



ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO RS175080 EN EL GEN *MLH3* SOBRE LA EDAD DE INICIO DE LA ATAXIA ESPINOCEREBELOS TIPO 2

Autores: Luis E. Almaguer Mederos^{1*}, Dany Cuello Almarales², Raúl Aguilera Rodríguez³, Yanetza González Zaldívar⁴, Loire Arias Acuña⁵, Yasnay Jorge Saínez⁶, Geanny Sánchez Ochoa⁷

¹ Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador y Profesor Titular, Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias, Universidad de Ciencias Médicas de Holguín, Cuba,

² Lic. en Biología, MSc. Neurociencias, Investigador Auxiliar, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, Universidad de Ciencias Médicas de Holguín, Cuba,

³ Especialista de 1^{er} grado en Medicina Interna, MSc. Urgencias Médicas, Centro para la Investigación y Rehabilitación de Ataxias Hereditarias, Universidad de Ciencias Médicas de Holguín, Cuba,

⁴ Lic. en Microbiología, Investigadora Auxiliar, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, Cuba,

⁵ Lic. en Biología, Centro para la Investigación y Rehabilitación de las Ataxias Hereditarias, Cuba,

⁶ Doctora en Medicina, Especialista de 1^{er} grado en MGI, Especialista de 1^{er} grado en Bioquímica Clínica, Universidad de Ciencias Médicas de Holguín, Cuba,

⁷ Doctora en Medicina, Especialista de 1^{er} grado en Bioquímica Clínica, Universidad de Ciencias Médicas de Holguín, Cuba.

* E-mail: lalmaguermederos@gmail.com



RESUMEN

Introducción: La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 es una enfermedad neurodegenerativa que muestra sustancial variabilidad clínica. Se ha propuesto la existencia de variantes en genes que participan en rutas de reparación del ADN, que contribuyen a explicar la variabilidad clínica observada. **Objetivo:** Evaluar el efecto modificador del polimorfismo de un solo nucleótido rs175080 en el gen *MLH3* sobre la edad de inicio de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio de caso-control y correlacional que incluyó 301 pacientes con SCA2 y 100 individuos sanos. La presencia de las variantes alélicas para el polimorfismo rs175080 fue establecida por medio de PCR-RFLP. **Resultados:** El alelo alternativo "T" para el polimorfismo rs175080 tuvo una frecuencia de 0,4584. No hubo diferencias significativas entre pacientes y controles en cuanto a la distribución de las variantes alélicas o genotípicas para el rs175080. No se obtuvieron diferencias significativas para la edad de inicio de la enfermedad atendiendo a los diferentes genotipos según los modelos aditivo ($F=0,396$; $p=0,673$), dominante ($t=0,643$; $p=0,521$) o recesivo ($t=0,936$; $p=0,351$). **Conclusiones:** El polimorfismo de un solo nucleótido rs175080 en el gen *MLH3* no actúa como modificador de la edad de inicio en pacientes cubanos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

INTRODUCCIÓN

La Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2) es una Ataxia Cerebelosa Autosómico Dominante perteneciente al grupo I de la clasificación de Anita Harding, causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG en la región codificadora del gen *ATXN2*. Esta última característica la ubica, junto a la enfermedad de Huntington (HD, del inglés: Huntington's disease), la Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA, del inglés: Spinal and Bulbar Muscular Atrophy), la Atrofia Dentatorubral-Pálidoluisiana (DRPLA, del inglés: Dentatorubral pallidoluisian atrophy) y a las Ataxias Espinocerebelosas (SCA) tipo 1, tipo 3 -o enfermedad de Machado-Joseph (MJD, del inglés: Machado-Joseph disease)-, tipo 6, tipo 7 y tipo 17, en el grupo de enfermedades poliglutamínicas humanas.^{1,2}



Estudios epidemiológicos indican que la SCA2 es la segunda entre las ataxias espinocerebelosas con mayor frecuencia a nivel mundial; representa el 15% de todas las SCA, y el 33% de las SCA debidas a expansiones de secuencias repetitivas de CAG.^{3,4} Las más elevadas tasas de incidencia y prevalencia de la enfermedad a nivel mundial se han encontrado en la provincia Holguín, donde radica el 70% de los individuos enfermos con SCA2 en el país, para una prevalencia de 40,18 cada 10⁵ habitantes; se presume que esta situación se deba a la ocurrencia de un "efecto fundador".⁵

El número de repeticiones de CAG en los alelos *ATXN2* expandidos es el factor genético con mayor influencia sobre el fenotipo clínico de la enfermedad, incluyendo la presencia de distonía y mioquimia, la disminución de la velocidad sacádica ocular, y la puntuación total de ataxia.^{6,7} Existe una correlación entre la edad de inicio de la enfermedad y el número de repeticiones de CAG en los alelos *ATXN2* expandidos, que explica entre el 47 y 80% de la variabilidad de la edad de inicio.^{8,9}

Se ha comprobado que alrededor del 55% de la varianza residual de la edad de inicio de la enfermedad, una vez ajustada al número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* expandidos, se debe a factores ambientales y genéticos independientes al número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* expandidos.¹⁰

El número de repeticiones de CAG en los alelos *ATXN2* normales también influye sobre la edad de inicio.¹¹ Otros factores genéticos candidatos a modificadores del fenotipo son la dosis genética, polimorfismos de un solo nucleótido intragénicos, la existencia de un patrón de metilación diferencial y otros genes no alélicos o genes modificadores.¹²⁻¹⁴ Varios genes se han identificado como modificadores de la edad de inicio en la SCA2, incluyendo los genes *RAI1*,^{15,16} *ATXN3*,¹³ *ATXN7*,¹⁷ *CACNA1A*,¹⁰ *MTDN3*¹⁸ y *GSTO2*.¹⁹

En el contexto general de las enfermedades poliglutamínicas, se ha reportado la identificación de varios genes modificadores del fenotipo clínico de la enfermedad. En particular, se ha demostrado que varios genes que codifican enzimas involucradas en diversas rutas de reparación de ADN, actúan como moduladores de la edad de inicio o de la progresión de la enfermedad de Huntington^{20, 21} o de las Ataxias Espinocerebelosas tipo 1 y tipo 6.²² También se ha reportado la existencia de asociación entre genes que codifican enzimas



involucradas en diversas rutas de reparación de ADN, y la ocurrencia de inestabilidad de la secuencia repetitiva de CAG en el gen *IT15* en un modelo transgénico para la enfermedad de Huntington²³ y en el gen *ATXN3*, asociada a la anticipación de la edad de inicio observada en familias afectadas por la SCA3.²⁴

En particular, si bien se han realizado numerosas investigaciones con el fin de caracterizar la epidemiología, clínica y neurofisiología, genética, inmunología y bioquímica de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2,^{5, 25-28} aún no se han explorado las implicaciones potenciales de polimorfismos en genes de reparación de ADN sobre el fenotipo clínico de la enfermedad. En este contexto, la evaluación de los efectos modificadores de polimorfismos en genes de reparación de ADN sobre el fenotipo clínico de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2, abre la posibilidad de identificar biomarcadores moleculares útiles para el pronóstico de la progresión de la enfermedad, para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y para la evaluación de futuras alternativas terapéuticas en los pacientes afectados por la enfermedad.

OBJETIVO

Evaluar el efecto modificador potencial del polimorfismo de un solo nucleótido rs175080 en el gen *MLH3* sobre la edad de inicio de la Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos-controles y correlacional en el que se incluyeron 301 pacientes con diagnóstico clínico y molecular de SCA2, por medio de un muestreo aleatorio. Adicionalmente, fueron incluidos en el estudio 100 controles sanos, sin antecedentes patológicos personales o familiares de enfermedades neurodegenerativas, seleccionados al azar desde la población general.

Cada individuo fue interrogado en busca de síntomas de compromiso del Sistema Nervioso Central o periférico y luego se les realizó un examen neurológico según la metodología establecida por la Clínica Mayo.²⁹ El diagnóstico clínico de SCA2 se basó en la presencia de ataxia cerebelosa, disartria, dismetría, disdiadococinesia, disfagia y enlentecimiento de los movimientos oculares



sacádicos. Se estimó la edad de inicio de la enfermedad por medio de entrevistas a pacientes y familiares.

Se utilizó un protocolo de PCR de punto final estandarizado para amplificar el fragmento de ADN contentivo de la secuencia repetitiva de CAG en el gen *ATXN2*. Se determinó el número de repeticiones de CAG en el gen *ATXN2* por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en un secuenciador automático ALFexpress II (Amersham Biosciences, Suecia).¹⁹ Para el genotipaje del polimorfismo de un solo nucleótido rs175080 en el gen *MLH3*, se realizó una PCR de punto final con cuatro cebadores en un sistema de amplificación de mutaciones refractarias siguiendo procedimientos estandarizados.³⁰

Se utilizaron técnicas de estadística descriptiva e inferencial para el procesamiento de los datos primarios. Todas las pruebas de estadística inferencial fueron de dos colas y se definió el nivel de significación estadística como $p < 0,05$. Se empleó el software SPSS (versión 20,0) para todos los análisis estadísticos.³¹

El protocolo de investigación fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética para Investigaciones en Salud (CEIS) de la institución. La investigación fue llevada a cabo en correspondencia con las regulaciones establecidas en la declaración de Helsinki del 2016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Componentes de varios mecanismos de reparación de ADN han sido asociados a enfermedades causadas por la expansión de secuencias trinucleotídicas.³² En particular, varias evidencias sugieren que mecanismos de reparación del ADN tienen roles de relevancia fisiopatológica y clínica en el contexto de enfermedades poliglutamínicas.^{20-24, 33}

Entre los mecanismos de reparación de ADN que han sido asociados a enfermedades poliglutamínicas se encuentran los vinculados a la reparación de apareamientos erróneos (MMR, por sus siglas en inglés).³⁴⁻³⁶ Esta ruta de reparación de ADN tiene un papel de gran importancia en la reparación post-replicación de bases incorporadas erróneamente, que han escapado a la actividad de prueba de lectura de ADN polimerasas involucradas en la replicación



de ADN. Además de bases mal pareadas, esta ruta también corrige lazos de inserción/delección resultantes de resbalones de la polimerasa durante la replicación de secuencias repetitivas de ADN, como las secuencias repetitivas de CAG asociadas a enfermedades poliglutamínicas.^{37, 38} La ruta MMR canónica en humanos consiste en dos complejos proteicos fundamentales, MutS y MutL. Entre las enzimas que intervienen en la ruta MMR se encuentran MutSa (MSH2-MSH6), MutSβ (MSH2-MSH3), MutLa (MLH1-PMS2), MutLβ (MLH1-PMS2), MutLy (MLH1-MLH3), Exo1, y PCNA-RFC.^{38, 39}

Variantes funcionales en los genes que codifican las enzimas que intervienen en la ruta MMR han sido asociadas a varias enfermedades humanas. En particular, la variante rs175080 en el gen *MLH3*, que implica un cambio de citosina por timina en la posición 2531 del gen, lo que equivale al cambio de una prolina por una leucina a nivel de proteína, es considerada como una variante benigna aunque en algunos estudios ha sido asociada a carcinoma hepatocelular e infertilidad masculina.^{40,41} Aquí se examina el rol potencial de la variante rs175080 en la gravedad del fenotipo clínico de la SCA2.

En el presente estudio se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP *MLH3*_ rs175080, en una extensa muestra de pacientes cubanos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 y de controles sanos (Figura 1). Nunca antes se había reportado las frecuencias de este polimorfismo en Cuba.

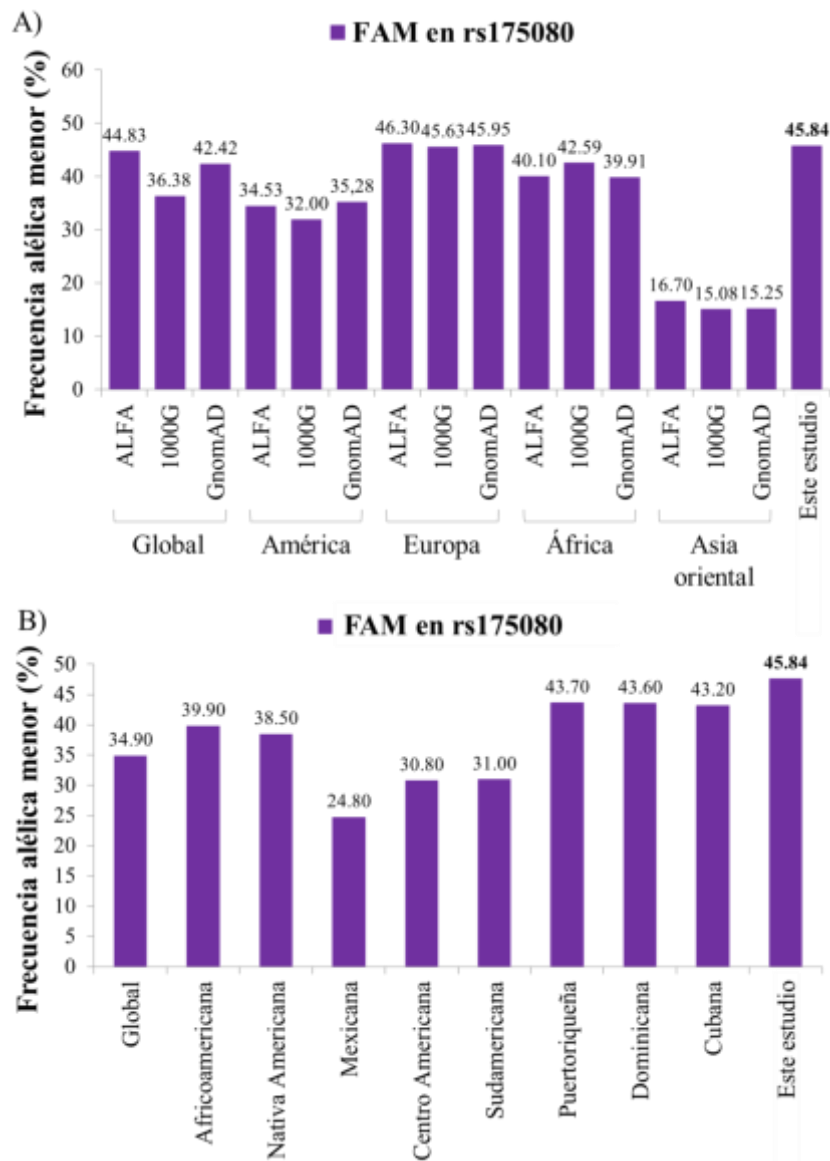


Figura 1. Frecuencia alélica menor para el SNP *MLH3_rs175080* en diferentes poblaciones del mundo y en el presente estudio. A) Frecuencia alélica menor global y por población según el Proyecto de Agregación de Frecuencias Alélicas (ALFA, por sus siglas en inglés) (Versión: 20201027095038), el Proyecto 1000Genome (Fase 3 V3+), y la Base de Datos de Agregación de Genomas (gnomAD, por sus siglas en inglés) y la establecida en el presente estudio. B) Frecuencia alélica menor global y por poblaciones del continente americano según el recurso de Arquitectura Poblacional usando Genómica y Epidemiología (PAGE, por sus siglas en inglés), y la establecida en el presente estudio.

El alelo alternativo "T" para el SNP *MLH3_rs175080* tuvo una frecuencia de 0,4584. Este resultado coincide fundamentalmente con lo reportado para



poblaciones Europeas, donde se ha demostrado que la variante alélica "T" aparece con frecuencias entre 0,4563 y 0,4630. Las más elevadas frecuencias para este alelo se han reportado justamente en poblaciones europeas, mientras que las frecuencias más bajas se han reportado en poblaciones de Asia oriental, donde alcanza valores de 0,1508 a 0,1670 (Figura 1_A). Entre las poblaciones del continente americano analizadas, las poblaciones de Puerto Rico y República Dominicana mostraron las más elevadas frecuencias para el alelo "T", además de un estimado previo de 0,4320 para la población cubana, ligeramente inferior al obtenido en el presente estudio (Figura 1_B). La población del continente americano que alcanzó la más baja frecuencia para el alelo "T" fue la mexicana, mientras que el estimado global para el continente es de 0,3490, inferior a la obtenida para la población cubana (Figura 1_B).

En la totalidad de la muestra estudiada, los genotipos "CC", "CT" y "TT" para este SNP tuvieron frecuencias de 0,2643, 0,5362 y 0,1995, respectivamente. Adicionalmente, la heterocigosidad esperada para este polimorfismo en la muestra estudiada fue del 49,79%. Estos resultados indican que la diversidad genética del SNP *MLH3*_rs175080 fue elevada en la muestra estudiada.

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP rs175080 en pacientes y controles se muestra en la tabla 1. Tanto el grupo de pacientes SCA2 ($p=0,2481$) como el grupo control ($p=0,4187$) estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. No hubo diferencias significativas entre pacientes y controles en cuanto a la distribución de las variantes alélicas o genotípicas para el SNP rs175080 (Tabla 1).

En el grupo de pacientes SCA2 se obtuvo una correlación inversa y altamente significativa entre el número de repeticiones de CAG en alelos *ATXN2* expandidos y la edad de inicio de la enfermedad ($r=-0,592$; $p<0,001$). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas para la edad de inicio de la enfermedad atendiendo a los diferentes genotipos según los modelos aditivo ($F=0,396$; $p=0,673$), dominante ($t=0,643$; $p=0,521$) o recesivo ($t=0,936$; $p=0,351$). Estos



resultados sugieren que el gen *MLH3* no es de relevancia clínica en el contexto de la SCA2.

Tabla 1. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP rs175080 en el gen *MLH3* en pacientes y controles

Gen	Polimorfismo	Alelos/ Genotipos	Pacientes SCA2 (n=301)		Controles (n=100)		p	RP (IC 95%)	
			n	%	n	%			
<i>MLH3</i>	C2531T (rs175080)	C	315	0,52	112	0,56	0,369	1,16 (0,84-1,60)	
		T	287	0,48	88	0,44			
		CC	77	25,58	29	29,00	0,686	1 (Ref.) 1,12 (0,66-1,90)	
		CT	161	53,49	54	54,00			
		TT	63	20,93	17	17,00			0,393
			CT+TT	224	74,42	71	71,00	0,514	1,19 (0,72-1,97)
			CC+CT	238	79,07	81	81,00	0,472	1,26 (0,70-2,28)

Los resultados obtenidos podrían estar limitados por la ocurrencia de estratificación poblacional con implicaciones para la distribución diferencial de las variantes alélicas estudiadas en las familias de pacientes SCA2 incluidas en el estudio.

CONCLUSIONES

El polimorfismo de un solo nucleótido rs175080 en el gen *MLH3* no actúa como modificador de la edad de inicio en pacientes cubanos con Ataxia Espinocerebelosa tipo 2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Matilla-Dueñas A, Ashizawa T, Brice A, Magri S, McFarland KN, Pandolfo M, et al. Pathological mechanisms underlying neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum* 2013a; 13(2):269-302.



2. Rüb U, Schöls L, Paulson H, Auburger G, et al. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol.* 2013; 104:38-66.
3. Corral-Juan M, Corral J, San Nicolás H, Volpini V, Matilla-Dueñas A. Genetics of the Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxias. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2011.
4. Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol.* 2010; 9(9):885-94.
5. Velázquez-Pérez L, Sánchez-Cruz G, Santos-Falcón N, Almaguer-Mederos LE, Escalona-Batallan K, Rodríguez-Labrada R, et al. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: Insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neurosc Lett.* 2009; 454: 157-160.
6. Netravathi M, Pal PK, Purushottam M, Thennarasu K, Mukherjee M, Jain S. Spinocerebellar ataxias types 1, 2 and 3: Age adjusted clinical severity of disease at presentation correlates with size of CAG repeat lengths. *J Neurol Sci.* 2009; 277(1-2):83-6.
7. Seifried C, Velázquez-Pérez L, Santos-Falcón N, Abele M, Ziemann U, et al. Saccade velocity as a surrogate disease marker in spinocerebellar ataxia type 2. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1039: 524-7.
8. Almaguer-Mederos LE, NS Falcon, YR Almira, YG Zaldivar, DC Almarales, EM Góngora, et al. Estimation of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 2 Cuban patients by survival analysis. *Clin Genet.* 2010; 78:169-174.
9. Tezenas DMS, Durr A, Rakowicz M, Nanetti L, Charles P, Sulek A, et al. Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6. *J Med Genet.* 2014a; 51(7):479-86.
10. Pulst SM, Santos N, Wang D, Yang H, Huynh D, Velásquez L, Figueroa KP. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain* 2005; 128:2297-2303.
11. Almaguer-Mederos LE, Aguilera-Rodríguez R, Cuello-Almarales D, Almaguer-Gotay D, González-Zaldívar Y, Vázquez-Mojena Y, et al. Normal ATXN2 allele's influences on the age at onset in Spinocerebellar Ataxia type 2. *Mov Dis.* 2017a; 32(9):1329-1330.



12. Bauer PO, Zumrova A, Matoska V, Mitsui K, Goetza P. Can ataxin-2 be down regulated by allele-specific de novo DNA methylation in SCA2 patients? *Med Hypoth.* 2004; 63: 1018-1023.
13. de Castillos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, et al. Spinocerebellar Ataxias in Brazil- frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum* 2014; 13: 17-28.
14. Pereira FS, Monte TL, Locks-Coelho LD, Silva ASP, Barsottini O, Pedrosa JL, et al. ATXN3, ATXN7, CACNA1A, and RAI1 genes and mitochondrial polymorphism A10398G did not modify age at onset in Spinocerebellar Ataxia type 2 patients from South America. *Cerebellum* 2015; 14: 728-730.
15. Chattopadhyay B, Ghosh S, Gangopadhyay PK, Das SK, Roy T, Sinha KK, et al. Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett.* 2003; 17; 345(2):93-6.
16. Hayes S, Turecki G, Brisebois K, Lopes- Cendes I, Gaspar C, et al. CAG repeat in RAI1 is associated with age at onset variability in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Hum Mol Genet.* 2000; 9 (12): 1753-58.
17. Tezenas DMS, Durr A, Bauer P, Figueroa KP, Ichikawa Y, Brussino A, et al. Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain* 2014b; 137: 2444-55.
18. Simon DK, Zheng K, Velásquez L, Santos N, Almaguer L, Figueroa K, Pulst SM. Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol.* 2007; 64 (7): 1042-44.
19. Almaguer-Mederos LE, Almaguer-Gotay D, Aguilera-Rodríguez R, et al. Association of glutathione S-transferase omega polymorphism and spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurol Sci* 2017b; 372: 324-328.
20. Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium. Identification of genetic factors that modify clinical onset of Huntington's disease. *Cell* 2015; 162(3): 516-526.
21. Hensman-Moss D, Pardiñas AF, Langbehn D, Lo K, Leavitt BR, Roos R, et al. Identification of genetic variants associated with Huntington's disease progression: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.* 2017; S1474-4422(17); 30161-8.



22. Bettencourt C, Hensman-Moss D, Flower M, Wiethoff S, Brice A, Goizet C, et al. DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Ann Neurol* 2016; 79:983-990.
23. Tomé S, Manley K, Simard JP, Clark GW, Slean MM, Swami M, et al. MSH3 polymorphisms and protein levels affect CAG repeat instability in Huntington's disease mice. *PLoS Genet* 2013; 9(2): e1003280.
24. Martins S, Pearson CE, Coutinho P, Provost S, Amorim A, Dubé MP, et al. Modifiers of (CAG) n instability in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) transmissions: an association study with DNA replication, repair and recombination genes. *Hum Genet.* 2014; 133:1311-1318.
25. Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, Canales-Ochoa N, Medrano Montero J, Sánchez-Cruz G, Aguilera-Rodríguez R, et al. Progression of early features of spinocerebellar ataxia type 2 in individuals at risk: a longitudinal study. *Lancet Neurology* 2014; S1474-4422(14): 70027-4.
26. Almaguer-Gotay D, Almaguer-Mederos LE, Aguilera-Rodríguez R, Rodríguez-Labrada R, Cuello-Almarales D, Estupiñán-Domínguez A, et al. Spinocerebellar Ataxia type 2 is associated with the extracellular loss of superoxide dismutase but not catalase activity. *Front Neurol.* 2017; 8:276.
27. Almaguer-Mederos LE, Almira YR, Góngora EM, Gotay DA, Zaldivar YG, Pupo RE, et al. Antigliadin antibodies in Cuban patients with spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 315-317.
28. Almaguer-Mederos LE, Mesa JML, González-Zaldívar Y, Almaguer-Gotay D, Cuello-Almarales D, Aguilera-Rodríguez R, et al. Factors associated with ATXN2 CAG/CAA repeat intergenerational instability in Spinocerebellar Ataxia type 2. *Clin Genet.* 2018; 1-5.
29. Ropper AH, Brown RH. Principles of neurology. 10th edition. McGraw-Hill, Inc., New York; 2010.
30. Pashaiefar H, Sheikha MH, Kalantar SM, Jahaninejad T, Zaimy MA, Ghasemi N. Analysis of MLH3 C2531T polymorphism in Iranian women with unexplained infertility. *Iran J Reprod Med* 2013; 11(1): 19-24.
31. IBM Corporation 2011. SPSS (data analysis software system), version 20.
32. Jones L, Houlden H, Tabrizi SJ. DNA repair in the trinucleotide repeat disorders. *Lancet Neurol.* 2017; 16(1):88-96.



33. Massey TH, Jones L. The central role of DNA damage and repair in CAG repeat diseases. *Dis Model Mech.* 2018; 11(1).
34. Flower M, Lomeikaite V, Ciosi M, Cumming S, Morales F, Lo K et al. MSH3 modifies somatic instability and disease severity in Huntington's and myotonic dystrophy type 1. *Brain* 2019; 142:1876-1886.
35. Pinto RM, Dragileva E, Kirby A, Lloret A, Lopez E, Claire JS, et al. Mismatch Repair Genes Mlh1 and Mlh3 Modify CAG Instability in Huntington's Disease Mice: Genome-Wide and Candidate Approaches. *PLoS Genet.* 2013; 9(10):e1003930.
36. Lee JM, Chao MJ, Harold D, Elneel KA. A modifier of Huntington's disease onset at the MLH1 locus. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(19):3859-3867.
37. Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst).* 2013; 12(8):620-36.
38. Bauer N, Corbett A, Doetsch P. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(21):10083-10101.
39. Chatterjee N, Walker G. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017; 58(5):235-263.
40. Liu Y, Zhang X, Jia J, Tang L, Gao X, Yan L, et al. Correlation between polymorphisms in DNA mismatch repair genes and the risk of primary hepatocellular carcinoma for the Han population in northern China. *Scand J Gastroenterol.* 2015; 50(11):1404-10.
41. Zhang X, Ding M, Ding X, Li T, Chen H. Six polymorphisms in genes involved in DNA double-strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Syst Biol Reprod Med.* 2015; 61(4):187-93.