



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Postgrado

**“Reporte de una familia Mexicana con Distrofia Miotónica Tipo 1.
Ausencia de correlación entre el largo del repetido CTG y la gravedad
de la enfermedad”**

**TESIS DE POSTGRADO
que para obtener el diploma de
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA
MÉDICA PRESENTA:
ALEJANDRA CAMACHO MOLINA**

**JEFA DE SERVICIO: DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN
ASESORES DE TESIS: DR. SERGIO A. CUEVAS COVARRUBIAS
DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA**

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
ASESORE DE TESIS

DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA
MÉDICA ADSCRITA AL SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
ASESORA DE TESIS

**“Reporte de una familia Mestiza Mexicana con Distrofia Miotónica Tipo 1.
No correlación entre el largo del repetido CTG y la severidad de la
enfermedad”**

PRESENTA:

ALEJANDRA CAMACHO MOLINA*

TUTORES:

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS

DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA

COLABORADOR:

M. en C. LUZ MARIA GONZALEZ HUERTA

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Genética Médica, Hospital General de México.

México, D.F.

Agosto 2007

*“We shall soon be far away from you, but then you world never know it.
You don’t need anybody, inhuman that you are. How strange it is that
we can not do without you”*

K. Johnson (1905)

I. AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma de México que por segunda ocasión permitió mi preparación y me ofreció su regazo.

Al Hospital General de México y a cada uno de los que forman parte de él por brindarme los conocimientos que redundarán en beneficio de los pacientes a los que me enfrente en un futuro.

Y finalmente a mi familia que ha sido pilar de mi preparación profesional, sin cada uno de ellos apoyándome, este logro no estaría aquí.

INDICE

I.	AGRADECIMIENTOS.....	5
II.	SIGLAS Y ABREVIATURAS	7
III.	RESUMEN.....	8
IV.	ANTECEDENTES	9
1.	INCIDENCIA Y PREVALENCIA	9
2.	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	10
3.	GENÉTICA DE LA DMI	14
A.	<i>Anticipación</i>	15
B.	<i>La Mutación de DMI</i>	15
C.	<i>El gen DMPK</i>	16
D.	<i>Genotipo y Fenotipo</i>	19
E.	<i>Diagnóstico</i>	21
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:.....	23
VI.	OBJETIVO GENERAL:.....	23
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES:	23
VIII.	HIPÓTESIS:.....	24
IX.	DISEÑO DEL ESTUDIO	24
X.	MATERIALES Y MÉTODOS:	25
1.	POBLACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO:	25
A.	<i>Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos (Fig 1):.....</i>	25
B.	<i>Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos (Fig 1):.....</i>	25
2.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO	26
A.	<i>Obtención de las muestras</i>	26
B.	<i>Tipificación del número de repetidos del trinucleótido CTG</i>	27
C.	<i>Tipificación del número de repetidos del trinucleótido CTG por el kit GLDM PCRProber™</i>	31
XI.	RESULTADOS.....	36
XII.	DISCUSION.	40
XIII.	APÉNDICE.....	45
1.	REGISTRO CLÍNICO MUSCULAR CARDIFF PARA Distrofia Miotónica	45
2.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	48
3.	SECUENCIA DEL GEN DMPK.....	49
XIV.	GLOSARIO	50
XV.	REFERENCIAS	52

I. Siglas y Abreviaturas

A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleíco
ARN	Ácido Ribonucleíco
ARNm	Ácido Ribonucleíco mensajero
C	Citosina
Ig	Inmunoglobulina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
DM1	Distrofia Miotónica Tipo1
<i>DMPK</i>	Gen de la Proteína Cinasa de la Distrofia Miotónica
G	Guanina
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (polimerase chain reaction)
T	Timina
TTS	Tris-Triton-Sacarosa
3' UTR	Región 3' No Traducida

II. Resumen

La Distrofia Miotónica Tipo 1 (DM1) es la más común de las distrofias musculares del adulto, con una prevalencia clínica de 5.5 por 100, 000 habitantes. Se trata de una enfermedad autosómica dominante que presenta el fenómeno de anticipación y expresividad variable; existiendo una forma congénita de pronóstico grave. El defecto génico de la DM es la mutación que consiste en la expansión del repetido trinucleótido CTG en la región 3' no traducida (UTR) del gen de la Proteína Cinasa de la Distrofia Miotónica (*DMPK*), localizado en el cromosoma 19q13.3. El repetido CTG está presente de 5-30 veces en la población normal, mientras que los pacientes tienen repetidos de 50 a varios miles. Se ha documentado que la edad de presentación de la enfermedad y la gravedad del fenotipo están relacionadas con el tamaño de la expansión del repetido inestable CTG. En el presente estudio se describen tres generaciones en una familia Mexicana con DM1 analizada clínicamente y molecularmente. La familia incluyó 15 individuos siendo estudiados 7 de ellos; 3 con DM y 4 clínicamente sanos. Para el análisis molecular se utilizó PCR para amplificaciones menores de 200 pares de bases, aquellos alelos con más pares de bases se analizaron con GLDM PCRProber™. Se observó poca relación entre el número de repetidos y las manifestaciones clínicas. Un paciente con 1000 repetidos manifestó más tempranamente la enfermedad, mientras que otro con el mismo número de repetidos no presentaba evidencia de la enfermedad. La familia mostrada en este estudio parece encontrarse dentro de lo previamente señalado en la literatura, en cuanto a que el tamaño del repetido no correlaciona con las manifestaciones clínicas; sin embargo, esta familia parece encontrarse dentro de las excepciones, haciendo referencia a un alto número de repetidos y ninguna prueba clínica de padecer la enfermedad.

IV. ANTECEDENTES

La Distrofia Miotónica (DM1) es un desorden multisistémico autosómico dominante y al parecer la forma más común de distrofia muscular en el adulto^{1, 2, 3, 4, 5}, la primera descripción clínica de esta patología fue hecha por Steinert en 1909⁶ quien la describió con miotonía, debilidad muscular, cataratas y defectos cardíacos^{1, 7, 8, 9}; 30 años después Thomsen describió la forma congénita que en el neonato se presenta con diplegia facial, hipotonía, distress respiratorio y pie equino-varo.¹⁰

Al tratarse de un padecimiento autosómico dominante la DM1 fue estudiada por análisis de ligamiento en 1972 convirtiéndose en una de las primeras enfermedades evaluada por este método. Los primeros *loci* asociados a este desorden fueron los grupos sanguíneos Lewis y Lutheran.^{6, 11} Ulterior a estos hallazgos en los 80's se describieron como marcadores de la DM1 a los *loci* de la apolipoproteína CII (Apo CII, LDR 152 y p4,1)⁸; sin embargo, no fue hasta 1992 que se encontró el defecto molecular específico para esta patología.^{12, 13, 14, 15, 16} Demostrándose que este defecto molecular es la expansión de un repetido trinucleótido en el extremo 3' UTR del gen *DMPK* localizado en el cromosoma 19q13.3

1. Incidencia y Prevalencia

La Distrofia Miotónica (DM1, OMIM 160900) o enfermedad de Steinert es la forma más común de enfermedad muscular con un patrón de herencia definido. Los datos epidemiológicos de la enfermedad varían grandemente entre regiones y grupos étnicos. Inicialmente se consideraba una prevalencia estimada de 2.4 a 5.5 por 100, 000 en Europa Occidental y 5.5 por 100, 000 en población Japonesa.^{10, 17, 18, 19} Sin embargo, desde 1990 se considera que puede alcanzar una prevalencia entre 7 y 189 por 100, 000 habitantes^{18, 20, 21, 22} La DM1 tiene un rango de prevalencia muy amplio (cuadro 1). La interpretación de estos datos requiere una precaución considerable dado que numerosos elementos pueden afectar la aparente prevalencia y la verdadera frecuencia de

la enfermedad, entre ellos se encuentran los efectos importantes que tiene la estructura de la población como son: factores aleatorios en poblaciones pequeñas, rápida expansión de la población y el efecto fundador¹

Cuadro 1. Estudios de Prevalencia en DM1. Modificado de Harper⁶

<i>Ciudad</i>	<i>Región</i>	<i>Provincia</i>	<i>Prevalencia (X 100, 000)</i>	<i>Casos</i>	<i>Población Total</i>	<i>Fuente</i>
Europa						
Reino U.	N. Irlanda		2.4	33	1.37X10 ⁶	Lynas ⁶
	Gales	Sur	7.1		9.4X10 ³	MacMillan et al ⁶
España	Mallorca		11	60	5.5X10 ⁵	Burcet et al ⁶
	Guipúzcoa	Basque	26.5	183	6.9X10 ⁵	López et al ⁶
Italia	Turín		2.1	24	1.16X10 ⁶	Pinessi et al ⁶
	Venice		2.68		4.1X10 ⁶	Mostacciulo et al ⁶
	Veneto	Padova	7.24	61	8.4X10 ⁴	Siciliano et al ¹⁹
	Tuscania	Livorno	15.49	52	3.3X10 ⁶	Siciliano et al ¹⁹
		Lucca	5.32	20	3.7X10 ⁴	Siciliano et al ¹⁹
		Massa C	6.49	13	2X10 ⁵	Siciliano et al ¹⁹
		Pisa	13.76	53	3.8X10 ⁴	Siciliano et al ¹⁹
Alemania		Occidente	5.5		54.6X10 ⁶	Grima et al ⁶
Suecia	Norbottens		36.5	95	2.6X10 ⁵	Rolander et al ⁶
Suiza			4.9	229	4.6X10 ⁶	Klein ⁶
Croatia	Istria		18.1	33		Medica et al ^{6,4}
Origen						
Europeo						
E.U.A.	Rochester		3.3	1	3X10 ⁴	Kurland ⁶
Canadá	Saguenay	Oriente	189		3X10 ⁵	Mathieu et al ⁶
África	Tranvaal	Sur	14.3			Lotz et al ⁶
Origen No						
Europeo						
Japón	San-In		2.7		1.4X10 ⁶	Takeshita et al ⁶

2. Manifestaciones Clínicas

La DM1 es un trastorno muy variable. Las manifestaciones neuromusculares son las más comunes, principalmente la miotonía (Figura 1), debilidad muscular y disminución de la fuerza^{6, 23} En su forma más grave se presenta desde el nacimiento con hipotonía extrema, artrogriposis, dificultad

para succionar, distress respiratorio, pie equinovaro, retraso mental y atrofia cortical generalizada, no observándose la clásica miotonía. En estos casos generalmente ocurre polihidramnios con parto prematuro^{6, 18, 24, 25, 26, 27, 28}

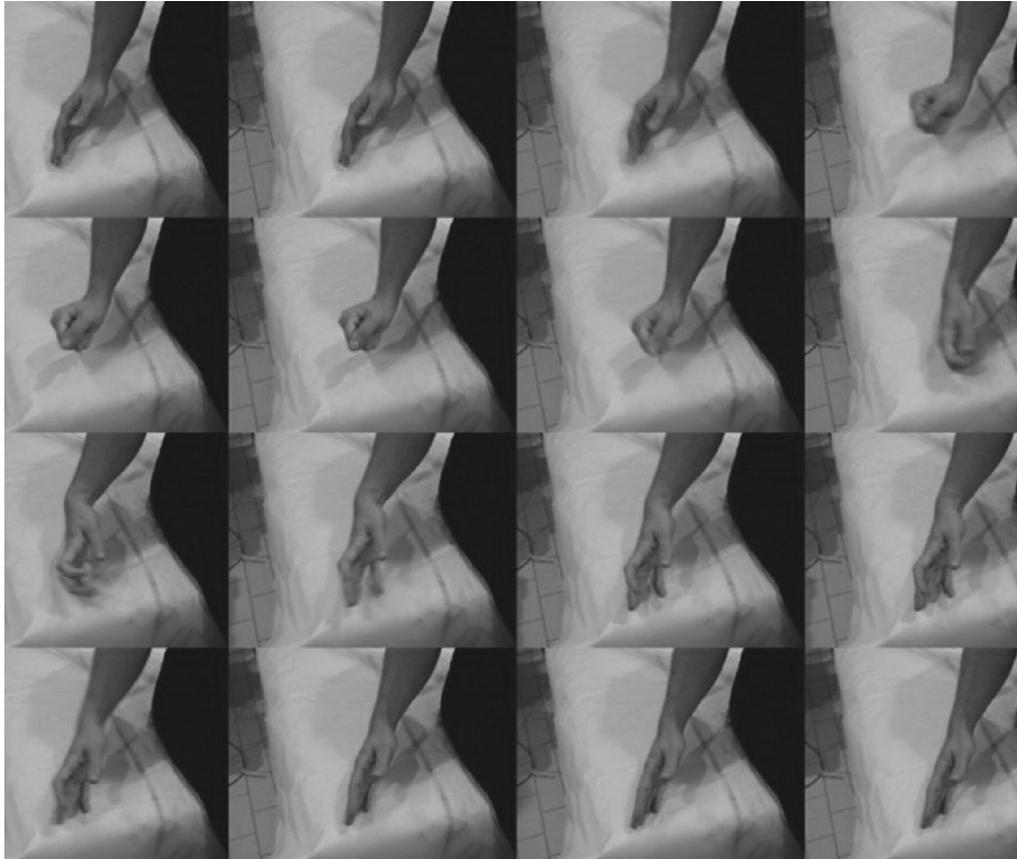


Figura 1. Miotonía espontánea de la mano, la relajación retrasada. Disminuye al repetir el ejercicio muscular. Modificado de Bouhour 2007²⁸

No obstante, la presentación más común de la DM1 es la forma clásica y generalmente se presenta en adultos jóvenes. Algunos individuos afectados no desarrollan alteraciones reconocibles y otros presentan manifestaciones evidentes. Las características degenerativas de la enfermedad ocurren en todos los adultos al paso del tiempo, pero pueden progresar de manera diferente; algunos individuos sucumben a la enfermedad en algunos años, generalmente por falla cardíaca, y otros se mantienen estáticos por décadas.²⁶ Los pacientes presentan debilidad facial, ptosis, debilidad de los músculos temporales, atrofia de los músculos mandibulares, calvicie frontal temprana en

hombres, disartria, voz hipernasal y miotonía que con frecuencia es el primer síntoma. La miotonía es un estado de contracción prolongado y puede llegar a ser explorada percutiendo la región tenar y los músculos de la lengua, si bien estas maniobras pueden generar dolor a los pacientes. La debilidad muscular y la pérdida de fuerza afectan primero al esternocleidomastoideo y a la musculatura distal de las extremidades; posteriormente se presenta en los músculos proximales, tales como el tríceps y los dorsiflexores del tobillo. La debilidad es lentamente progresiva e individual por lo que el pronóstico es difícil de predecir.²⁷

Síntomas no Neuromusculares:

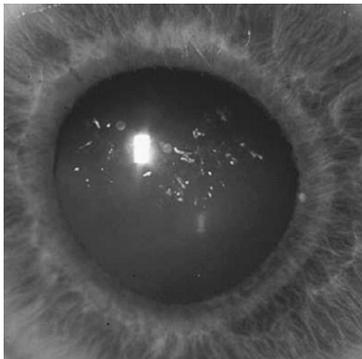
Sistema Nervioso Central y Periférico: Es común la hipersomnolencia durante el día y esto no correlaciona con la severidad de los síntomas musculares.²⁷ También puede presentarse hipersomnolencia por hipoventilación nocturna. La etiología de hipersomnolencia puede ser multifactorial y se ha hipotetizado que puede ocurrir por disfunción central de la regulación del sueño, apnea del sueño obstructiva y apnea del sueño central.²¹ Puede observarse hiperhidrosis que se desconoce si es de origen central o periférica así como pérdida sensorial menor. De igual manera se ha reportado cambios de la personalidad, depresión y disfunción cognoscitiva. Los estudios de resonancia magnética indican lesiones hiperintensas en la materia blanca y atrofia generalizada cortico-sub-cortical frecuentemente encontradas en los cerebros de las pacientes con DM1.^{28, 29, 30}

Síntomas Gastrointestinales: Puede presentarse vaciamiento gástrico retardado, gastroparesia, disfunción de esfínteres y musculatura lisa, disfagia, reflujo gastroesofágico, mala absorción de ácidos biliares y sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado.^{7, 27, 28, 18}

Complicaciones Endocrinas: Incluye diabetes mellitus, la cual se presenta con una incidencia de hasta cuatro veces mayor que en la población general.^{23, 27} Resistencia a la insulina.²⁶ Atrofia testicular con degeneración de túbulos seminíferos, resultando disminución en la espermatogénesis y por lo tanto subfertilidad en los hombres.²⁷ Algunos autores han reportado impotencia.^{7, 18}

Manifestaciones Cardíacas y Respiratorias: En el 10-30% de los pacientes ocurre muerte súbita por falla cardíaca. La gravedad de las complicaciones cardíacas no correlacionan con la debilidad muscular.²⁷ El 80% de los

pacientes presentan manifestaciones cardíacas clínicas o subclínicas que pueden ocurrir en cualquier momento de la enfermedad. Los síntomas incluyen taquipnea, mareos, palpitaciones y pérdida de la conciencia súbita. El sistema de conducción cardíaco es el primero en afectarse, aunque cualquier componente de este sistema puede ser afectado, el sistema de His-Purkinje es el más afectado. También se observan bradiarritmias y bloqueo atrioventricular de cualquier grado.¹⁸ Cabe mencionar que en un estudio realizado en Limburgia las arritmias cardíacas fueron la segunda causa de muerte en personas afectadas con DM1^{20,26} El 5% de los pacientes pueden requerir marcapasos²⁷ La debilidad muscular y la deficiencia para manejar el centro respiratorio contribuye a hipoventilación alveolar y a cefalalgia matutina por la insuficiencia respiratoria acontecida durante la noche. No es raro que se presenten neumonías recurrentes relacionadas con aspiración de fluidos o alimento, incluyendo saliva o retención de moco en la vía aérea. La neumonía puede llevar a insuficiencia respiratoria subaguda y es la causa de muerte en 30% de los casos, siendo esta la primera causa de muerte en Limburgia.^{20, 18} Los pacientes con DM1 tienen un riesgo mayor de complicaciones en los procedimientos de anestesia, tales como hipotensión, aspiración pulmonar y depresión respiratoria.²⁷



Oftalmológicas: En 1911, solo dos años después de reconocer la distrofia miotónica como un desorden específico Greenfield notó la ocurrencia de cataratas en generaciones anteriores de familias con DM1. Fleischer en 1918 demostró la presencia de cataratas sin manifestaciones musculares en individuos—descendientes de pacientes con DM1³¹ Estas cataratas presentan un patrón inusual, son indistinguibles, iridiscentes y a la exploración con la lámpara de hendidura se observan como opacidades subcapsulares posteriores multi-coloreadas.^{26, 18}

También se puede presentar DM1 juvenil manifestada por problemas menos graves en el desarrollo que los observados en la DM congénita; requiere atención durante la infancia y presenta déficit cognoscitivo, problemas

de aprendizaje y se encuentra entre la DM congénita y la DM1 del adulto joven. La miotonía y la debilidad muscular se presentan en la adolescencia, las anomalías en el electrocardiograma son frecuentes y la muerte súbita es rara antes de los 16 años.^{26, 27}

3. Genética de la DM1

La DM1 fue una de las primeras enfermedades autosómicas en la cual un elemento genético fue identificado como causa del padecimiento. El análisis de ligamiento de familias con DM1, mapeo la región responsable de la DM1 en el cromosoma 19q13.2-13.3. En 1992, la mutación responsable de la DM1 fue identificada como una alteración dentro del marco de lectura abierto del gen *DMPK*, que consiste en una expansión de repetidos de trinucleótidos inestables (CTG) en la secuencia de la región no traducida 3' (3' UTR). Se cree que este repetido es el responsable del 98% de los casos de DM1.^{23, 32}

En 1918 se propone que este padecimiento sigue un patrón de herencia autosómica dominante, lo que fue confirmado con estudios más sistemáticos en 1948.^{6, 31}

Estudios de análisis de segregación en familias con DM1 demostraron que la proporción de descendientes afectados variaba entre 33.6% y 50.7%, sugiriendo el patrón de herencia autosómica. La proporción de arriba del 16% de portadores del gen afectados no detectados planteaba la idea de que podía tratarse de una segregación diferente.

Desde la identificación del repetido CTG en el *locus* de la DM1 una serie de estudios han examinado la segregación del alelo anormal. Estudios previos reportan que los repetidos son transmitidos preferencialmente a través de la rama materna.

Así, finalmente la conclusión es que se trata de un desorden autosómico dominante en el que puede haber una transmisión preferencial (por rama materna) del alelo con más número de repetidos, sin embargo se necesitan más datos para confirmarlo.

A. Anticipación

Anticipación es el término para definir al evento que sucede a una edad de presentación más temprana en las generaciones sucesivas.³¹ La anticipación tiene un lugar muy especial en la genética de la DM1. No tan sólo por que éste fue el primer desorden en el cual esto fue demostrado sobre la base de la evidencia clínica, también por que había sido el más claro ejemplo de este fenómeno. Ahora la anticipación es reconocida como un indicador de los padecimientos por amplificación de tripletes.⁶

La anticipación fue propuesta por primera vez en 1918 y cuestionada en 1948, para entonces todas las bases para explicar la extrema anticipación observada en la DM1 habían sido inadecuadas. El descubrimiento de una expansión inestable de un repetido trinucleótido proveía una explicación inmediata al proceso de anticipación.⁶

B. La Mutación de DM1

La mutación de DM1 es la expansión de un repetido CTG que normalmente esta presente en la región 3' no traducida del gen *DMPK* en el cromosoma 19q13.3. Este repetido es altamente polimórfico en la población general. Individuos sanos tienen alelos entre 5 y 35 repetidos, dentro de este rango los alelos se heredan de manera estable^{10, 33} Cuando los repetidos exceden de 50 CTGs, el alelo se hace inestable y conduce a enfermedad. Los alelos en el rango entre 35 a 49 repetidos han sido muchas veces corroborados por un descendiente sintomático, quien tiene un repetido mayor de 50. Por lo que los alelos entre 35 a 49 repetidos son considerados como premutaciones. El Consorcio Internacional para la Distrofia Niotónica propuso en el año 2000 que el análisis del ADN basado en el número de repetidos debería ser usado para diagnóstico de DM1.^{6, 33, 34}

C. El gen *DMPK*

DMPK es expresado en una gran variedad de tejidos pero se encuentra predominantemente en corazón, cerebro, músculo y ojo. *DMPK* esta compuesto por 15 exones, abarca 15 kb de ADN genómico (Figura 2) y codifica para una proteína de 629 amino ácidos la cual comparte regiones de homología con la ciclina monofostfato de adenosina (AMP) dependiente de cinasas. A la *DMPK* la han caracterizado como una cinasa de serina/tronina con un dominio catalítico de aproximadamente 43 kDa, seguida de una región helicoidal de aproximadamente 12 kDa y una región hidrofóbica que se piensa actua como dominio transmenbrana al C-terminal.²³

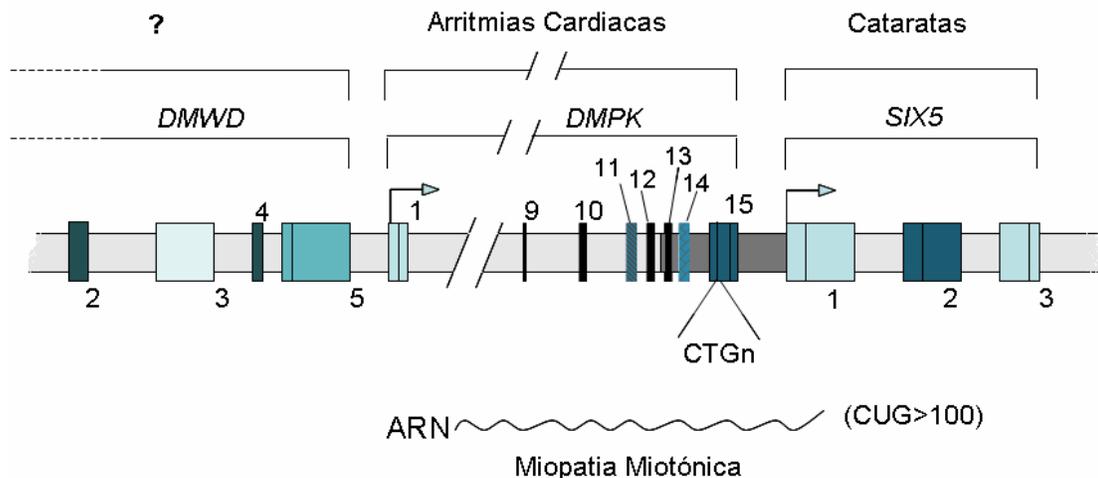


Figura 2. Representación del gen *DMPK*. Se puede observar el repetido trinucleótido CTG, el cual se encuentra en la región 3'UTR del gen y como consecuencia un ARNm más grande. 500 pb río arriba se encuentra el gen *DMWD*, *SIX5* localizado río abajo y su expresión solo es detectable en el cristalino. Modificado de Tapscott 2000.³⁵

Se han propuesto tres distintas hipótesis para explicar el mecanismo molecular que genera el daño a múltiples sistemas celulares en la DM1. Dado que la expansión del trinucleótido se encuentra en la región no traducida del gen parecería que el defecto no tendría ninguna consecuencia sobre la función normal de la proteína.³⁵ Al parecer lo más probable es que la expansión afecta la expresión génica dentro de este *locus* a nivel transcripcional y post-transcripcional.^{36, 57}

La primera hipótesis postula que el repetido expandido en el transcrito del *DMPK* (presente con el repetido CUG en el ARN, Figura 2) altera el procesamiento del ARN del *DMPK*, resultando en una deficiencia de la proteína (haploinsuficiencia). Sin embargo, que la haploinsuficiencia sea suficiente para causar DM1 es cuestionable ya que ni ratones heterocigotos ni homocigotos (Knockout) para este gen demuestran un fenotipo profundo, solamente demuestra miopatía a una edad tardía y anomalías de la conducción sin otras características multisistémicas observadas en la DM1.^{3, 35, 37, 23, 26} Estos resultados proveen evidencia de que la haploinsuficiencia contribuye al fenotipo de la DM1, pero no es suficiente para que se manifieste completamente la enfermedad. La inactivación de *DMPK per se* no puede ser la responsable del desarrollo de DM1.²³

En la segunda hipótesis, conocida como “efecto de campo” (del inglés field effect) propone que la expansión del repetido CTG en el gen *DMPK* altera la estructura de la cromatina, resultando en una expresión alterada de genes vecinos. Frecuentemente el fenotipo de las expansiones de trinucleótidos se aproxima a la cantidad del ADN encontrado en un nucleosoma (146 pb), por lo que se propone que el ADN que contiene grandes expansiones de trinucleótidos podría formar nucleosomas estables que repriman la transcripción.³⁸ Otra propuesta señala que la estructura alterada de la cromatina inducida por la expansión del repetido puede afectar la transcripción, posiblemente por excluir la interacción de factores de transcripción con regiones regulatorias adyacentes del ADN o por impedir la acción de la ARN polimerasa.^{3, 35, 37, 39} Así una de las posibilidades es que la expansión del repetido afecte directamente sobre la transcripción de *DMPK* y genes vecinos. Se han descrito 6 genes adyacentes al gen *DMPK*: *DMWD*, *SIX5*, *SYMPLEKIN*, *20-D7*, *GIPR* y *RSHL1*. *SIX5* localizado río arriba de *DMPK* ha sido implicado en la regulación de la diferenciación de células musculares y en la homeostasis del sodio, ambos afectados en la DM1. Por otro lado, la formación de cataratas en los ratones con uno o dos alelos defectuosos de *Six5* sugiere que las cataratas en humanos afectados con DM1 podrían ser el resultado de la expresión disminuida de *SIX5*.^{35, 26, 35, 40, 41} El gen *DMWD*, río arriba de *DMPK*, es regulado negativamente por la expansión del repetido CTG, al parecer la

proteína codificada por este gen cuenta con un motivo presente en las proteínas encargadas de la división celular, transcripción, procesamiento de ARNm y transducción de señales. *DMWD* se expresa en cerebro y testículos, órganos afectados en la DM1; por lo que también es un gen propuesto para explicar la fisiopatología de DM1.⁴⁰

La tercera hipótesis argumenta que el repetido CUG en el ARNm *DMPK* interactúa con proteínas de unión a ARN bloqueando su actividad, una ganancia de función tóxica, la cual provoca alteraciones en el metabolismo celular.^{3, 35, 42} El mecanismo por el cual el transcrito con la expansión CUG induce miotonía y degeneración muscular aún no está claro. Diferentes modelos han servido para proponer que este ARN con la expansión CUG interfiere con la poliadenilación, con procesos de corte y empalme, secuestrando proteínas de unión a CUG o interaccionando con proteínas de unión a doble cadena de ARN.^{43, 44, 45} Los efectos deletéreos del repetido CUG crean un depósito nuclear en fibroblastos y mioblastos. Recientemente se describió que una expansión de repetidos CTG's está asociada con un padecimiento autosómico dominante caracterizado por degeneración de las células del cerebelo.^{37, 46, 47}

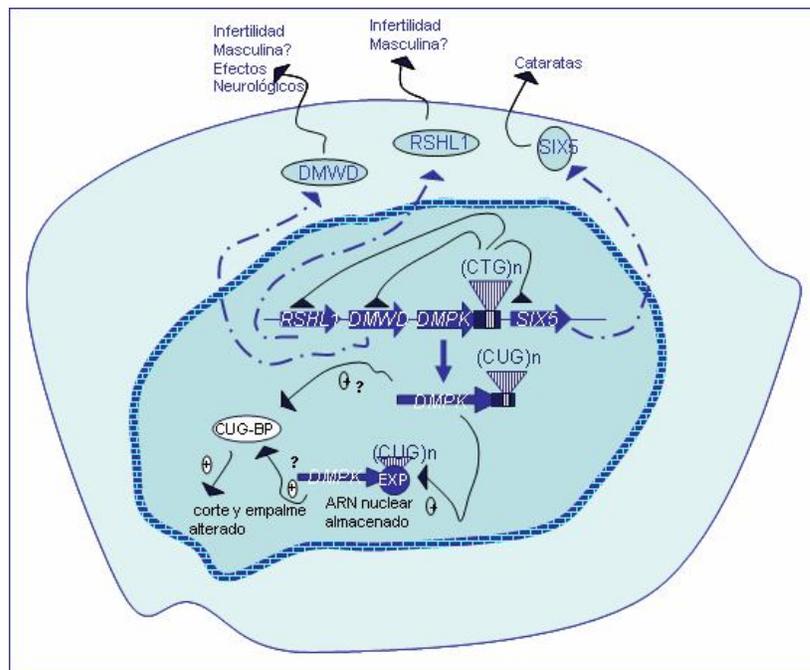


Fig 3. Patogénesis molecular en DM1. Representación posible del camino Patogénico en DM1. Los caminos normales que son perturbados se muestran en líneas discontinuas, las ganancias de función (+) y lo que no se sabe con ?. Modificado de Harper⁴⁰

D. Genotipo y Fenotipo

El repetido trinucleótido inestable en DM1 es variable dentro de las familias; inicialmente se asoció el número de repetidos con la gravedad del padecimiento. Desde estas primeras observaciones numerosos investigadores han explorado la relación entre el genotipo y fenotipo correlacionándolos con el tamaño de la expansión, edad de presentación, gravedad de la enfermedad e incluso manifestaciones clínicas de sistemas específicos.⁶

La distrofia miotónica se clasifica en: congénita, infantil, clásica o del adulto joven con alteraciones neurológicas y la enfermedad mínima en donde frecuentemente la única manifestación es la presentación de cataratas. Claramente esta clasificación esta relacionada con la edad, y precisamente la edad de presentación ha sido usada como un indicador.

En un estudio inicial se demostró claramente diferencias entre el tamaño de la expansión en las diferentes presentaciones de la enfermedad. Todos los casos congénitos mostraron una expansión mayor de 2500 pares de bases (pb) o más grandes; mientras en el grupo mínimamente afectado todos tenían expansiones de 250 pb o menos por lo que esto separaba completamente a estos dos grupos. Los casos con la típica distrofia del adulto joven tenían amplia variedad en el tamaño del repetido, sobrelapándose con otros grupos, también se demostró que los casos con repetidos más largos correspondían a la forma congénita. Además se encontró una correlación inversa con el tamaño del repetido y la edad de presentación no encontrándose diferencias entre sexo.⁶

Estos hallazgos fueron utilizados para clasificar a la enfermedad uniendo el largo del repetido con la edad de presentación, clasificándolas como mínima, clásica y congénita; concluyendo que cuando se tenía de 100 o menos repetidos se trataba de una forma mínima y de 1500 hacia arriba se tenían altas probabilidades de enfrentarse con una forma más grave de la patología (Cuadro 2).^{33, 34}

Estudios adicionales a estos hallazgos han dirigido su atención a la correlación entre el número de repetidos y manifestaciones no musculares. Estas incluyen sistema nervioso central, IQ, defectos cardiacos y una variedad

de anomalías endocrinas y metabólicas. Casi todos han encontrado correlación

Cuadro 2. Clasificación de la DM1 de acuerdo al tamaño del repetido en asociación con el número de repetidos. Modificado de Die-Smulders¹⁸

<i>Tipo</i>	<i>Edad de Presentación</i>	<i>Síntomas a la Edad de Presentación</i>	<i>Síntomas en Etapas Posteriores</i>	<i>Largo del Repetido CTG</i>
Mínima o de Presentación Tardía	≥50 años	Cataratas	Debilidad muscular leve, por electromiografía miotonía	40-100
Adulta o Clásica	12-50 años	Miotonía, debilidad muscular	Debilidad severa, apatía, complicaciones sistémicas, cataratas	100-1000
Infancia	1-12 años	Problemas de aprendizaje y de Lenguaje	Retraso mental, complicaciones sistémicas como en la clásica	500-2000
Congénita	Periodo Fetal	Hipotonía, dificultad respiratoria, pie equinovaro, retraso en el desarrollo	Retraso mental, complicaciones sistémicas como en la clásica	1000-5000

comparable con los estudios más generales y la principal conclusión es que no parece que un sólo sistema este fielmente relacionado con el número de repetidos ni tampoco ser independiente de éste. Estos hallazgos revelaron que muy probablemente tendrían que estar participando genes vecinos en la patología de la enfermedad, y que esta expansión anómala del trinucleótido de alguna manera estaba alterando la expresión adecuada de genes próximos; muy parecido a los síndromes de genes contiguos.⁶

E. Diagnóstico

El diagnóstico de DM1 debe sospecharse ante síntomas tales como miotonía, pérdida de la visión progresiva, debilidad muscular, sin embargo hay otras patologías que pueden presentarse con síntomas similares y dar un diagnóstico equivoco por lo que el Consorcio Internacional de Distrofia Miotónica elabora una guía para el diagnóstico molecular de esta patología.⁴⁰

El análisis directo de la expansión del repetido tiene alta sensibilidad y especificidad cuando se combinan las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Southern blot y pueden detectar todas las mutaciones de *DMPK* y prácticamente sin falsos positivos. Mediante el análisis de Southern blot, el ADN genómico es digerido con enzimas de restricción tales como *EcoRI*, *BamHI*, *NcoI* y *BglI* siendo el procedimiento de elección para detectar repetidos CTG mayores de 100. La PCR debe ser usada para identificar alelos de DM1 entre 5 y 200 repetidos que frecuentemente se asocian con la forma adulta-clásica (Cuadro 2). Usando oligonucleótidos sobre las regiones flanqueadoras de la secuencia del repetido la región inestable puede ser fácilmente detectable. Lamentablemente repetidos mayores de 500 pb son imposibles de amplificar. Por lo tanto, este método no es apropiado para hacer un diagnóstico directo en todos los pacientes con DM1, pero puede ser útil para excluirlos.³³

El análisis molecular debe realizarse en pacientes sintomáticos como confirmatorio o como parte de la integración de un diagnóstico cuando la DM1 es parte de los diagnósticos diferenciales; para pacientes asintomáticos como predictivo para determinar cual de los progenitores tiene la mutación de DM1; y para diagnóstico prenatal por las implicaciones que la distrofia miotónica congénita conlleva, si uno de los padres tiene un riesgo del 50% de tener el alelo expandido y es asintomático primero debe evaluarse genótipicamente al padre y posteriormente realizarse el análisis molecular. Sin embargo, el análisis para menores no debería realizarse dado que la persona sometida al estudio debe entender los beneficios y los riesgo que el análisis molecular ofrece, excepciones son en el caso que un paciente menor presente síntomas.³³

Posterior a la confirmación de la DM1 por análisis molecular, se continúa con exámenes de laboratorio y gabinete para diagnosticar las alteraciones

relacionadas. Estos corresponden a electromiografía, examinación con lámpara de hendidura, medición en suero de creatina fosfocinasa (CPK), inmunoglobulinas (Ig), hormona folículo estimulante y testosterona, electrocardiografía y biopsia muscular.⁴⁰

Es importante realizar los estudios para establecer el diagnóstico definitivo y así evaluar a los pacientes de manera integral y permitirles el beneficio de ofrecerles un manejo terapéutico y un asesoramiento genético adecuados. Además, es importante conocer el comportamiento del padecimiento en pacientes mexicanos tanto a nivel clínico como a nivel molecular. Esto nos permitirá identificar si existen o no otra serie de factores que estén participando en la génesis, evolución y pronóstico de la enfermedad.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

La DM1 es la distrofia muscular más frecuente en adultos y en la actualidad no existe ningún estudio molecular de dicha patología en mestizos mexicanos. La mayoría de los estudios han sido realizados en poblaciones caucásicas.

Este estudio será importante pues permitirá conocer si la expansión del trinucleótido CTG correlaciona con la edad de presentación y la gravedad de la enfermedad en una familia mestiza mexicana.

En artículos publicados internacionalmente se hace referencia a la correlación entre el número de repetidos y la edad de presentación aunado a la severidad de las manifestaciones clínicas de la DM1. En familias mestizas mexicanas el número de repetidos podrá usarse como método diagnóstico y pronóstico; y de ser así se establecerían posibles estrategias para la identificación de riesgo y prevención de esta patología. Del mismo modo nos servirá para conocer el comportamiento molecular del padecimiento

VI. OBJETIVO GENERAL:

Describir las manifestaciones clínicas de cada uno de los integrantes de una familia con DM1 y su asociación con el número de repetidos del trinucleótido CTG.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES:

Realizar el análisis molecular del repetido CTG del gen *DMPK* de individuos asintomáticos y sintomáticos de una familia con DM1.

Analizar si hay correlación entre el número de repetidos y la edad de presentación de individuos asintomáticos y sintomáticos de una familia con DM1.

VIII. HIPÓTESIS:

Es posible que se encuentre una correlación entre el número de repetidos del trinucleótido CTG y la edad de presentación aunado a la severidad de la enfermedad en esta familia de mestizos mexicanos con DM1, ya observado en otras poblaciones mundiales.

IX. Diseño del Estudio

1. Tipo de investigación: No experimental.

Descriptivo.

En relación a la unidad de estudio: Comunicación de un caso familiar.

El estudio fue ciego, al realizar el estudio molecular el investigador ignoró si se trataba de pacientes asintomáticos o sintomáticos.

2. Universo:

La población incluida en este estudio son miembros de tres generaciones de una familia afectada por distrofia miotónica tipo 1.

– Criterios de inclusión:

Todos los familiares que desearon hacerse el análisis molecular, mayores de 18 años.

– Criterios de exclusión:

Todos los familiares que no tenían mayoría de edad y/o que por motivos ajenos no se tomo la muestra sanguínea.

3. Variables del Estudio:

– Independiente:

Polimorfismo del repetido trinucleótido CTG de la región 3' no traducida (UTR) del gen *DMPK*.

– Dependiente:

Manifestaciones clínicas de Distrofia Miotónica Tipo 1.

X. Materiales y Métodos:

1. Poblaciones incluidas en el estudio:

A. Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos (Fig 1):

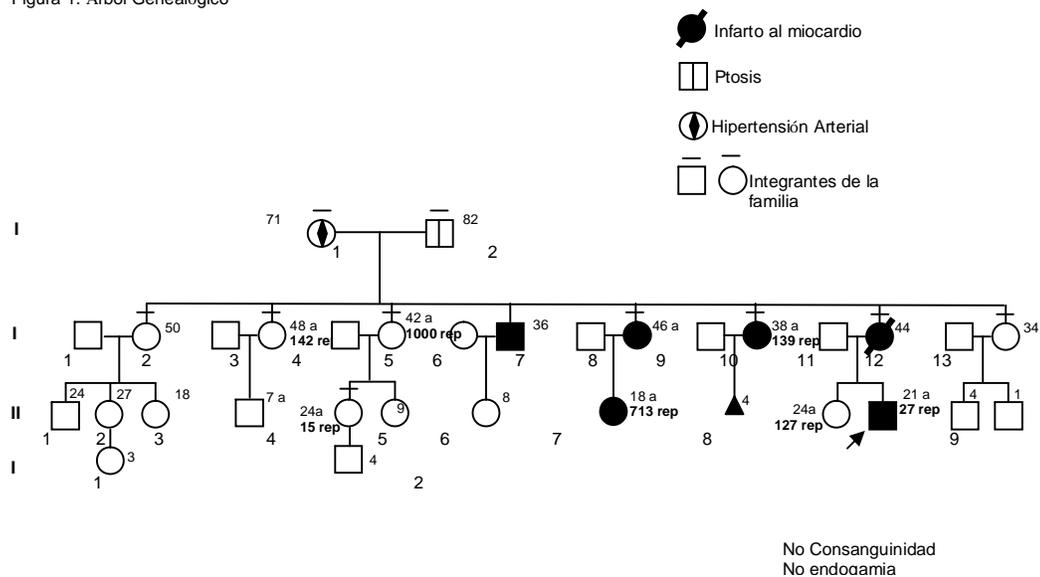
Los individuos II-10, II-12; III-8, III-10.

B. Miembros de la Familia Mestiza Mexicana Sintomáticos (Fig 1):

Los individuos I-1, I-2; II-2, II-4, II-6, II-12; III-3, III-5, III-9.

Todos los miembros de la familia que se encuentran en el grupo A y B recibieron asesoramiento genético previo y posterior a la toma de muestra sanguínea. La muestra se tomó con consentimiento informado. Además se exploró a cada uno de ellos, se aplicó un registro realizado en Cardiff¹⁸ y se realizó el estudio molecular.

Figura 1. Árbol Genealógico



2. Extracción y purificación del DNA genómico⁴⁸

Un aspecto fundamental de este trabajo es la obtención de DNA en cantidades razonables y de alta pureza. Existen varias metodologías que permiten su obtención partiendo de diferentes fuentes, gotas de sangre seca, semen, tumores, cabellos o tejidos antiguos. En este caso se obtuvo DNA de todos los sujetos incluidos en el estudio a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica. El método consiste en la eliminación de eritrocitos mediante choque hipotónico para dejar limpios a los leucocitos. Posteriormente se lisan los leucocitos para liberar el DNA. La lisis puede llevarse a totalidad utilizando detergentes iónicos como el SDS. Alternativamente se puede hacer una lisis parcial con detergentes no iónicos como el NP-40 o el Tritón X-100.

A. Obtención de las muestras

1. Se toman 20 ml de sangre periférica en tubos "vacutainer" que contienen EDTA como anticoagulante.
2. Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml.
3. Agregar 3 ml de amortiguador TTS
4. Homogenizar (agitar) suavemente.
5. Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 5 min. Desechar cuidadosamente el sobrenadante.
6. Al paquete de células blancas agregar 1 ml de TTS.
7. Agitar vigorosamente y pasar a un tubo de 1.5 ml.
8. Centrifugar a 10, 000 r.p.m. durante 3 min.
9. Decantar el sobrenadante.
10. Repetir los pasos 6, 7, y 9 hasta que queden las células blancas libres de eritrocitos (generalmente con 2 pasos de lisis es suficiente).
11. Al paquete de células blancas agregar 570 μ l de NaCl al 5 mM y agitar 2 minutos.
12. Adicionar 30 μ l de SDS al 10% y agitar 5 min vigorosamente.

13. Adicionar 200 μ l de NaCl saturado y agitar 10 min vigorosamente.
14. Centrifugar a 11, 000 r.p.m durante 30 min a 4^o C.
15. Decantar el sobrenadante cuidadosamente en un tubo de 13X100 mm estéril y añadir 2ml de etanol absoluto a -20^o C.
En este paso se pueden congelar las muestras a -20^o C ó se puede continuar la extracción. La congelación se puede hacer directamente en los mismos tubos en los que se tienen las muestras. No se debe descongelar hasta el momento de finalizar la extracción.
Si se decide continuar la extracción en el momento de agregar el etanol absoluto a -20^o C se observa precipitar al ADN.
16. Capturar el ADN con una varilla de vidrio y enjuagar este con etanol al 70% dejando evaporarlo en condiciones de esterilidad
17. Resuspender el ADN en un microtubo con 200 μ l de agua estéril.
18. Colocarlo en el termobloque a 60^o C durante 2 horas.

Todos los materiales que se utilicen deben estar estériles para evitar la presencia de nucleasas. Es importante, trabajar con guantes durante el proceso de extracción. Es importante también que la pureza de los reactivos sea muy alta porque, sí no es así, la calidad del DNA disminuye, o puede degradarse.

B. Tipificación del número de repetidos del trinucleótido CTG

La pieza fundamental en el presente estudio quizás sea el análisis del repetido ya que de este resultado dependen tanto el manejo posterior como el asesoramiento genético.

1. PCR

Los alelos entre 5 y 200 repetidos pueden identificarse por la técnica de PCR usando oligonucleótidos de las secuencias flanqueadoras del repetido (Cuadro ¿?).

Cuadro 3. Oligonucleotidos de las regiones flanqueadoras del repetido.

Nombre	Secuencia
*F 5'	5' GGCTCGAAGGGTCCTTGTA3'
*R 3'	3' CTCAGCCTGGCCGAAAGAA 5'

Las condiciones de amplificación para efectuar la reacción de PCR fueron las siguientes:

1. Calcular el volumen correspondiente a 500 ng de DNA genómico.
2. Adicionar en un tubo de 2 mL:
 - a) El volumen equivalente a 500 ng de DNA genómico.
 - b) 1 mM MgCl₂ (1 µl)
 - c) Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) a una concentración de 2.5 mM, llevarlos a una concentración de 125 µM (1 µl)
 - d) Buffer 10X, llevarlo a una concentración de 0.5X (1 µl)
 - e) Oligonucleótido F* a una concentración de 20 mM, llevarlos a 10 mM
 - f) Oligonucleótido R* a una concentración de 20 mM, llevarlos a 10 mM
 - g) 0.75 unidades de Taq polimerasa (1 unidad=0.3 µl)
 - h) Aforar con agua estéril hasta 50 µl
3. Colocar en el termociclador (Eppendorf, Master cycler gradient) el siguiente programa:

Desnaturalización 95°C 30 s

Alineación 61°C 60 s

Extensión 72°C 2 m

30 ciclos

Una vez concluido el programa los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con objeto de confirmar la presencia de los alelos. El peso esperado de los fragmento amplificados para

los alelos normales es alrededor de 129 pb. Una vez que se confirmó el producto de la amplificación, se procedió a la purificación del fragmento.

2. Purificación del Fragmento Amplificado

La purificación del fragmento observado en el gel sufre un proceso de purificación, realizado con el kit QUIAEX II; esto evita contaminantes en la reacción de secuenciación. Esta técnica remueve el exceso de dNTP's, oligonucleótidos, enzima, ADN, etc y de esta manera obtener una secuencia limpia.

1. Cortar la banda del fragmento amplificado del gel y pesarla.
2. Agregar 3 veces el peso de la banda buffer QXI y 5 μ l QUIAEX II en un tubo de 2 mL.
3. Incubar por 10 min a 50° C, agitando cada 2 min el tubo.
4. Centrifugar durante 1 min a 10, 000 r.p.m., decantar y añadir 500 μ l de buffer QXI.
5. Centrifugar durante 1 min a 10, 000 r.p.m., decantar y eliminar los residuos de este buffer. Agregar 500 μ l de buffer PE, agitar vigorosamente y centrifugar durante 1 min a 10, 000 r.p.m. (2 veces)
6. Eliminar los residuos del buffer PE y secar la muestra a temperatura ambiente. Resuspender con 20 μ l de agua estéril, centrifugar 2 min a 10, 000 r.p.m. y el sobrenadante se coloca en un microtubo.
7. Verificar que la purificación haya sido exitosa, electroforesis del producto obtenido en un gel de agarosa usando un marcador de peso y cantidad (low-mass) de 100 pb.

3. Reacción de Secuenciación

Teniendo la muestra purificada todo el producto de la PCR contiene el ADN correspondiente a los alelos de DM1. Preparamos la muestra para la secuenciación automática. La tecnología de secuenciación del ADN nos permite saber el orden o secuencia de los nucleótidos que forman parte del gen.

Las condiciones de la reacción de secuencia son las siguientes:

1. Adicionar en un tubo de 200 μ l:
 - i) Mezcla de reacción del kit BigDye Terminador (2 μ l).
 - j) Purificado de la PCR 100 ng/ μ l (1 μ l)
 - k) Oligonucleótido F* a una concentración de 10 μ M (1 μ l)
 - l) Oligonucleótido R* a una concentración de 10 μ M (1 μ l)
 - m) Agregar agua estéril (16 μ l)
3. Colocar en el termociclador (Eppendorf, Master cycler gradient) el siguiente programa:

Desnaturalización	96°C	30 s
Alineación	50°C	15 s
Extensión	60°C	4 m
		25 ciclos

4. Purificación de los productos de la extensión

La purificación se realiza por el método por columnas de Centri Sep para eliminar la fluorescencia en exceso y permitir una secuenciación limpia.

1. Pesar en una columna 0.06 g de sephadex.
2. Agregar 800 μ l de agua inyectable, esperar por lo menos dos horas a que se hidraten.
3. Centrifugar durante 3 min a 3000 r.p.m. para retirar el exceso de agua.

4. Colocar el producto de la PCR en las columnas y centrifugar durante 3 min a 3000 r.p.m. para obtener el producto purificado.
5. Centrifugar la muestra en una centrifuga al vacio (Opied Vac), esperar hasta que el producto seque y tapar con una septa.

5. Montaje de la Muestra en el Equipo de Secuenciación

1. Añadir 20 µl de amortiguador de carga TSR Applied Biosystems.
2. Transferir a un tubo de secuenciación y colocar una septa.
3. Desnaturalizar la muestra a 94° C por 2 min y colocar inmediatamente en hielo.
4. Colocar las muestras en el secuenciador automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo.

Al evaluar los resultados de las secuencias se encontraron hallazgos a los ya reportados en la literatura, se identifican alelos entre 5 y 200 repetidos por lo que se empleo una segunda técnica con el kit GLDM PCRProber™ que es un análisis por PCR no radioactivo para la genotipificación de la DM1 solamente en uso con fines de investigación, para la identificación de alelos con una mayor expansión.

C. Tipificación del número de repetidos del trinucleótido CTG por el kit GLDM PCRProber™

El kit GLDM PCRProber™ esta basado en la técnica de Southern blot, las sondas pueden estar disponibles sin marcaje para usarlas con radioactividad o estar marcadas con digoxigenina para detectar la quimioluminiscencia. Estas sondas son especialmente para detectar expansiones de repetidos trinucleótidos, tales como X Frágil, Enfermedad de Huntington, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Kennedy y **DM1**.

El Gene Link no radioactivo es un sistema de detección para enfermedades con expansión trinucleótidos rápido, fiable y sensible como el 32P. La mutación detectada por Southern blot corta el ADN con cualquiera de estas enzimas de restricción (*Bam HI* o *Pts I*) este método detecta el tamaño de

la región del repetido por hibridación de la sonda GLDM1 o GLDM2 al ADN que ha sido digerido con la adecuada enzima de restricción y bloteada sobre la membrana. El repetido CTG en rangos normales mide aproximadamente 1377 pb digerida con *Bam HI* y 1136 pb digerida con *PtsI*.

1. Preparación de la PCR Premix

Descongelar los componentes individualmente, inmediatamente almacenar a -20° C después de usarlos. Preparar suficiente PCR Premix para el número de reacciones que se harán. Tener precaución de preparar 10% más del premix asignado. Preparar 49 µl de volumen final para la reacción.

PCR Premix DM1

Componente A de la PCR GLDM	29 µl
Componente B de la PCR GLDM	4 µl
Componente C de la PCR GLDM	16 µl
Volumen Final	49 µl

PCR “Hot Start”

Los programas para la PCR son dos:

a. “Hot Start”

Desnaturalización	94°C	5 min
Mantener	60°C	

b. Amplificación del repetido CTG

Desnaturalización	95°C	30 s
Alineación	61°C	60 s
Extensión	72°C	2 m

30 ciclos

1. Usar 44 μl del premix para cada reacción, adicionar 50-100 ng de ADN y comenzar con el programa de "Hot Star" para desnaturalizar por 5 min.
2. Mientras espera los 5 min de desnaturalización adicionar Taq polimerasa a lo que sobro de la premix. Adicionar 2.5 unidades de Taq Polimerasa por 10 μl de premix. Marcar este tubo como Enzima Mix.
3. Mientras la PCR esta en 60° C adicionar 5 μl de la enzima mix a cada tubo. Después de adicionar a cada tubo, continuar con la PCR b.
4. Precipitar el producto de PCR con etanol. Disolver el botón en 5 μl de agua estéril y entonces adicionar 5 μl de buffer marcado seq.

2. Electroforesis y Electrotransferencia

Preparar un gel de poliacrilamida al 6%-7 M de urea. Pre-electroforesis por 10 min a 25 watts constante.

Calentar la muestra a 75° C por 5 min. Mantener en hielo. Cargar 5 μl al gel. Correr el gel a 25 watts constante 10 min después de que el colorante xileno cianol salga del gel, aproximadamente 1 hora.

Mientras el gel corre, prepararse para la transferencia. Remojar con carga positiva la membrana de nylon en agua por 5 min, continuar remojando en TBE 1X. Ajustar el aparato de electrotransferencia. Electro-transferir a 400 mA por 1 hora en TBE 1X.

3. Hibridación y Detección

Preparar la hibridación y detección mientras sucede la transferencia.

1. Después de la electrotransferencia, lavar la membrana con 50 ml de solución Hybwash I a 55° C por 30 min.
2. Prehibridar en 7.5 ml con solución Lumisol III precalentada a 55° C por 30 min.

3. Reemplazar con 7.5 de Luminisol III precalentada a 55° C adicionando 2 µl de la sonda GLDM PCRProber™. Hibridar a 55° C por 30 min. No excederse de 30 min.
4. Posteriormente lavar con 75 ml de la solución Hybwash I precalentada por 7 min a 55° C. Repetir 3 veces. Un total de 4 lavados.
5. Lavar con 150 ml de solución Hybwash II precalentada por 5 min a 55° C. Repetir una vez. Un total de 2 lavados.
6. Lavar en 25 ml de buffer de detección 1X a temperatura ambiente por 5 min. Repetir 3 veces. Un total de 4 lavados.
7. Transferir a una hoja plástica y desechar el exceso de buffer. Secar los extremos con una toalla de papel, sin tocar el interior.
8. Rociar CDP-star, un substrato listo para usar, cubrir homogéneamente la membrana. Cubrir con la hoja plástica y enjuagar la superficie completa para quitar cualquier exceso de substrato y burbujas aire. Exponer la placa a temperatura ambiente por 1 hora o por el tiempo necesario.
9. La luminiscencia permanece por lo menos 24 horas y la intensidad permanece casi constante durante algunas horas.

Con expansiones mayores de 200 repetidos el ADN genómico fue digerido con la enzima de restricción *Bam I* (Figura 4). Y el ADN se hibridó como se menciona en el punto 3 (hibridación y detección).

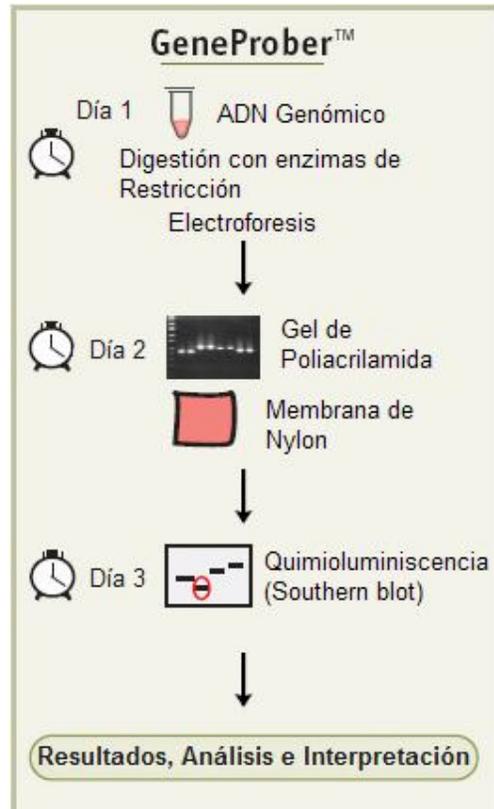


Fig 4. Representación de la técnica.

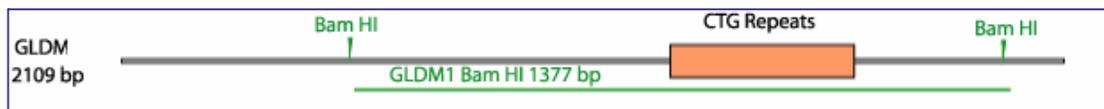


Fig 5. Se representa el sitio de corte de la enzima de restricción *Bam HI*.

XI. RESULTADOS

Se valoró una genealogía de tres generaciones con 24 integrantes, de los cuales 6 individuos presentan manifestaciones clínicas compatibles con DM1. Del total de integrantes se realizó historia clínica completa de 15 individuos incluyendo a 4 de los afectados clínicamente. Posterior al interrogatorio y a la exploración física se analizaron molecularmente a 3 de los que presentan signos y síntomas y a 4 individuos clínicamente sanos.

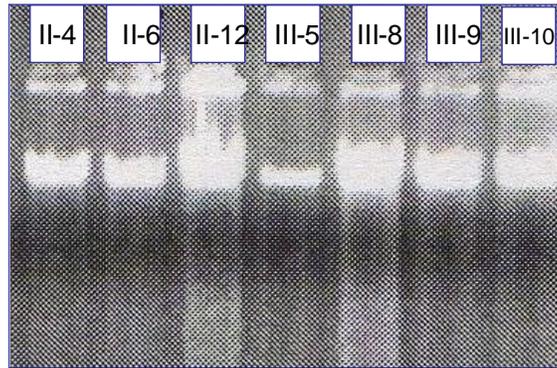


Fig 6. Muestra la extracción de ADN realizada a los 7 individuos de la genealogía.

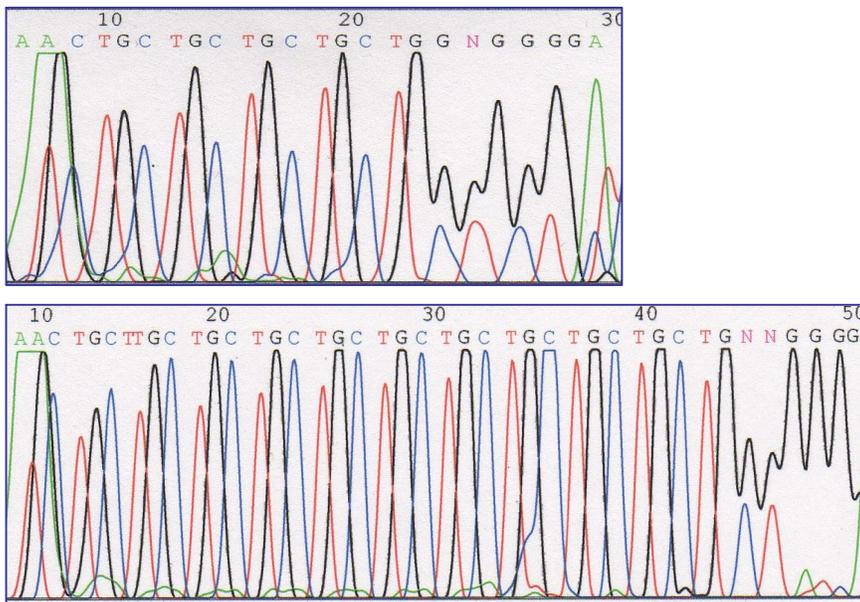


Fig 7. Electroferograma que corresponde a dos alelos a) arriba 5 repetidos, B) abajo 11 repetidos.

Para los individuos del grupo A los datos se resumen en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Manifestaciones de los Miembros de la Familia Mexicana Sintomáticos. ● Francamente Positivo, ○ Positivo, ? Desconocido, cuadro en blanco=negativo.

Manifestaciones Clínicas	II-10	II-12	III-8	III-10
Problemas de Movilidad				
Problemas para Deglutir	●	●	○	
Problemas Cardiovasculares	●	●		
Astenia/Adinamia	●	●	●	●
Somnolencia	●	○	●	●
Infecciones de Vías Respiratorias	●			●
Cataratas				
Ptosis	●			
Fuerza Muscular Disminuida	●	●		●
Problemas a la Flexión Cervical	●			
Problemas a la Extensión Cervical	●	●		
Problemas Abducción de Hombros				
Problemas a la Extensión de Muñeca	●			
Problemas a la Flexión de la Muñeca	●			
Problemas para Pinzar	○			●
Problemas a la Flexión de Cadera	●		●	
Problemas Dorsi-Flexión del Tobillo	●	●		
Miotonía	Moderada	Leve	Grave	Leve
Alteración Función Respiratoria				
Alteración en el Electrocardiograma	●	?	?	
Edad de Inicio	40 años	30 años	15 años	16 años
No. de Repetidos	NA	139	713	27

El individuo II-12 ha presentado problemas para deglutir ocasionalmente, cuando come o bebe tose desde hace 3 años y frecuentemente tiene que esperar o golpearse para deglutir el alimento. El reporte cardiológico concluyo bradicardia. La paciente refiere alteraciones del sueño. Presenta ligera ptosis,

dificultad a la extensión del cuello, al pinzar y a la dorsiflexión del tobillo; con 139 repetidos.

El individuo III-8 ha presentado somnolencia, cambios en el sueño, una miotonía importante con pérdida de fuerza y habitualmente presenta dificultad a la flexión de la cadera.

El individuo III-10 presenta somnolencia, miotonía paresia de lengua y al pinzar.

En el caso de los individuos del grupo B el registro Cardiff fue negativo para todos los signos y síntomas, ninguno de ellos se había realizado electrocardiograma excepto II-6 cual fue normal y el número de repetidos se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 5. Miembros de la Familia Asintomáticos.

	I-1	I-2	II-2	II-4	II-6	III-3	III-5	III-9
No. de Repetidos	NA	NA	NA	142	1000	NA	15	127

A pesar de que el registro Cardiff evalúa gran parte de los problemas que pueden observarse en la DM1 hay algunos datos clínicos que quedan fuera (Cuadro 6).

La expansión del repetido trinucleótido fue analizada en pacientes afectados y pacientes aparentemente sanos. Se observa (Cuadro 6) que los pacientes II-4, II-6, III-5, III-9 sin datos clínicos para DM1 presentan 142, 1000, 15 y 127 de números de repetidos, respectivamente. Los pacientes con manifestaciones clínicas II-12, III-8 Y III-10 presentan 139, 713 y 27 números de repetidos, respectivamente. Solo uno de ellos (III-10) presenta leve daño cognitivo caracterizado por poca fluencia verbal. Ninguno de ellos presenta cataratas, ni diabetes. Uno (II-12) tiene bradicardia. Todos presentan un grado leve de daño motor dado por la miotonía y debilidad muscular observado también en la puntuación referida en la Escala de Rango de Incapacidad (2 para los afectados).

Cuadro 6. Hallazgos clínicos y moleculares.

P	S	E	E. I.	D. C.	C	A. C.	D	D. M.	EMG	ERDM ⁴⁹	(CTG) _n
II-4	F	49	NC	-	-	-	-	-	-	1	142
II-6	F	43	NC	-	-	-	-	-	-	1	1000
II-12	F	39	30	-	-	+	-	+	+	2	139
III-5	F	25	NC	-	-	-	-	-	-	1	15
III-8	F	19	15	-	-	-	-	+	+	2	713
III-9	F	25	NC	-	-	-	-	-	-	1	127
III-10	M	22	16	~	-	-	-	+	+	2	27

P, paciente; S, sexo; E, edad; EI, Edad de Inicio; DC, Daño Cognitivo; C, cataratas; AC, Alteración Cardíaca, D, Diabetes; DM, Discapacidad Motora; EMG, Electromiografía; ERDM, Escala de Rango de Incapacidad; (CTG)_n; tamaño del repetido; NC; No datos Clínicos de DM1.

XII. DISCUSION.

El reconocimiento de la expansión del repetido CTG en los pacientes con DM1 ha sido básico para empezar a resolver algunos aspectos de la enfermedad. Este mecanismo biológico parece explicar la amplia variabilidad en la sintomatología de la enfermedad y la edad de presentación, particularmente entre diferentes generaciones de la misma familia.⁵⁰ Sin embargo, en nuestro estudio no se puede concluir que haya correlación entre el número de repetidos y el cuadro clínico de la enfermedad (cuadro 6); hay familiares que presentan alto número de repetidos sin manifestaciones clínicas, como la paciente II-6, y al menos en el grupo B uno de ellos (III-5) en su alelo más expandido presenta 15 repetidos trinucleótidos, colocándolo como el único individuo dentro de los clínicamente sanos con alelos dentro de los rangos normales; paradójicamente, la paciente III-8 presenta 713 trinucleótidos que no correlacionan con sus manifestaciones clínicas, sin embargo, esta paciente es la que tiene una edad de presentación más temprana. Los pacientes con manifestaciones clínicas (II-12 y III-8) y con aumento de repetidos, presentan miotonía y disminución de la fuerza importantes, sobre todo la paciente III-8. A pesar de que el paciente III-10 presenta en su alelo la expansión de 27 trinucleótidos, que lo coloca dentro de los polimorfismos de alelos normales, tiene datos clínicos de miotonía, además de presentar, a diferencia de II-12 y III-8, poca fluencia verbal. Algunos autores han propuesto que probablemente, algunas manifestaciones clínicas específicas presentan una correlación entre el número de repetidos mientras que en otras no se observa esta correspondencia⁵¹; la presencia o ausencia de varias manifestaciones clínicas que son frecuentemente observadas en los pacientes con DM1 (insuficiencia respiratoria, diabetes, hipogonadismo, cataratas y desórdenes del sueño) no están relacionadas con el largo del repetido.⁵¹ En los 90's se escribieron artículos que mencionan que el fenotipo más grave de DM1 presenta el repetido más largo con una edad de presentación más temprana en los hijos de padres afectados. Estudios similares mencionan que el tamaño del repetido es más extenso en estos hijos.^{16, 34, 50, 52} Con todos estos antecedentes la propuesta es que la variación en la gravedad correlaciona con lo extenso de la mutación y la edad de presentación.^{40, 53} Probablemente esta sea la única

relación existente, y dado que la presentación es más temprana, la historia natural de la enfermedad parecería ser más grave en los pacientes de inicio temprano. Para valorar si las manifestaciones clínicas dependían de la expansión del triplete se iniciaron estudios analizando el tamaño del repetido en diferentes tejidos. Se observó que en el músculo esquelético se encontraban repetidos más largos que en los linfocitos de sangre periférica del mismo individuo.^{9, 1} Las expansiones más grandes fueron localizadas en el corazón, seguido de fibroblastos, hígado y cerebro además de proponerse que la inestabilidad del repetido CTG es más pronunciada en los estados más tempranos de la embriogénesis, no excluyendo que la expansión puede ocurrir continuamente a lo largo de la vida del paciente^{54, 55} Se ha planteado que la distribución del tamaño del alelo entre células somáticas tiende a futuras expansiones y que el promedio del largo del repetido en células de sangre periférica de pacientes con DM1 puede incrementarse en un tiempo relativamente corto (1 a 5 años), si en la evaluación inicial el repetido es >200 en un intervalo de 2 años se observará un incremento en el repetido pero si el repetido es <200 el incremento será después de 5 años² Por otra parte el tamaño del alelo no siempre correlaciona con lo observado clínicamente², así la familia mostrada en este estudio parece encontrarse dentro de las excepciones que algunos autores mencionan con respecto a las correlaciones descritas en la literatura. No contamos con el análisis molecular de la generación I, esto nos limita para determinar el origen materno o paterno de la expansión del repetido. En la generación II los pacientes 8,10,12 y 14 están afectados; II-14 finada a los 44 años por falla cardíaca, con diagnóstico de bradicardia por problemas en la conducción cardíaca. II-12 con leves manifestaciones (ver cuadro 3 y 5) incluyendo leve miotonía. Esta paciente presentó 4 abortos, los 2 primeros se trataron de molas hidatiformes, manifestación ligada a impronta genómica paterna⁵⁶ lo que descartaría el antecedente de DM1. Sin embargo, ignoramos la causa de los últimos dos abortos y si hubiera alguna relación con el repetido que en ella fue de 139. De los pacientes II-8 y II-10 no contamos con el análisis molecular y al menos de II-8 tampoco evaluación clínica. El paciente II-10 presenta diversas alteraciones (ver cuadro 3) y tiene una hija afectada. La generación III con solo dos pacientes sintomáticos; III-8 con pocas manifestaciones clínicas (ver cuadro 3 y 5) y miotonía grave con 1000 repetidos

y una edad de presentación temprana; llama la atención que presenta pocas manifestaciones clínicas pero una grave miotonía, una edad de presentación temprana y un largo repetido. El paciente III-10 presenta manifestaciones menos evidentes (ver cuadro 4 y 6) que III-8, a pesar de ser el descendiente de una mujer afectada y finada a temprana edad por alteraciones cardíacas, curiosamente su alelo más expandido presenta 27 trinucleótidos. No obstante los pacientes asintomáticos presentan expansión del repetido. El II-4 y III-9 tienen >100 repetidos sin ninguna manifestación clínica, sin embargo cabe mencionar que III-9 es hija de una afecta clínicamente por DM1 y hermana de un individuo (III-10) con manifestaciones clínicas sin expansión. Por otro lado II-6 se reportó con 1000 repetidos y al aplicarle el registro Cardiff y la evaluación médica no presenta ni una sola manifestación clínica. Ambas pacientes (II-6, III-8) presentan 1000 repetidos y sin embargo ambas presentan un cuadro clínico contrario que va de manifestar la enfermedad hasta ser portadora sana, que es un término que propone Harper para referirse a los individuos con un repetido <100⁵⁷ probablemente esta paciente (II-6) sea portadora, no manifieste la enfermedad por que tenga mosaicismo somático y/o quizás haya genes modificadores participando en la expresión de la enfermedad. Además todos nuestros pacientes fueron evaluados por un oftalmólogo experimentado y ninguno de ellos (sintomáticos o clínicamente sanos) presentan cataratas policromáticas⁵⁸; este signo es muy frecuente en los pacientes con DM1, pueden ocurrir a cualquier edad pero usualmente no se presentan antes de la pubertad, además puede ser la manifestación mínima de la enfermedad.¹⁸

Estudios previos propone que el repetido CTG es muy inestable de una generación a otra y que además esta inestabilidad también se observa en diferentes tejidos de un mismo individuo. Esto podría estar generando mosaicismo somático, es decir, en un mismo tejido la existencia conjunta de una gran variación del número de repetidos en cada una de las células. Este proceso que Harper describe como edad-expansión, asume que a mayor edad es mayor la expansión de trinucleótidos y que además se presenta en todas las células del organismo. Esto permite proponer que el tamaño del repetido tiene un bajo poder predictivo para la edad de presentación y la gravedad de la enfermedad. Análogo a estas observaciones, cuando se valora la transmisión

intergeneracional de la mutación y es comparada con la expansión del repetido presente en la sangre de un padre y en la de su hijo, cerca del 6% muestran una disminución de la expansión, conocida como contracción. Y contrariamente a lo que se esperaría observar, aparentemente estas contracciones son asociadas a anticipación clínica. Esta paradoja probablemente sea el resultado de medir el repetido y asociarlo con el padre, el hijo y la edad de presentación cuando la toma de muestra para el análisis molecular es a una edad mayor de los padres e ignoramos mucho del comportamiento del repetido a lo largo del tiempo en los diferentes tejidos. Así se debe tomar un cuidado especial al inferir lo largo de la expansión del triplete en un diagnóstico clínico.⁴⁰

A pesar del descubrimiento de la participación de la mutación de *DMPK* como el gen protagonista en la DM1, esta mutación no ha sido suficiente para explicar todas las manifestaciones clínicas observadas en la patología. Dado que la mutación de *DMPK* se encuentra en la región 3'UTR del gen se plantea que al transcribirse este ARNm afecta la expresión local de otros genes y que *DMWD*, *DMPK* y *SIX5* actúan como un síndrome de genes contiguos.⁴⁰

El análisis de la expansión de los repetidos trinucleótidos por el kit GLDM PCRProber™ basado en la técnica de Southern blot, usando digoxigenina para detectar la quimioluminiscencia es altamente confiable y un método menos tóxico para el investigador. Este método puede facilitar la investigación de las enfermedades humanas por amplificación de trinucleótidos. Nosotros planteamos la posibilidad de emplear las sondas GLDM PCRProber™ para diagnóstico clínico, sin embargo, aún faltaría un estudio comparativo entre el método diagnóstico hasta ahora empleado (Southern blot) y las sondas GLDM PCRProber™. Por lo que continuar empleando las sondas quimioluminiscentes en futuras investigaciones y correlacionando los hallazgos clínicos con los reportes de las expansiones de los trinucleótidos ayudaran a elucidar si estas sondas GLDM PCRProber™ son confiables para utilizarse en la practica diaria, de ser así la tecnología a encontrado un nuevo método para dejar de utilizar material radioactivo, benéfico para el personal de salud. Si este método es viable repercutirá tanto en pacientes como en investigadores y finalmente se reflejará en un mejor manejo clínico para el paciente y por supuesto para un mejor asesoramiento genético del que ahora podemos ofrecerles a estas familias.

XIII. APÉNDICE

1. Registro clínico muscular Cardiff para Distrofia Miotónica

<i>Nombre</i>	<i>Fecha</i>
<i>Lista de Problemas</i>	<i>Peso</i>
	<i>Talla</i>
<i>Movilidad</i>	
<i>Deglutir</i>	
1. <i>¿Tose cuando come o bebe?</i>	
2. <i>¿Usted tiene que cortar muy finamente o picar sus alimentos antes de comer?</i>	
3. <i>¿Usted evita comer ciertos alimentos por que le causa dificultad para deglutirlos?</i>	
4. <i>¿Usted tiene que esperar o golpearse para deglutir el alimento?</i>	
<i>Cardiovascular</i>	
<i>Disnea</i>	
<i>Taquicardia</i>	
<i>Astenia/Adinamia</i>	
<i>Somnolencia</i>	
1. <i>Sueño durante el día</i>	
2. <i>Cambios en el sueño</i>	
3. <i>Cefalalgia matutina</i>	
<i>Números de infecciones de vías respiratorias en los últimos 6 meses</i>	
<i>Exploración Física</i>	
<i>Presencia de cataratas u opacidades en el cristalino</i>	<i>Ausente</i>
	<i>Visible</i>
	<i>Madura u Operada</i>
<i>Ptoxis</i>	<i>Normal</i>

	D	I
<i>Fuerza Muscular</i>		
<i>Flexión Cervical</i>	5 4 3 2 1 0	
<i>Extensión Cervical</i>	5 4 3 2 1 0	
<i>Abducción de los Hombros</i>	5 4 3 2 1 0	5 4 3 2 1 0
<i>Extensión de la Muñeca</i>	5 4 3 2 1 0	5 4 3 2 1 0
<i>Flexión de la Muñeca</i>	5 4 3 2 1 0	5 4 3 2 1 0
<i>Pinzar</i>	5 4 3 2 1 0	5 4 3 2 1 0
<i>Flexión de la Cadera</i>	5 4 3 2 1 0	5 4 3 2 1 0
<i>Dorsi-flexión del Tobillo</i>	5 4 3 2 1 0	5 4 3 2 1 0
<i>Fuerza al pinzar Dinamómetro</i>	_____Kgf	_____Kgf

*Escala Médica: 5=Normal 4=Movimientos activos en contra de la resistencia
3=Puede vencer la gravedad 2= Movimientos si elimina la gravedad
1=fluctuación/vestigio 0=No movimiento de ninguno.*

Miotonía Ausente/Solamente a la percusión/Medio/Moderado/Severo

Pulso_____ Presión Arterial_____
Tórax_____ Abdomen_____

	<i>Acostado</i>	<i>Sentado/Sin movimiento</i>
<i>FEV1</i>	_____	_____
<i>FVC</i>	_____	_____

Deglución

Volumen Total (usualmente 100 ml)

Tiempo

No de Tragos

Cantidad de dobles tragos

Toser mientras deglute

ECG Requerido Ritmo

Flutter Auricular

No requerido

Ritmo Intervalo PR

Bloqueos (especificar)

Otros

Otros comentarios

Firma

2. Preparación de Soluciones

Stock

NaCl a 5 mM
SDS al 10%
NaCl Saturado
Etanol absoluto
Etanol al 70%
Agua Bidestilada

Solución TTS:

500 µl de Tris
500 µl de Tritón
15 ml de Sacarosa
30 ml de agua

Soluciones para hibridación del kit GLDM PCRProber™:

Solución de Lavado de Hibridación 1:

35 ml de hybwash A
312 ml de agua estéril desionizada
3.5 ml de hybwash B

Solución de Lavado de Hibridación 2:

7.5 ml de hybwash A
340 ml de agua estéril desionizada
3.5 ml de hybwash B

Buffer de Detección a 1X:

XIV. GLOSARIO

Alelos: Versión específica de un gen que ocupa una localización determinada en el genoma. Se diferencia de otros alelos del mismo gen por ser distinta su secuencia de nucleótidos. En general, uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

Amplificación del ADN: Proceso por el que se generan copias de un fragmento de ADN. Puede producirse *in vivo* o realizarse *in vitro* mediante diversas técnicas.

Cromosoma: Elemento que existe en el núcleo de las células en el momento de su división o mitosis, que contiene el material genético.

Congénito: de carácter hereditario.

Enzima: catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

Enzimas de restricción: enzimas bacterianas que reconocen una secuencia palindrómica específica de nucleótidos en un ADN de doble cadena., rompiendo ambas cadenas. La ruptura se produce dentro del lugar de reconocimiento. Cada una de estas enzimas escinden el ADN siempre en el mismo sitio, en loci específicos o secuencias objetivo. Son las tijeras de la ingeniería genética que abrieron las puertas a la manipulación genética.

Gen: Secuencia de nucleótidos que codifica un producto. Incluye regiones anteriores (5' no traducida; 5' UTR) posteriores (3' no traducida; 3' UTR) a la región codificante, así como secuencias interpuestas (intrones) entre segmentos (exones). Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamado *locus*.

Genotipo: Conjunto de genes de una persona que puede o no expresarse. La contribución genética a la descendencia. La constitución genética de un *locus* particular. Constitución genética de un organismo.

Heterocigoto: Un individuo que ha recibido información genética diferente de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos diferentes de un gen específico.

Homocigoto: Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

Kilobase (Kb): unidad empleada para medir la longitud de los fragmentos de ADN constituidos por una serie de bases. 1 Kb = 1000 bases.

Kilodaltones (kDa): Es una pequeña unidad de masa usado para expresar masas atómicas y masas moleculares. Es definido como 1/16 de la masa del átomo de oxígeno, es decir, cerca de 1.65×10^{-24} gr.

Loci: en latín, plural de locus.

Locus: en genética, punto de un cromosoma ocupado por un gen.

Miotonía: Prolongación de la contracción muscular, voluntaria o no, más allá de su margen normal, retrasando la relajación. Disminuye al repetir el ejercicio muscular.

Multifactorial: Causado por la interacción de múltiples genes y factores del medio ambiente.

Mutación: Cambio en la secuencia de bases nitrogenadas en la molécula de DNA. Variación espontánea o inducida del genoma.

Par de bases (bp): Par de A con T o C con G, en una doble hélice de ADN, que interactúan mediante enlaces de hidrógeno.

Polimorfismo genético: Presencia en una población de dos o más alelos de cualquier sistema, en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Amplificación enzimática de fragmentos de DNA localizado entre un par de iniciadores. La Reacción de la polimerasa en cadena, en la que la ADN polimerasa copia un segmento de ADN, resultando en una enorme amplificación de una muy pequeña muestra. La técnica es ampliamente utilizada en investigación, diagnóstico médico y medicina forense.

Secuenciación: secuenciación de DNA. Determinación del orden en el que se disponen las bases que forman una molécula de DNA. Proceso mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos o de los aminoácidos en una molécula de ácido nucleico o de proteína.

Southern Blot: Nombrado así por Edgard M Southern quien desarrollo este procedimiento. Las moléculas de ADN son transferidas de un gel de agarosa o poliacrilamida a una membrana que posteriormente hibridan con una sonda específica y generalmente marcada con radioactividad, se revela la placa y se observa el patrón de "manchas".

Taq polimerasa: una DNA polimerasa termoestable aislada de una bacteria, utilizada en PCR.

XV. REFERENCIAS

1. Guida Marco, Marger S Richard, Papp C Audrey, Snyder J Pamela, Sedra S Mary, Kissel T John. A Molecular Protocol for Diagnosing Myotonic Dystrophy. *Clin Chem* 1995; 41:69-72.
2. Martorell Loreto, Monckton G Darren, Gamez José, Jonson J Keith, Vich Ignasi, Lopez de Munain Adolfo, et al. Progresión of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 1998; 7:307-312.
3. Mounsey JP, Mistry DJ, Ai CW, Reddy S, Moorman JR. Skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase. *Hum Mol Genet* 2000; 22:9:2313-20.
4. Medica I, Logar N, Peterlin B. Characteristics of myotonic dystrophy in Istria: molecular genetic approach. Part II: Analysis of genetic polymorphisms. *Coll Antropol* 2000; 24:287-94.
5. Siciliano G, Mancuso M, Tedeschi D, Manca ML, Renna MR, Lombardi V, et al. Coenzyme Q10, exercise lactate and CTG trinucleotide expansion in myotonic dystrophy. *Brain Res Bull* 2001; 56:405-10.
6. Harper PS, Johnson K. : " Myotonic Dystrophy". En Scriver, Beaudet, Valle, Sly et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol IV, 8a Ed., 5525-5550 pp. McGraw-Hill, Estados Unidos de América, 2001.
7. Aminoff MJ, Beckley DJ, McIlroy MB. Autonomic function in myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 1985;42:16.
8. Cobo AM, Martinez JM, Pradas J, Baiget M. Análisis Genéticos de Familias Españolas afectas de Distrofia Miotónica. *Neurología* 1990;5:86-91.
9. Ashizawa T, Dubel JR, Harati Y. Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology* 1993; 43:2674-8.
10. Redman JB, Fenwick RG Jr, Fu YH, Pizzuti A, Caskey CT. Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *JAMA* 1993; 269:1960-5.
11. Harper PS, Rivas ML, Bias WB, Hutchinson JR, Dyken PR, McKusick VA. Genetic linkage confirmed between the locus for myotonic dystrophy and the ABH-secretion and Lutheran blood group loci. *Am J Hum Genet* 1972; 24:310-6.
12. Harley HG, Brook JD, Rundle SA, Crow S, Reardon W, Buckler AJ, et al. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 1992; 355:545-6.

13. Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Van Tongeren T, Aslanidis C, et al. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 1992; 355:547-8.
14. Aslanidis C, Jansen G, Amemiya C, Shutler G, Mahadevan M, Tsilfidis C, et al. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature* 1992; 355:548-51.
15. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992; 255:1256-8.
16. Ashizawa T, Dubel JR, Dunne PW, Dunne CJ, Fu YH, Pizzuti A, Caskey CT, et al. Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology* 1992; 42:1877-83.
17. Koch MC, Grimm T, Harley HG, Harper PS. Genetic risks for children of women with myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 1991 Jun;48:1084-91.
18. Die-Smulders CEM, Jennekens FGI, Höweler CJ.: " Myotonic Dystrophy Type 1". En Cassidy SB, Allanson JE. *Management of Genetic Syndromes*. 2a Ed., 351-367pp Willey-Liss, Estados Unidos de América, 2005.
19. Siciliano G, Manca M, Gennarelli M, Angelini C, Rocchi A, Iudice A, et al. Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis. *Clin Genet* 2001; 59:344-9.
20. de Die-Smulders CE, Howeler CJ, Thijs C, Mirandolle JF, Anten HB, Smeets HJ, et al. Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain* 1998; 121:1557-63.
21. Gibbs JW, Ciafaloni E, Radtke RA. Excessive daytime somnolence and increased rapid eye movement pressure in myotonic dystrophy. *Sleep* 2002; 25:662-5.
22. Whittaker RG, Ferenczi E, Hilton-Jones D. Myotonic dystrophy: practical issues relating to assessment of strength. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77:1282-3.
23. Larkin K, Fardaei M. Myotonic dystrophy--a multigene disorder. *Brain Res Bull* 2001; 56:389-95.
24. O'Brien TA, Harper PS. Course, prognosis and complications of childhood-onset myotonic dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 1984; 26:62-7.
25. Rittler M, Feld V, Montagno M. Distrofia Miotonica Congenita *Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá* 1997; 15:34-40.

26. Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2005; 15:5-16.
27. Longman C. Myotonic dystrophy. *J R Coll Physicians Edinb* 2006; 36:51–55.
28. Bouhour F, Bost M, Vial C. Maladie de Steinert. *Presse Med* 2007; 36 :965-971.
29. Gaul C, Schmidt T, Windisch G, Wieser T, Müller T, Vielhaber S, et al. Subtle cognitive dysfunction in adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2). *Neurology* 2006; 67:350-2.
30. Giorgio A, Dotti MT, Battaglini M, Marino S, Mortilla M, Stromillo ML, et al. Cortical damage in brains of patients with adult-form of myotonic dystrophy type 1 and no or minimal MRI abnormalities. *J Neurol* 2006; 253:1471-7.
31. Harper PS, Harley HG, Reardon W, Shaw DJ. Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem. *Am J Hum Genet* 1992; 51:10-6.
32. Thornton CA, Robert C, Moxley III RT. Myotonic Dystrophy with No Trinucleotide Repeat Expansion. *Ann Neurol* 1994; 35:269-272.
33. The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC). New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neurology*. 2000; 54:1218-21.
34. O'Hoy KL, Tsilfidis C, Mahadevan MS, Neville CE, Barcelo J, Hunter AG, et al. Reduction in size of the myotonic dystrophy trinucleotide repeat mutation during transmission. *Science* 1993; 259:809-12.
35. Tapscott SJ. Deconstructing myotonic dystrophy. *Science* 2000; 289:1701-2.
36. Ranun LPW, Day JW. Myotonic Dystrophy: RNA Pathogenesis Comes into Focus. *Am J Hum Genet* 2004; 74:793-804.
37. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 2000; 289:1769-73.
38. Wang Yuh-Hwa, Amirhaeri Sorour, Kang Seongman, Wells Robert D, Griffith Jack D. Preferential Nucleosome Assembly at DNA Triplet Repeats from the Myotonic Dystrophy Gene. *Science* 1994; 265:669-671.
39. Otten AD, Tapscott SJ. Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5465-9.

40. Harper Peter S., van Engelen Baziel G. M., Eymard Bruno, Wilcox E Douglas . Myotonic Dystrophy: Present Management, Future Therapy. 1era Edición, Oxford university Press, Gran Bretaña 2004.
41. Sato S, Nakamura M, Cho DH, Tapscott SJ, Ozaki H, Kawakami K. Identification of transcriptional targets for Six5: implication for the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2002; 11:1045-58.
42. Cooper TA. A reversal of misfortune for myotonic dystrophy? *N Engl J Med* 2006; 355:1825-7.
43. Weeler TM, Krym MC, Thornton CA. Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromusc Disor* 2007; 17:242-247.
44. Nakamori M, Kimura T, Fujimura H, Takahashi MP, Sakoda S. Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle & Nerve* 2007; [Epub ahead of print].
45. Huichalaf CH, Sakai K, Wang GL, Timchenko NA, Timvhenko L. Regulation of the promoter of CGU triplet repeat binding protein, Cugbp1, during myogenesis. *Gene* 2007; 396:391-402.
46. Davis MB, McCurrach ME, Taneja LK, Singer RH, Housman DE. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:7388-7393.
47. Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA. Disruption of Splicing Regulated by a CUG-Binding Protein in Myotonic Dystrophy. *Science* 1998; 280:737-741.
48. Current Protocols in Molecular Biology, Cap. 2.
49. Mathieu J, Boivin H, Meunier D, Gaudreault M, Bégin P. Assesment of a disease-specific muscular impairment rating scale in myotonic dystrophy. *Neurlogy* 2001; 56:336-340.
50. Harley HG, Rundle SA, MacMillan JC, Myring J, Brook JD, Crow S, Reardon W, Fenton I, Shaw DJ, Harper PS. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 1993; 52:1164-74.
51. Marchini C, Lonigro R, Verriello L, Pellizzari L, Bergonzi P, Damante G. Correlations between individual clinical manifestations and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 2000; 57(1):74-82.
52. Ansved T, Edstrom L, Grandell U, Hedberg B, Anvret M. Variation of CTG-repeat number of the DMPK gene in muscle tissue. *Neuromuscul Disord* 1997; 7:152-5.

53. Hamshere MG, Harley H, Harper P, Brook DJ, Brookfield JFY. Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J Med Genet* 1999; 36:59-61.
54. Jansen G, Willems P, Coerwinkel M, Nillesen W, Smeets H, Vits L, Höweler C, Brunner H, Wieringa B. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* 1994; 54:575-85.
55. Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Johnson KJ, Gich I, Lopez de Munain A, Baiget M. Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 1998; 7:307-12.
56. Lai CY, Chan KY, Khoo US, Ngan HY, Xue WC, Chiu PM, Tsao SW, Cheung AN. Analysis of gestational trophoblastic disease by genotyping and chromosome in situ hybridization. *Mod Pathol* 2004; 17:40-48.
57. Fokstuen S, Myring J, Meredith L, Ravine D, Harper PS. Eight years' experience of direct molecular testing for myotonic dystrophy in Wales. *J Med Genet* 2001; 38:E42.
58. Goodship J, Gibson DE, Burn J, Honeyman J, Cubey RB, Schofield. Genetic Risk for Children of Women with Myotonic Dystrophy. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1340-1341.