK gene. Top panels show analysis of CTG repeats by conventional PCR using a fluorescent primer showing in (A) a sample with alleles of different lengths (5 and 13 CTG repeats) and in (B) a sample with just one allele (11 CTG repeats). Bottom panels show analysis of CTG repeats by RP-PCR and profile in (C) demonstrates presence of alleles of length within the normal range, while profile shown in (D) is from a sample carry one expanded allele. X-axis indicates product length and Y-axis denotes signal intensity.

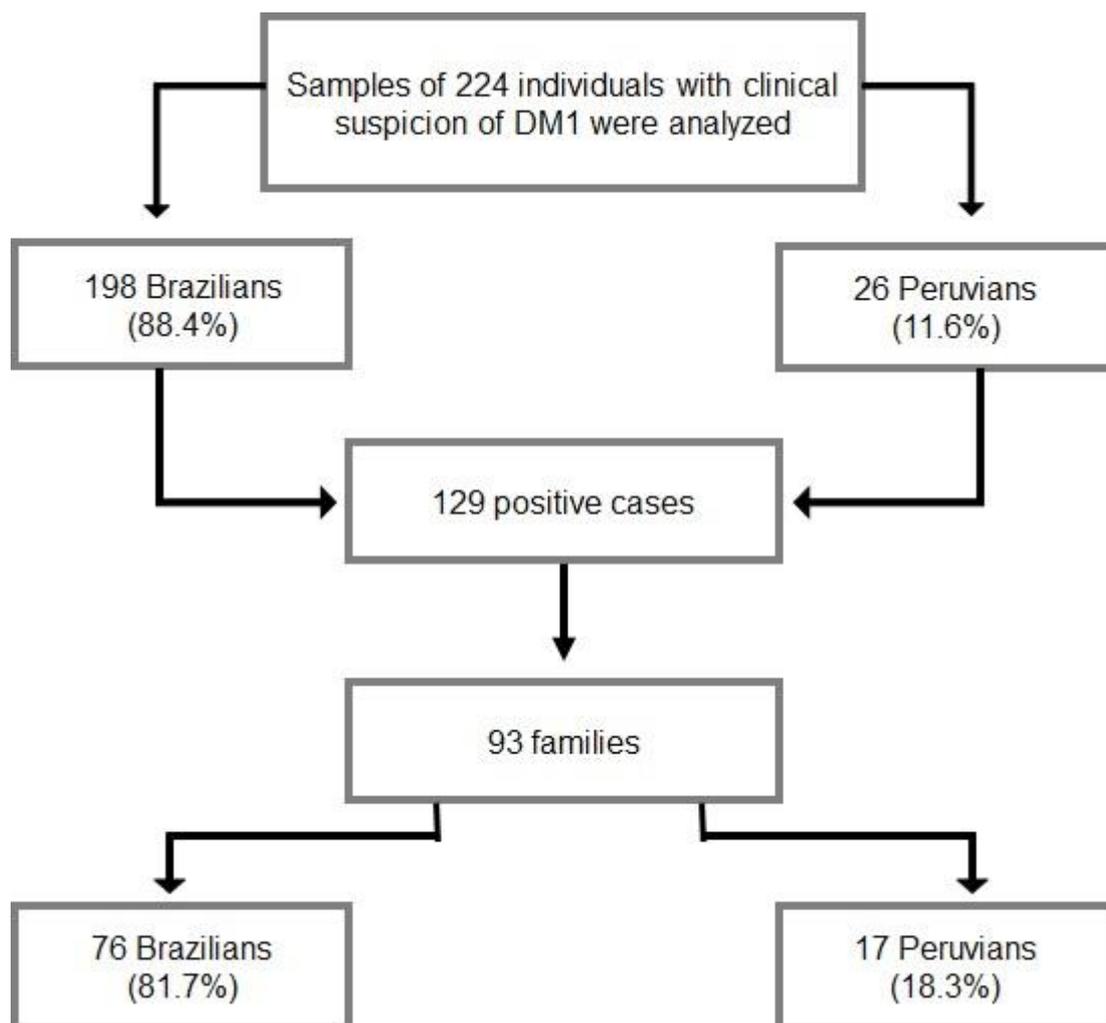


Figure 2. Distribution of cases with clinical suspicion of DM1 included in this study.

Table 1. Distribution of age of onset of the disease in cases included in this study.

Age of onset	# of cases (%)
0 – 10 yo	10 (21%)
11 – 20 yo	13 (27%)
21 – 30 yo	10 (21%)
31 – 40 yo	10 (21%)
41 – 50 yo	3 (6%)
> 51 yo	2 (4%)
<b>Total</b>	<b>48</b>

As mentioned above, Brazilian patients were mainly but not only from Rio Grande do Sul state. Distribution of cases can be observed in figure 3.

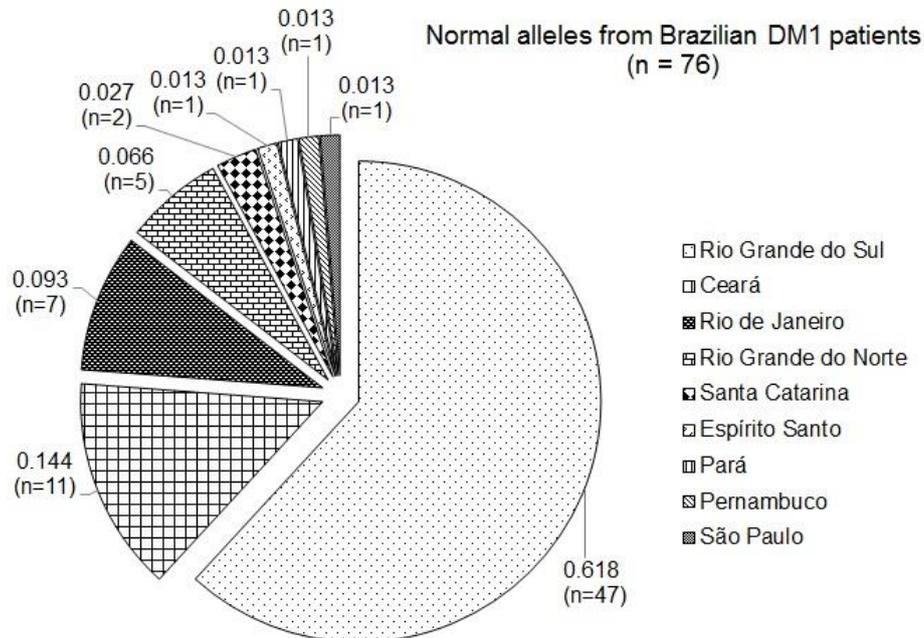


Figure 3. Origin distribution of Brazilian DM1 unrelated patients.

Figure 4 shows the distribution of normal alleles in both populations (Brazilian and Peruvian) obtained in this work. In Brazilian controls (n=523, 1046 alleles), the allele with 5 CTG repeats is the most common (0.326), followed by the allele with 13 CTG repeats (0.183) (Figure 4 – panel A and C). We have identified 4 large normal alleles of (CTG) $\geq$ 45 in Brazilian controls: two alleles with 45 CTG repeats, one with 46 e one with 48 CTG repeats. While in Peruvian controls (n=98, 196 alleles), the allele with 13 CTG repeats is by far the most frequent (0.545), followed by the allele with 11 CTG repeats (0.168) (Figure 4 – panel D). Similar distribution pattern was also observed in normal alleles of DM1 patients from both populations (Figure 4 – panels B and E).

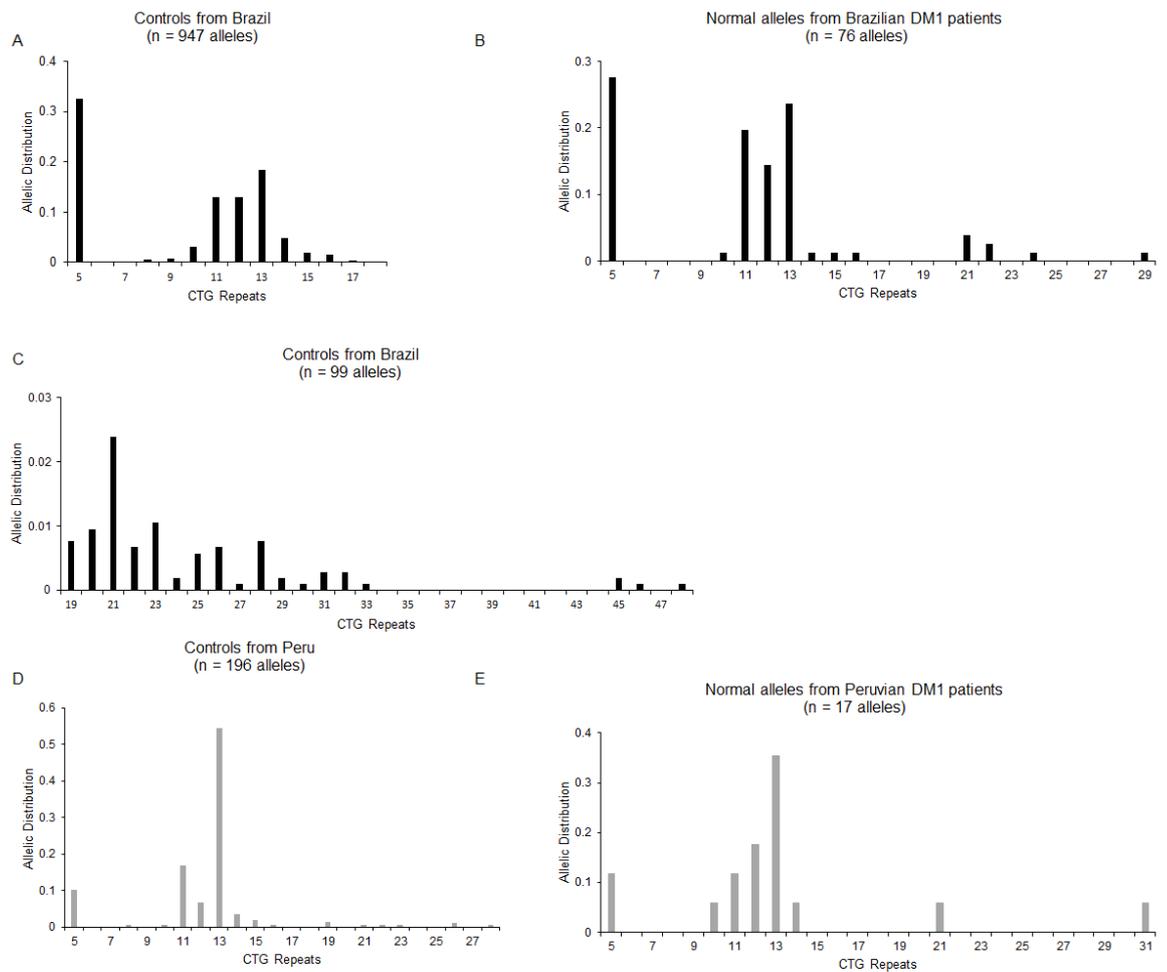


Figure 4. Distribution of CTG repeats at the *DMPK* gene in controls and in normal alleles of DM1 patients.

When alleles are grouped into 3 different classes [(CTG)<sub>5</sub>, (CTG)<sub>6-18</sub> and (CTG)<sub>≥19</sub>], frequencies of Brazilian alleles were 0.326, 0.579, and 0.095, respectively, while frequencies of Peruvian alleles were 0.102, 0.853, and 0.045, respectively. These frequencies were compared between them and data indicated differences between populations ( $p = 0.000$  – Table 2). We have also compared data generated by this study to data from previous published reports that analyzed frequency of alleles at the *DMPK* gene in other cohorts (Tables 2 and 3).

Table 2. Frequencies of CTG<sub>(n)</sub> classes of *DMPK* gene in Brazilians when compared to different populations.

	(CTG) <sub>5</sub>	(CTG) <sub>6-18</sub>	(CTG) <sub>≥19</sub>	<i>p</i> -value
Brazilians (n = 1046)*	0.326 (n = 341)	0.579 (n = 606)	0.095 (n = 99)	
Peruvians (n = 196)*	0.102 (n = 20)	0.853 (n = 167)	0.045 (n = 9)	<i>p</i> = 0.000
Brazilians (Rio de Janeiro) (n = 312) <sup>8</sup>	0.346 (n = 108)	0.577 (n = 180)	0.077 (n = 24)	<i>p</i> = 0.568
Europeans (n = 130) <sup>11</sup>	0.339 (n = 44)	0.546 (n = 71)	0.115 (n = 15)	<i>p</i> = 0.674
Japanese (n = 106) <sup>11</sup>	0.198 (n = 21)	0.717 (n = 76)	0.085 (n = 9)	<i>p</i> = 0.017
South Africans (n = 420) <sup>13</sup>	0.267 (n = 112)	0.726 (n = 304)	0.007 (n = 4)	<i>p</i> = 0.000
Mexicans (n = 800) <sup>14</sup>	0.150 (n = 120)	0.787 (n = 630)	0.063 (n = 50)	<i>p</i> = 0.000

\*Frequencies from this study.

Table 3. Frequencies of CTG<sub>(n)</sub> classes of *DMPK* gene in Peruvians when compared to different populations.

	(CTG) <sub>5</sub>	(CTG) <sub>6-18</sub>	(CTG) <sub>≥19</sub>	<i>p</i> -value
Peruvians (n = 196)*	0.102 (n = 20)	0.853 (n = 167)	0.045 (n = 9)	
Brazilians (n = 1046)*	0.326 (n = 341)	0.579 (n = 606)	0.095 (n = 99)	<i>p</i> = 0.000
Mexicans (n = 800) <sup>14</sup>	0.150 (n = 120)	0.787 (n = 630)	0.063 (n = 50)	<i>p</i> = 0.127
Europeans (n = 130) <sup>11</sup>	0.339 (n = 44)	0.546 (n = 71)	0.115 (n = 15)	<i>p</i> = 0.000
Japanese (n = 106) <sup>11</sup>	0.198 (n = 21)	0.717 (n = 76)	0.085 (n = 9)	<i>p</i> = 0.018
South Africans (n = 420) <sup>13</sup>	0.267 (n = 112)	0.726 (n = 304)	0.007 (n = 4)	<i>p</i> = 0.000
Brazilians (Rio de Janeiro) (n = 320) <sup>8</sup>	0.346 (n = 108)	0.577 (n = 180)	0.077 (n = 24)	<i>p</i> = 0.000

\*Frequencies from this study.

## Discussion

Here we describe the analysis of the polymorphic CTG repeats in the *DMPK* gene in DM1 patients and controls from two different origins: Brazil (mainly from the Southern most state, Rio Grande do Sul) and Peru. The final protocol, following evaluation of different conditions and parameters, were described here and was comprised by conventional PCR using fluorescent primers, for determining normal alleles, and RP-PCR, for confirmation or exclusion of expanded alleles. The final protocol was proven to be efficient and reliable to confirm new cases of DM1 using molecular analysis. To our knowledge, this is the most comprehensive study carried out with Brazilian individuals, and the first one with Peruvian cases. Among 224 individuals referred for molecular analysis, 129 (57.6%) were confirmed as DM1. The remaining cases can be caused by other myopathies, such as myotonic dystrophy type 2 (DM2) or non-progressive myotonic disorders which can be considered in a differential diagnosis.

In this study, although limited information was available, more common clinical features were muscular weakness and myotonia. These symptoms were also common in other studies in Brazilian DM1 patients as well as in the Mexican patients<sup>6,8,14</sup>. Similar symptoms may be also present in other inherited disorders. Therefore, the accurate diagnosis through molecular analysis is essential.

Although few other Brazilian studies have been performed previously, they included individuals from other states of Brazil<sup>6,8</sup>. The American continent has a history of extensive admixture of three continental populations: Africans, Europeans, and Native Americans. The Brazilian population follows this pattern and is the most admixed country in the continent<sup>10</sup>. Native American ancestry in Brazil is higher in the North (Amazonia) while African and European are more widespread. A high proportion of European immigrants have also settled in the South region of Brazil in the latest two centuries. Nowadays, European ancestry is present in up to 77.0% of individuals that are born in South Brazil<sup>15</sup>. Therefore, unless proven to be equal, allelic frequencies should be estimated in different regions of Brazil.

The great majority of normal alleles within Brazilian samples ranged from 5 to 18 CTG repeats (90.5%). The most common allele (5 CTG repeats) in our Brazilian population by far (frequency of 0.326) is also the most frequent in several other studies including Taiwanese, Yugoslavs, African-Americans and Chileans<sup>16-20</sup>.

In the group of samples from Peru, the allele with 13 CTG repeats was the most frequent (0.545); this allele was also reported to be the most common in the Mexican population<sup>14</sup>. Normal alleles ranged from 5 to 28 CTG repeats, with 15 different size alleles.

In the current study, allelic frequency distribution was different between Brazilian and Peruvian controls ( $\chi^2 = 52.71$ ,  $p = 0.000$ ), as demonstrated in Table 2. This data is in agreement with those generated by groups that evaluate population ancestry that supported a higher rate of admixture in Brazil when compared to other countries in Latin America<sup>10</sup>.

Frequencies obtained with Brazilians individuals were similar to those reported in a previous study with a Brazilian population from Rio de Janeiro state ( $\chi^2 = 1.131$ ,  $p = 0.568$ ) and in Europeans ( $\chi^2 = 0.789$ ,  $p = 0.674$ )<sup>8,11</sup>. On the other hand, statistical differences were seen when frequencies of Brazilians were compared to individuals from Mexico ( $\chi^2 = 91.36$ ,  $p = 0.000$ ), from South-Africa ( $\chi^2 = 44.39$ ,  $p = 0.000$ ) and from individuals of Japanese origin ( $\chi^2 = 8.187$ ,  $p = 0.017$ )<sup>11,13,14</sup>.

Considering frequencies in Peruvians, there were similar to individuals from Mexico ( $\chi^2 = 4.126$ ,  $p = 0.127$ ), while differences were seen to all other populations [European ( $\chi^2 = 37.39$ ,  $p = 0.000$ ), Japanese ( $\chi^2 = 7.99$ ,  $p = 0.000$ ), Brazilians from Rio de Janeiro state ( $\chi^2 = 43.59$ ,  $p = 0.000$ ) and South-African ( $\chi^2 = 28.163$ ,  $p = 0.000$ )]<sup>8,11,13,14</sup>.

Large normal alleles in the Brazilian stratum, i.e., those with more than 18 CTG repeats, were found in 9% of controls (Table 2). Similar data was also found in the other study with Brazilian individuals<sup>8</sup> as well as in Europeans<sup>11</sup> (Table 2). This can be relevant for a higher frequency of the disease in our region. We have

identified 4 alleles of (CTG)<sub>≥45</sub> distributed as follows: two alleles with 45 CTG repeats, one with 46 e one with 48 CTG repeats. Those alleles can be classified as mutable, and can potentially expand in the next generation. Further, in the Peruvian population analyzed, frequency of this class of alleles was 4% (Table 2), which is similar to frequency observed in Mexicans<sup>14</sup>.

In nucleotide repeat expansion-related disorders, mutations are unstable and may vary among generations. The number of repeats in an offspring may differ from parents. In DM1, the frequency of alleles with more than 18 CTG repeats in the *DMPK* gene is correlated with the prevalence of the DM1 in different populations, indicating that normal alleles with larger repeats tends to predispose future generations to the disease<sup>4,12</sup>. Therefore, data generate by this study suggest that frequency of DM1 cases in Brazil are likely to be higher than in Peru.

In conclusion, we described here a molecular genetic analysis of DM1 in the largest Brazilian cohort so far, and determined the distribution as well as the frequency of normal alleles and reported detecting some mutable alleles among controls. We also reported the distribution of normal alleles in a Peruvian control population, and confirmed new cases of DM1 patients in Peru.

## References

1. Harper, P. S. & Johnson, K. In *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eds. Scriver, C.R., Beaudet, A. L. , Sly W. S., Valle, D.) 5525-5550 (New York: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2014). <<http://mhmedical.com/content.aspx?aid=1102910928>>
2. Cho, D. H. & Tapscott, S. J. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 195–204 (2007).
3. Theadom, A., Rodrigues, M., Roxburgh, R., Balalla, S., Higgins, C., Bhattacharjee, R., Jones, K., Krishnamurthi, R., Feigin, V. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology* **43**, 259–68, (2014).
4. Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J. *et al.* Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum. Genet.* **117**, 177–187 (2005).
5. Brook, J. D., McCurrach, E. M., Harley, G. H., Buckler, Alan C. J., Church, D., Aburatani, H. *et al.* Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**, 799–808 (1992).
6. Passos-Bueno, M., Cerqueira, A., Vainzof, M., Marie, S., Zatz, M. Myotonic dystrophy: genetic, clinical and molecular analysis of patients from 41 Brazilian families. *J. Med. Genet.* **32**, 14-18 (1995).
7. Zatz, A., Cerqueira, A., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families. *J. of Med. Genet.* **34**, 790-791 (1997).
8. Freitas, S., Cabello, P., Moura-Neto, R., Duro, L. Analysis of the DMPK gene CTG repeat in healthy Brazilians. *Genet. Mol. Biol.* **30(1)**, 14-16 (2007).
9. Warner, J. P., Barron, L. H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D. R. *et al.* A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* **33**, 1022–1026 (1996).
10. Ruiz-Linares, A., Adhikari, K., Acuña-Alonzo, V., Quinto-Sanchez, M., Jaramillo, C., Arias, W., *et al.* Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. *PLoS Genet.* **10(9)**: e1004572. doi: 10.1371/journal.pgen.1004572 (2014)
11. Davies, J., Yamagata, H., Shelbourne, P., Buxton, J., Ogihara, T., Nokelainen, P. *et al.* Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese populations. *J. Med. Genet.* **29**, 766–769 (1992).

12. Imbert, G., Kretz, C., Johnson, K. & Mandel, J. L. Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **4**, 72–76 (1993).
13. Goldman A., Ramsay M., Jenkins T. Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. *J. Med. Genet.* **31(1)**, 37-40 (1994).
14. Magaña, J. J., Cortés-Reynosa, P., Escobar-Cedillo, R., Gómez, R., Leyva-García, N., Cisneros, B. *et al.* Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1341–1346 (2011).
15. Moura, R., Coelho, A. V. C., de Queiroz Balbino, V., Crovella, S., Brandão, L. A. C. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am. J. Hum. Biol.* **27**, 674–680 (2015).
16. Hsiao, K. M., Chen, S. S., Li, S. Y., Chiang, S. Y., Lin, H. M., Pan, H. *et al.* Epidemiological and genetic studies of myotonic dystrophy type 1 in Taiwan. *Neuroepidemiology* **22**, 283–289 (2003).
17. Culjkovic, B., Stojkovic, O., Vukosavic, S., Savic, D., Rakocevic, V., Apostolski, S. *et al.* CTG repeat polymorphism in DMPK gene in healthy Yugoslav population. *Acta Neurol. Scand.* **105**, 55–58 (2002).
18. Acton, R. T., Rivers, C. A., Watson, B. & Oh, S. J. DMPK-associated myotonic dystrophy and CTG repeats in Alabama African Americans. *Clin. Genet.* **72**, 448–453 (2007).
19. Amenabar, F., Jorquera, H., Acuna, M. & Cifuentes, L. CTG repeats at the myotonic protein kinase gene in a healthy Chilean population sample. *Acta Neurol. Scand.* **119**, 321–324 (2009).
20. Theerasasawat, S., Papsing, C. & Pulkes, T. CTG repeat lengths of the DMPK gene in myotonic dystrophy patients compared to healthy controls in Thailand. *J. Clin. Neurosci.* **17**, 1520–1522 (2010).

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, foi realizada a análise das repetições polimórficas CTG no gene *DMPK* em pacientes com DM1 e em controles de duas origens diferentes: Brasil (principalmente do Rio Grande do Sul) e Peru. O protocolo final, após avaliação de diferentes condições e parâmetros, foi estabelecido e compreende a PCR convencional, usando iniciadores fluorescentes para a determinação de alelos normais no gene, e RP-PCR, para confirmação ou exclusão de alelos expandidos. Este protocolo se mostrou eficiente e confiável para confirmar novos casos de DM1 por meio da análise molecular. Este é o estudo mais abrangente realizado com indivíduos brasileiros, e o primeiro com casos peruanos. Entre os 224 indivíduos encaminhados para análise molecular, 129 (57,6%) foram confirmados como DM1. Os casos restantes podem ser causados por outras miopatias, como distrofia miotônica tipo 2 (DM2), ou transtornos miotônicos não progressivos, que devem ser considerados no diagnóstico diferencial.

No presente estudo, as características clínicas mais comuns foram fraqueza muscular e miotomia, apesar de que informações clínicas só estarem disponíveis em aproximadamente 52% dos casos. Esses sintomas são comumente descritos em outros estudos com pacientes brasileiros de DM1, bem como em pacientes mexicanos (Maganã *et al*, 2011). Sintomas semelhantes podem também estar presentes em outras doenças hereditárias. Portanto, o diagnóstico preciso através da análise molecular é essencial.

Embora poucos estudos brasileiros tenham sido realizados anteriormente, eles incluem indivíduos de outros estados do Brasil (Passos-Bueno *et al*, 1995; Freitas *et al*, 2007). O continente americano tem uma história de extensa mistura entre três populações continentais: africanos, europeus e nativos americanos. A população brasileira segue esse padrão e é o país mais miscigenado do continente (Ruiz-Linares *et al*, 2014). A ascendência nativo-americana no Brasil é mais alta no Norte (Amazônia), enquanto africanos e europeus estão mais espalhados pelo país. Uma alta proporção de imigrantes europeus também se instalaram na região sul do Brasil nos últimos dois séculos. Atualmente, a ascendência europeia está presente em até 77,0% dos indivíduos que nascem no Sul do Brasil (Moura *et al*, 2015). Portanto, é importante a determinação das frequências alélicas em diferentes regiões do Brasil.

A grande maioria dos alelos normais no grupo de amostras brasileiras variou de tamanho entre 5 e 18 repetições CTG (90,5%). O alelo mais comum (5 repetições CTG – frequência de 0,326) no nosso estudo da população brasileira é também o mais frequente em vários outros estudos, incluindo taiwaneses, iugoslavos, afro-americanos e chilenos (Hsiao *et al*, 2003; Culjikovic *et al*, 2002; Acton *et al*, 2007; Amebar *et al*, 2009; Theerasasawat *et al*, 2010).

No grupo de amostras do Peru, o alelo com 13 repetições CTG foi o mais frequente (0,545). Este alelo também foi o mais comumente encontrado na população mexicana (Magaña *et al*, 2011). Os alelos normais variaram de 5 a 28 repetições de CTG nesta população, sendo identificados 15 alelos de tamanhos diferentes.

No presente estudo, a distribuição de frequências alélicas foi diferente entre controles brasileiros e peruanos ( $\chi^2 = 52,71$ ,  $p = 0,000$ ). Estes dados estão de acordo com os dados gerados por grupos que avaliam ascendência populacional que determinaram uma taxa mais alta miscigenação no Brasil quando comparado com outros países da América Latina (Ruiz-Linares *et al*, 2014).

As frequências obtidas com indivíduos brasileiros foram semelhantes a frequência obtida anteriormente com indivíduos brasileiros do estado do Rio de Janeiro ( $\chi^2 = 1,131$   $p = 0,568$ ) e a frequência dos europeus ( $\chi^2 = 0,789$ ,  $p = 0,674$ ). Por outro lado, diferenças estatísticas foram observadas quando comparadas as frequências de brasileiros com indivíduos do México ( $\chi^2 = 91,36$ ,  $p = 0,000$ ), da África do Sul ( $\chi^2 = 44,39$ ,  $p = 0,000$ ) e do Japão ( $\chi^2 = 8,18$ ,  $p = 0,000$ ).

Considerando as frequências nos peruanos, essas frequências forma semelhantes a da população mexicana ( $\chi^2 = 4,126$ ,  $p = 0,127$ ). Por outro lado, essas frequências são diferentes das demais populações [europeia ( $\chi^2 = 37,39$ ,  $p = 0,000$ ), japonesa ( $\chi^2 = 7,991$ ,  $p = 0,000$ ), brasileira composta por indivíduos do estado do Rio de Janeiro ( $\chi^2 = 43,590$ ,  $p < 0,000$ ) e sul-africana ( $\chi^2 = 28,163$ ,  $p = 0,000$ )].

Foram encontrados alelos normais grandes em 9% dos controles brasileiros, isto é, alelos com mais de 18 repetições CTG. Dados semelhantes também foram encontrados no outro estudo com indivíduos brasileiros (Freitas *et al*, 2007), bem como na população europeia (Davies *et al*, 1992). Isso pode ser relevante para uma maior frequência da doença em nossa região. Identificamos 4 alelos com (CTG) $_{\geq 45}$  distribuídos da seguinte forma: dois alelos com 45 repetições de CTG, um com 46

e um com 48 repetições CTG. Esses alelos são classificados como mutáveis e podem, potencialmente, se expandir na próxima geração. Na população peruana analisada, a frequência desta classe de alelos foi de 4%, a qual é semelhante à frequência observada em Africanos (Goldman *et al*, 1994), sugerindo que essas duas populações podem apresentar uma baixa prevalência de DM1.

Em doenças associadas com expansão de repetições nucleotídicas, as mutações são instáveis e podem variar entre gerações. O número de repetições em uma prole pode ser diferente da dos seus pais. Na DM1, a frequência de alelos com mais de 18 repetições CTG no gene *DMPK* está correlacionada com a prevalência do DM1 em diferentes populações, indicando que alelos normais com repetições maiores tendem a predispor à doença em gerações futuras (Yotova *et al*, 2015; Imbert *et al*, 1993). Portanto, os dados gerados por este estudo sugerem que a frequência de casos de DM1 no Brasil deve ser maior do que no Peru.

Em resumo, descrevemos aqui a análise molecular de DM1 na maior coorte brasileira até o momento. A distribuição e a frequência de alelos normais foram determinadas e relatamos a detecção de alguns alelos mutáveis entre os controles. Além disso, a distribuição de alelos normais em uma população controle peruana foi determinada e confirmamos novos casos de pacientes com DM1 no Peru.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

- A combinação de PCR convencional usando iniciadores fluorescentes com a técnica de RP-PCR está adequada para a identificação de pacientes de DM1.
- O protocolo estabelecido identificou 129 casos de DM1 de 93 famílias (76 famílias brasileiras e 17 famílias peruanas), a partir da análise de 224 indivíduos com suspeita clínica da doença.
- A distribuição alélica das repetições CTG no gene *DMPK* foi estabelecida em controles brasileiros e peruanos.
- O alelo normal no gene *DMPK* mais frequente na população brasileira foi o de 5 repetições CTG, enquanto, na população peruana, o alelo mais frequente apresenta 13 repetições CTG.
- A frequência de alelos com mais de 18 repetições CTG, estabelecida para as duas populações estudadas, indica maior prevalência de DM1 na população brasileira quando comparada com a peruana.

## 6. REFERÊNCIAS

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre, ArtMed, 1396p., 2010.

Aslanidis, C.; Jansen, G.; Amemiya, C.; Shutler, G.; Mahadevan, M.; Tsilfidis, C. Chen, C., Alleman, J., Wormskamp, N. G., Vooijs, M. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature*, 355(6360): 548–551, 1992.

Bhargava, A. & Fuentes, F. F. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44(3): 250–266, 2010.

Benders, A.; Groenen, P.; Oerlemans, F.; Veerkamp, J.; Wieringa, B. Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca<sup>++</sup> homeostasis in skeletal muscle cells. *Journal of Clinical Investigations*, 100: 1440-1447, 1997.

Berul, C. I.; Maguire, C. T.; Aronovitz, M. J.; Greenwood, J.; Miller, C.; Gehrmann, J. Housman, D.; Mendelsohn, M. E.; Reddy, S. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(4): 1–7, 1999.

Bondy-Chorney, E.; Parks, T; Ravel-Chapuis, A; Jasmin, J.; Côté J. Staufen1 role as a splicing factor and a disease modifier in Myotonic Dystrophy Type I. *Rare Diseases*, 4, 2016 <doi.org/10.1080/21675511.2016.1225644>

Brook, J. D.; McCurrach, M. E.; Harley, H. G.; Buckler, A. J.; Church, D.; Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J., Hudson, T., Sohn, R., Zemelmann, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S. Shaw, D. J. Housman, D. E. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68(4): 799–808, 1992.

Bush, E.W.; Helmke, S.M.; Birnbaum, R.A. & Perryman, M.B. Myotonic dystrophy protein kinase domains mediate localization, oligomerization, novel catalytic activity, and autoinhibition. *Biochemistry*, 39(29): 8480-90, 2000.

Buxton, J.; Shelbourne, P.; Davies, J.; Jones, C.; Van Tongeren, T.; Aslanidis, C.; de Jong, P.; Jansen, G.; Anvret, M.; Riley, B.. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, 355(6360): 547–548, 1992.

Carrel, S.; Carrel, E.; Auerbach, D.; Pandey, S.; Bennett, C.; Dirksen R.; Thornton, C. *DMPK* gene deletion or antisense knockdown does not compromise cardiac or skeletal muscle function in mice. *Human Molecular Genetics*, 2016. doi: 10.1093/hmg/ddw266

Cleary, J. D. & Ranum, L. P. W. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Human Molecular Genetics*, 22(1): 45–51, 2013.

Davies, J.; Yamagata, H.; Shelbourne, P.; Buxton, J.; Ogiwara, T.; Nokelainen, P.; Nakagawa, M.; Williamson, R.; Johnson, K.; Miki, T. Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese populations. *Journal of Medical Genetics*, 29(11): 766–769, 1992.

Davis, B. M.; McCurrach, M. E. Taneja, K. L.; Singer, R. H.; Housman, D. E. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14): 7388–7393, 1997.

Freitas, S.; Cabello, P.; Moura-Neto, R.; Duro, L. Analysis of the DMPK gene CTG repeat in healthy Brazilians. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1): 14-16, 2007 doi.org/10.1590/S1415-47572007000100004

Frisch, R.; Singleton, K. R.; Moses, P. A.; Gonzalez, I. L.; Carango, P.; Marks, H. G.; Funanage, V. L. Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74(1-2): 281–291, 2001.

Fu, Y. H.; Friedman, D. L.; Richards, S.; Pearlman, J. A.; Gibbs, R. A.; Pizzuti, A.; Ashizawa, T.; Perryman, M. B.; Scarlato, G.; Fenwick, R. G. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science*, 260(5105): 235-238, 1993.

Goldman A.; Ramsay M. & Jenkins T. Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. *Journal of Medical Genetics*, 31(1): 37-40, 1994.

Groenen, P. J.; Wansink, D. G.; Coerwinkel, M.; Van Den Broek, W.; Jansen, G.; Wieringa, B. Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties. *Human Molecular Genetics*, 9(4): 605–616, 2000.

Harley, H. G.; Brook, J. D.; Floyd, J.; Rundle, S. A.; Crow, S.; Walsh, K. V.; Thibault, M. C.; Harper, P. S.; Shaw, D. J. Detection of linkage disequilibrium between the myotonic dystrophy locus and a new polymorphic DNA marker. *American Journal of Human Genetics*, 49(1): 68–75, 1991.

Harmon, E. B.; Harmon, M. L.; Larsen, T. D.; Paulson, A. F.; Perryman, M. B. Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Developmental Dynamics*, 237(9): 2353–2366, 2008.

Harper, P.S. & Johnson, K. Myotonic Dystrophy. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill; 2014. <ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971&Sectionid=62659085> Acesso em novembro de 2016

Imbert, G.; Kretz, C.; Johnson, K.; Mandel, J. L. Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 4(1): 72–76, 1993.

Klesert, T. R.; Cho, D. H.; Clark, J. I.; Maylie, J.; Adelman, J.; Snider, L.; Yuen, E.; Soriano, P.; Tapscott, S. J. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 25(1), 105-109, 2000.

Jansen, G.; Willems, P.; Coerwinkel, M.; Nillesen, W.; Smeets, H.; Vits, L.; Howeler, C.; Brunner, H.; Wieringa, B. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *American Journal of Human Genetics*, 54(4): 575–585, 1994.

Jansen, G.; Groenen, P. J.; Bächner, D.; Jap, P. H.; Coerwinkel, M.; Oerlemans, F. van den Broek, W.; Gohlsch, B.; Pette, D.; Plomp, J. J.; Molenaar, P. C.; Nederhoff, M. G.; van Echteld, C. J.; Dekker, M.; Berns, A.; Hameister, H.; Wieringa, B. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nature Genetics*, 13(3): 316–324, 1996.

Kim, J. & Mirkin S. The balancing act of DNA repeat expansions. *Current Opinion Genetic Development*, 23: 280-288, 2013.

Kinter, J. & Sinnreich, M. Molecular targets to treat muscular dystrophies. *Swiss Medical Weekly*, 144:1-16, 2014.

La Spada, A.; Wilson, E.; Lubahn, D.; Harding, A.; Fischbeck, K. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352(6330): 77–79, 1991.

La Spada A. & Taylor J. Repeat expansion disease: Progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 11 (4): 247-258, 2010.

Lam, L. T.; Pham, Y. C.; Nguyen, T. M.; Morris, G. E. Characterization of a monoclonal antibody panel shows that the myotonic dystrophy protein kinase, DMPK, is expressed almost exclusively in muscle and heart. *Human Molecular Genetics*, 9(14): 2167–2173, 2000.

Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; Lehoczky, J.; LeVine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; Meldrim, J.; Mesirov, J. P.; Miranda, C.; Morris, W.; Naylor, J.; Raymond, C.; Rosetti, M.; Santos, R.; Sheridan, A.; Sougnez, C.; Stange-Thomann, Y.; Stojanovic, N.; Subramanian, A.; Wyman, D.; Rogers, J.; Sulston, J.; Ainscough,

R.; Beck, S.; Bentley, D.; Burton, J.; Clee, C.; Carter, N.; Coulson, A.; Deadman, R.; Deloukas, P.; Dunham, A.; Dunham, I.; Durbin, R.; French, L.; Grafham, D.; Gregory, S.; Hubbard, T.; Humphray, S.; Hunt, A.; Jones, M.; Lloyd, C.; McMurray, A.; Matthews, L.; Mercer, S.; Milne, S.; Mullikin, J. C.; Mungall, A.; Plumb, R.; Ross, M.; Shownkeen, R.; Sims, S.; Waterston, R. H.; Wilson, R. K.; Hillier, L. W.; McPherson, J. D.; Marra, M. A.; Mardis, E. R.; Fulton, L. A.; Chinwalla, A. T.; Pepin, K. H.; Gish, W. R.; Chissole, S. L.; Wendl, M. C.; Delehaunty, K. D.; Miner, T. L.; Delehaunty, A.; Kramer, J. B.; Cook, L. L.; Fulton, R. S.; Johnson, D. L.; Minx, P. J.; Clifton, S. W.; Hawkins, T.; Branscomb, E.; Predki, P.; Richardson, P.; Wenning, S.; Slezak, T.; Doggett, N.; Cheng, J. F.; Olsen, A.; Lucas, S.; Elkin, C.; Uberbacher, E.; Frazier, M.; Gibbs, R. A.; Muzny, D. M.; Scherer, S. E.; Bouck, J. B.; Sodergren, E. J.; Worley, K. C.; Rives, C. M.; Gorrell, J. H.; Metzker, M. L.; Naylor, S. L.; Kucherlapati, R. S.; Nelson, D. L.; Weinstock, G. M.; Sakaki, Y.; Fujiyama, A.; Hattori, M.; Yada, T.; Toyoda, A.; Itoh, T.; Kawagoe, C.; Watanabe, H.; Totoki, Y.; Taylor, T.; Weissenbach, J.; Heilig, R.; Saurin, W.; Artiguenave, F.; Brottier, P.; Bruls, T.; Pelletier, E.; Robert, C.; Wincker, P.; Smith, D. R.; Doucette-Stamm, L.; Rubenfield, M.; Weinstock, K.; Lee, H. M.; Dubois, J.; Rosenthal, A.; Platzer, M.; Nyakatura, G.; Taudien, S.; Rump, A.; Yang, H.; Yu, J.; Wang, J.; Huang, G.; Gu, J.; Hood, L.; Rowen, L.; Madan, A.; Qin, S.; Davis, R. W.; Federspiel, N. A.; Abola, A. P.; Proctor, M. J.; Myers, R. M.; Schmutz, J.; Dickson, M.; Grimwood, J.; Cox, D. R.; Olson, M. V.; Kaul, R.; Raymond, C.; Shimizu, N.; Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Evans, G. A.; Athanasiou, M.; Schultz, R.; Roe, B. A.; Chen, F.; Pan, H.; Ramser, J.; Lehrach, H.; Reinhardt, R.; McCombie, W. R.; de la Bastide, M.; Dedhia, N.; Blöcker, H.; Hornischer, K.; Nordsiek, G.; Agarwala, R.; Aravind, L.; Bailey, J. A.; Bateman, A.; Batzoglou, S.; Birney, E.; Bork, P.; Brown, D. G.; Burge, C. B.; Cerutti, L.; Chen, H. C.; Church, D.; Clamp, M.; Copley, R. R.; Doerks, T.; Eddy, S. R.; Eichler, E. E.; Furey, T. S.; Galagan, J.; Gilbert, J. G.; Harmon, C.; Hayashizaki, Y.; Haussler, D.; Hermjakob, H.; Hokamp, K.; Jang, W.; Johnson, L. S.; Jones, T. A.; Kasif, S.; Kasprzyk, A.; Kennedy, S.; Kent, W. J.; Kitts, P.; Koonin, E. V.; Korf, I.; Kulp, D.; Lancet, D.; Lowe, T. M.; McLysaght, A.; Mikkelsen, T.; Moran, J. V.; Mulder, N.; Pollara, V. J.; Ponting, C. P.; Schuler, G.; Schultz, J.; Slater, G.; Smit, A. F.; Stupka, E.; Szustakowki, J.; Thierry-Mieg, D.; Thierry-Mieg, J.; Wagner, L.; Wallis, J.; Wheeler, R.; Williams, A.; Wolf, Y. I.; Wolfe, K. H.; Yang, S. P.; Yeh, R. F.; Collins, F.; Guyer, M. S.; Peterson, J.; Felsenfeld, A.; Wetterstrand, K. A.; Patrinos, A.; Morgan, M. J.; de Jong, P.; Catanese, J. J.; Osoegawa, K.; Shizuya, H.; Choi, S.; Chen, Y. J.; Szustakowki, J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921, 2001.

Lee, J. & Cooper, T. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochemical Society Transactions*, 37(6): 1–11, 2009.

Magaña, J. J.; Cortés-Reynosa, P.; Escobar-Cedillo, R.; Gómez, R.; Leyva-García, N.; Cisneros, B. Distribution of CTG repeats at the *DMPK* gene in myotonic dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population. *Molecular Biology Reports*, 38(2): 1341–1346, 2011.

Margulies, E.; NISC Comparative Sequencing Program & Green E. Detecting highly conserved regions of the human genome by multispecies sequence comparisons. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology*, 68: 255-243, 2003.

Mateos-Aierdi, A. J.; Goicoechea, M.; Aiausti, A.; Fernández-Torrón, R.; Garcia-Puga, M.; Matheu, A., Munain, A. Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(125), 2015 doi:10.3389/fnagi.2015.00125

Meola, G. & Cardani, R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(4): 594–606, 2014.

Monckton, D. G.; Wong, L. J.; Ashizawa, T.; Caskey, C. T. Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Human Molecular Genetics*, 4(1): 1–8, 1995.

Mounsey, J. P.; John, J. E., Helmke, S. M.; Bush, E. W.; Gilbert, J.; Roses, A. D.; Perryman, M. B.; Jones, L. R. & Moorman, J. R. Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30): 23362-23367, 2000.

Moura, R.; Coelho, A. V. C.; de Queiroz Balbino, V.; Crovella, S.; Brandão, L. A. C. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *American Journal of Human Biology*, 27: 674–680, 2015.

Muranyi, A.; Zhang, R.; Liu, F.; Hirano, K.; Ito, M.; Epstein, H.F. & Hartshorne, D.J. Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 493(2-3): 80-84, 2001.

Musova, Z.; Mazanec, R.; Krepelova, A.; Ehler, E.; Vales, J.; Jaklova, R.; Prochazka, T.; Koukal, P.; Marikova, T.; Kraus, J.; Havlovicova, M.; Sedlacek, Z. Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *American Journal of Medical Genetics*, 149A(7): 1365–1374, 2009.

O'Coirlain, D.F.; Perez-Terzic, C.; Reyes, S.; Kane, G.C.; Behfar, A.; Hodgson, D.M.; Strommen, J. A.; Liu, X.; van den Broek, W.; Wansink, D. G.; Wieringa, B.; Terzic, A. Transgenic overexpression of human DMPK accumulates into hypertrophic cardiomyopathy, myotonic myopathy and hypotension traits of myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 13(20): 2505-2518, 2004.

Passos-Bueno, M.; Cerqueira, A.; Vainzof, M.; Marie, S.; Zatz, M. Myotonic dystrophy: genetic, clinical and molecular analysis of patients from 41 Brazilian families. *Journal of Medical Genetics*, 32: 14-18, 1995.

Penrose, L. S. The problems of anticipation in pedigrees of dystrophia myotonica. *Annals of Eugenics*. 14(2): 125-132, 1948.

Pettersson, O. J.; Aagaard, L.; Gryesten J. T.; Damgaard, C. K. Molecular mechanisms in DM1 — a focus on foci. *Nucleic Acids Research*, 43(10): 2433–2441, 2015.

Pratte, A.; Prévost, C.; Puymirat, J.; Mathieu, J. Anticipation in myotonic dystrophy type 1 parents with small CTG expansions. *American Journal of Medical Genetics*, 167(4): 708–714, 2015.

Rollins R.; Haghghi, F.; Edwards, J.; Das, R.; Zhang, M.; Ju, J.; Bestor, T. Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Research*, 16(2): 157-163, 2006.

Ruiz-Linares, A.; Adhikari, K.; Acuña-Alonzo, V.; Quinto-Sanchez, M.; Jaramillo, C.; Arias, W., *et al.* Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. *PLoS Genetics*. 10(9): e1004572. doi: 10.1371/journal.pgen.1004572, 2014.

Sarkar, P. S.; Appukuttan, B.; Han, J.; Ito, Y.; Ai, C.; Tsai, W.; Chai, Y.; Stout, T.; Reddy, S. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature Genetics*, 25(1): 110-114, 2000.

Sarkar, P. S.; Han, J. & Reddy, S. In situ hybridization analysis of DMPK mRNA in adult mouse tissues. *Neuromuscular Disorders*, 14(8-9): 497-506, 2004.

Sarkar, P. S.; Paul, S.; Han, J.; Reddy, S. Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Human Molecular Genetics*, 13(14): 1421-1431, 2004.

Savkur, R. S.; Philips, A. V.; Cooper, T. A. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 29(1): 40-47, 2001.

Schara, U. & Schoser, B. G. H. Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13(2): 71–79, 2006.

Shieh, P. B. Muscular dystrophies and other genetic myopathies. *Neurologic Clinics*, 31(4): 1009–1029, 2013.

Singh, S.; Zhang, A.; Dlouhy, S. Bai, S. Detection of large expansions in myotonic dystrophy type 1 using triplet primed PCR. *Frontiers in Genetics*, 5(94):1–6, 2014. doi: 10.3389/fgene.2014.00094

Suominen, T.; Bachinski, L. L.; Auvinen, S.; Hackman, P.; Baggerly, K. A.; Angelini, C.; Peltonen, L.; Krahe, R.; Udd, B. Population frequency of myotonic dystrophy:

higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland. *European Journal of Human Genetics*, 19(7): 776–782, 2011.

Theadom, A.; Rodrigues, M.; Roxburgh, R.; Balalla, S.; Higgins, C.; Bhattacharjee, R.; Jones, K.; Krishnamurthi, R.; Feigin, V. Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. *Neuroepidemiology*, 43(3-4): 259–268, 2014.

Turner, C. & Hilton-Jones, D. Myotonic dystrophy: diagnosis, management and new therapies. *Current Opinion in Neurology*, 27(5): 599–606, 2014.

Udd, B. & Krahe, R. The myotonic dystrophies: Molecular, clinical, and therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*, 11(10): 891–905, 2012.

van der Ven, P. F.; Jansen, G.; van Kuppevelt, T.H.; Perryman, M.B.; Lupa, M.; Dunne, P.W.; Laak, H. J.; Jap, P. H. K.; Veerkamp, J. H.; Epstein, H. F.; Wieringa, B. Myotonic dystrophy kinase is a component of neuromuscular junctions. *Human Molecular Genetics*, 2(11): 1889-1894, 1993.

Verkerk A.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J.; Fu, Y.; Kuhl, D.; Pizzuti, A.; Reiner, O.; Richards, S.; Victoria, M. F.; Zhang, F.; Eussen, B. E.; van Ommen, G. B.; Blonden, L. A. J.; Riggins, G. J.; Chastain, J. L.; Kunst, C. B.; Galjaard, H.; Thomas C. C.; Nelson, D. L.; Oostra, B. A.; Warren, S. T. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5): 905–914, 1991.

Wagner, A. & Steinberg, H. Hans Steinert (1875-1911). *Journal of Neurology*, 255, 10, 1607–1608, 2008.

Wakimoto, H.; Maguire, C. T.; Sherwood, M. C.; Vargas, M. M.; Sarkar, P. S.; Han, J.; Reddy, S.; Berul, C. I. Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, 7(2), 127-135, 2002.

Wansink, D. G.; Van Herpen, R. E.; Coerwinkel-Driessen, M. M; Groenen, P. J.; Hemmings, B. A.; Wieringa, B. Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16): 5489–5501, 2003.

Weber, J. L. & Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2(8): 1123–1128, 1993.

Westerlaken, J. H.; Van der Zee, C. E.; Peters, W.; Wieringa, B. The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Research*, 971(1): 116–127, 2003.

Wong, L. J.; Ashizawa, T.; Monckton, D. G.; Caskey, C. T.; Richards, C. S. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *American Journal of Human Genetics*, 56(1): 114–122, 1995.

Yotova, V.; Labuda, D.; Zietkiewicz, E.; Gehl, D.; Lovell, A.; Lefebvre, J.; Bourgeois, S.; Lemieux-Blanchard, E.; Labuda, M.; Vezina, H.; Houde, L.; Tremblay, M.; Toupance, B.; Heyer, E.; Hudson, T. J.; Laberge, C. Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Human Genetics*, 117(2-3): 177–187, 2005.

Zatz, A.; Cerqueira, A.; Vainzof, M.; Passos-Bueno, M. Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families. *Journal of Medical Genetics*, 34: 790-791, 1997.

Zu, T.; Gibbens, B.; Doty, N. S.; Gomes-Pereira, M.; Huguet, A. Stone, M. D. Non-ATG – initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1): 260–265, 2010.

## ANEXO

### CURRICULUM VITAE

RODRIGUES, L. P.

#### 1. DADOS PESSOAIS

Nome: Luiza Paulsen Rodrigues

Local e data de nascimento: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil - 12/10/1992

Endereço Profissional: Laboratório de Identificação Genética  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone Profissional: (51) 33597689

E-mail: luizapaulsen@gmail.com

#### 2. FORMAÇÃO:

2010 – 2013: Graduação em Biotecnologia.  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.  
Título: Avaliação Do Polimorfismo Do FGFR4 Arg388Gly Em  
Relação ao Câncer: Uma Breve Revisão. Avaliação *in vitro* da  
Atividade Citotóxica de Extrato Pirolenhoso em Linhagens  
Celular Tumerais e Não-Tumorais.  
Orientador: Fernanda Nedel.

2014 – 2016: Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,  
Brasil.  
Orientador(a): Maria Luiza Saraiva-Pereira.  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
de Nível Superior, CAPES, Brasil.

#### 3. ESTÁGIOS

2011 – 2012: Estágio Curricular – Iniciação Científica  
Orientação: Dra. Sandra Tarquínio,  
Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia,  
Núcleo de Biologia Celular e Tecidual,

Foram desenvolvidas atividades relacionadas a polimorfismo e carcinomas espinocelulares.

2012 – 2013: Estágio Curricular – Iniciação Científica  
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Núcleo de Biologia Celular e Tecidual,  
Orientador(a): Dra. Adriana Fernandes da Silva  
Foram desenvolvidos estudos de associação entre polimorfismos e a síndrome da ardência bucal.

2013 – 2013: Estágio Curricular de Final de Curso  
Orientação: Dra. Fernanda Nedel.  
Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Núcleo de Biologia Celular e Tecidual,  
Foram desenvolvidas atividades relacionadas a citotoxicidade de Extrato Pirolenhoso Em Linhagens Celulares Tumerais

#### **4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

Rodrigues, L. P.; Nedel, F.; Tarquinio, S. B. C.; Silva, A. F. Estudo da Associação entre Síndrome da Ardência Bucal e Polimorfismos nos Genes p53, 5-HT2A e IL-1B. In: XXII Congresso de Iniciação Científica, 2013, Pelotas, RS. XXII CIC, 2013.

Pinto, J. S.; Rodrigues, L. P.; Nedel, F.; Seixas, F. K.; Tarquinio, S. B. C. Avaliação do polimorfismo do gene do fator de crescimento endotelial vascular 936 C/T em carcinomas espinocelulares. In: 21º Congresso de Iniciação Científica, 2012, Pelotas. XXI CIC/IV MC, 2012.

Rodrigues, L. P.; Salaberry, J.; Nedel, F.; Tarquinio, S. B. C. Avaliação do polimorfismo do FGFR Arg388Gly em relação ao câncer: Uma breve revisão. In: 21º Congresso de Iniciação Científica, 2012, Pelotas. XXI CIC/IV MC, 2012.

Rodrigues, L. P.; Polese-Bonatto, M.; Saute, J.; Jardim, L.; Saraiva-Pereira, M. L. Distribuição Alélica De Nucleotídeos CTG no Gene *DMPK* em Pacientes com Distrofia Miotônica Tipo 1. 35ª Semana Científica do HCPA, Porto Alegre, RS, 2016.

Rodrigues, L. P.; Polese-Bonatto, M.; Furtado, G.; Saute, J.; Jardim, L.; Saraiva-Pereira, M. L. Distribuição Alélica de Repetições CTG no Gene *DMPK* e Identificação de Pacientes com Distrofia Miotônica Tipo 1. 36ª Semana Científica do HCPA, Porto Alegre, RS, 2016.