



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA

“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA” IAP

CARACTERIZACION CLÍNICA Y GENÉTICA DE LA DISTROFIA MUSCULAR

OCULOFARÍNGEA EN POBLACIÓN MEXICANA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN LA ESPECIALIDAD DE OFTALMOLOGÍA

PRESENTA:

DAVID RIVERA DE LA PARRA

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ

MÉXICO D.F. Agosto 2009

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. ENRIQUE GRAUE WIECHERS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA “FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”

DRA. CLAUDIA MURILLO CORREA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA “FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”

DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
DIRECTOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA UNAM
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido la vida y lo que esto implica...

A mis padres, a quienes les debo no solo la vida sino todo lo que tengo, incluyendo el apoyo incondicional que me llevo hasta donde estoy, les agradezco todos los desvelos, las correcciones, las llamadas, y el esfuerzo de todos y cada uno estos años que mantuvo de pie a la familia y a sus sueños, dentro de los que estaba el culminar este ciclo que hoy concluye. Les agradezco todo lo que he aprendido de ellos no solo en la escuela, sino fuera de ella también y que llevaré por el resto de mis días.

A Ligia quien sin saberlo siempre estaba cerca de mi apoyándome con su manera de ser y hacer siempre lo correcto, nunca dándose por vencida y sabiendo yo que contaba con su apoyo para lo que se necesitara a cualquier momento.

A mi abuelo y al resto de mi familia que siempre me dieron apoyo cuando lo necesité por lo que les agradezco infinitamente.

A todos mis profesores a quienes les debo mi formación profesional y a quienes llevaré en cada una de mis acciones, les agradezco, porque sin ellos no hubiera llegado a donde estoy ahora.

A todos mis amigos y compañeros, Angel, Sergio, y a todos los compañeros de la preparatoria que aunque los veo muy poco, siempre serán parte esencial del camino que me trajo aquí.

A todos los compañeros de la carrera, a Enrique, Gisela, Ana Laura, Arturo y a todos los que no cito por cuestión de espacio, pues fueron ellos quienes le

dieron color a este camino, sin ellos nada hubiera sido posible y nunca los olvidaré.

A los 16 increíbles residentes, es decir a Martha (mi eterna compañera de medicina), Luis, Mario, Fiona, Cinthya, Erandi, Tania, Federica, Mónica, Zori, Ale, Brenda, Diana, Karla, Itzel y Judith; que tuve el gusto de tener como compañeros así como a los residentes de otras instituciones con quienes tuve el placer de cursar esta aventura. ¡Vamos equipo vamos!

Agradezco a cada uno de los pacientes que han confiado en mí y que me han aportado mucho conocimiento.

Agradezco también al Doctor Zenteno, persona fundamental para este protocolo, a toda la Unidad de Investigación y a todo el equipo que estuvo involucrado en este trabajo, que me apoyaron tremendamente para la realización del mismo.

Por último agradezco a todas las personas que confiaron en mí, a quienes prometo hacer mi mejor esfuerzo para no fallarles.

Índice

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y METODOS	22
<i>PACIENTES</i>	22
<i>EXTRACCIÓN DE DNA GENOMICO DE SANGRE PERIFÉRICA</i>	24
<i>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO ..</i>	25
<i>AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN PABPN1 Y POLIMORFISMOS (RS2239579 Y SNP2622)</i>	25
<i>SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DIRECTA DE LOS PRODUCTOS DE PCR ..</i>	27
<i>CLONACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN PABPN1</i>	28
<i>TRANSFORMACIÓN DE CELULAS COMPETENTES</i>	29
<i>SECUENCIACION DE LOS PRODUCTOS CLONADOS DEL GEN PABPN1</i>	30
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	30
RESULTADOS:	31
DISCUSIÓN.	40
REFERENCIAS	45
ANEXOS.....	52
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	55

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La distrofia muscular oculofaríngea (DMOF) es una forma genética de distrofia muscular que se inicia en la edad adulta y que se caracteriza por la triada de ptosis palpebral, dificultad para la deglución y debilidad muscular distal de progresión lenta. La enfermedad, que tiene una transmisión hereditaria autosómica dominante, fue descrita inicialmente por Taylor en 1915 en 4 miembros de una familia Franco-Canadiense (Taylor, 1915) que presentaban ptosis de inicio tardío asociada a dificultad para la deglución, ambas atribuidas a una neuropatía craneal progresiva. En 1962, Victor y col. se refirieron por primera vez a este trastorno como distrofia muscular oculofaríngea y demostraron el carácter miopático y hereditario de la enfermedad (Victor et al. 1962). En la actualidad se han descrito casos de DMOF en más de 30 países (Brais, 2003) y la prevalencia de la enfermedad ha sido estimada desde 1 en 700 en Judíos Bukhara residentes en Israel, 1 en 1,000 en la provincia de Québec, en Canadá, hasta 1 en 200,000 en Francia (Brais et al. 1998).

La DMOF se manifiesta generalmente en la quinta o sexta década de la vida presentándose con dos síntomas cardinales: ptosis palpebral y disfagia, ambas con un curso lentamente progresivo. En la mayoría de los casos, la ptosis es el primer síntoma e inicialmente la afección muscular está restringida a los músculos elevador del párpado y faríngeos pero a medida que la enfermedad progresa, se presenta afección de los movimientos oculares y ocasionalmente, diplopía. Sin embargo, la oftalmoplegia externa total es infrecuente. La ptosis lleva consigo una retroflexión refleja de la cabeza del paciente, que resulta en estrechamiento de la vallecula y una disminución en la relajación del esfínter esofágico superior, lo cual agrava la disfagia proporcionalmente

con el grado de retroflexión de la cabeza. (de Swart, 2006). Con el tiempo, la disfagia lleva a malnutrición y puede causar la muerte debido a neumonía por aspiración. Otros síntomas y signos se asocian con involucro miopático de otros músculos, como por ejemplo la inexpressión facial (Figura 1). La mayoría de los pacientes desarrollan voz nasal debido a debilidad palatina y en casi todos se observa debilidad y atrofia de la lengua (Bouchard et al. 1997). Cuando la ptosis ya es evidente, es frecuente observar también compromiso de los músculos faciales medios, temporales y maseteros.



Figura 1.- características faciales de la DMOF. Nótese la ptosis bilateral y la facies inexpressiva por afección de la musculatura facial en una paciente de 64 años evaluada en el Instituto de oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

La debilidad también ocurre con frecuencia en los músculos de la cintura pélvica y en menor grado en los de la cintura de hombros. Hasta recientemente, la muerte ocurría como resultado de neumonía por aspiración o malnutrición. Con el progreso en el tratamiento de la disfunción faríngea (miotomía cricofaríngea endoscópica) y de mejores esquemas de nutrición, la expectativa de vida de los pacientes es mayor y el pronóstico y la calidad de vida han sido mejorados importantemente (Becher et al. 2001).

Patología: Los cambios histopatológicos observados en las fibras de los músculos extraoculares y otros músculos voluntarios varían de acuerdo al estadio de la enfermedad y a los músculos examinados. Probablemente todos los músculos esqueléticos están involucrados, pero estudios de autopsia han demostrado que los músculos extraoculares, linguales, faríngeos y diafragmáticos están más severamente afectados (Schmit y Krause, 1981; Little y Perl, 1982). Los músculos estudiados utilizando métodos histológicos clásicos muestran cambios que son comunes a muchas distrofias musculares e incluyen pérdida de fibras musculares, variación anormal del tamaño de las fibras musculares, aumento en el número de núcleos y fibrosis intersticial y de tejido graso aumentadas. Es poco común observar fibras necrosadas o sufriendo fagocitosis. Los estudios histoquímicos de secciones congeladas revelan dos cambios particulares: (1) fibras pequeñas anguladas que reaccionan fuertemente a enzimas oxidativas; y (2) vacuolas con bordes o “ribeteadas” dentro de las fibras musculares. Aunque la presencia de fibras anguladas pequeñas sugiere un proceso de denervación subyacente, su ocurrencia puede atribuirse simplemente a envejecimiento. Las vacuolas ribeteadas consisten de espacios irregulares claros redondos o poligonales rodeados por un anillo de material basofílico (en la tinción con hematoxilina y eosina) y tiñen de rojo con la tinción tricrómica de Gomori (Figura 2).

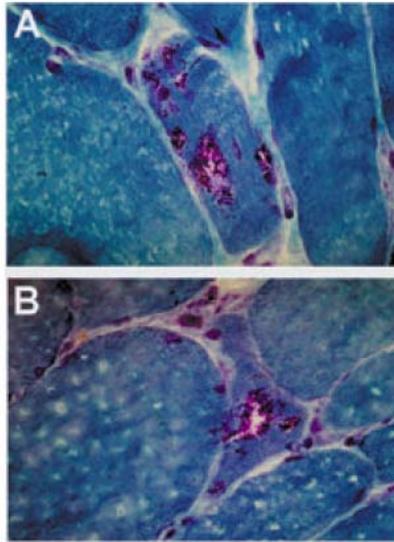


Figura 2.- Vacuolas ribeteadas intrafibrilares que se tiñen de rojo con la tinción tricrómica de Gomori (tomado de Pau-Serradell et al. 2004).

Las vacuolas ribeteadas tienen actividad de fosfatasa ácida y su análisis mediante micrografía electrónica ha demostrado que son de carácter autofágico, varían en tamaño y apariencia y contienen estructuras membranosas y mieloides, gránulos de glicógeno y restos no identificados de ruptura de componentes moleculares desconocidos (Brais, 2003). Las vacuolas ribeteadas se han observado en otras enfermedades, particularmente en la miositis con cuerpos de inclusión (Lotz et al. 1989). Sin embargo, su identificación en una biopsia muscular apoya un diagnóstico clínico de DMOF.

El cambio ultraestructural más importante es la presencia de filamentos tubulares intranucleares con diámetro de entre 3 y 8.5 nanómetros. Estos filamentos

están dispuestos en varias direcciones y frecuentemente forman palizadas. La frecuencia de núcleos con inclusiones intranucleares filamentosas varió entre 2 y 5% en un estudio de 29 casos (Tomé et al. 1997). Estas inclusiones ocurren en los núcleos de células musculares y no se han demostrado en el núcleo de ninguna otra célula en los sujetos afectados. Los estudios morfológicos de biopsias de nervios periféricos de dos pacientes ancianos con DMOF mostraron cambios sugestivos de una neuropatía axonal (Boukriche et al. 2002), sin embargo los estudios de autopsia no han demostrado afección del sistema nervioso central (Tomé et al. 1997; Bouchard et al. 1997). Verheesen y col en el 2006 demostraron que la expresión de un anticuerpo intracelular específico (para el segmento de aminoácidos 113-133 que forma la α -hélice de la proteína *PABPN1* mutada) en un modelo de células HeLa de DMOF previene las inclusiones intranucleares así como también disminuye las ya previamente formadas, lo que indica que las inclusiones son reversibles, sin presentar la célula algún efecto citotóxico por la presencia de este anticuerpo. La concentración de *PABPN1* no se ve alterada por la presencia del anticuerpo, no así la agregación intranuclear. Se cree que esto es debido a que el anticuerpo al fijarse evita que esta porción de la proteína interaccione con otras moléculas (Verheesen et al. 2006).

En resumen, los datos histopatológicos musculares en los afectados típicamente incluyen variación anormal del tamaño de las fibras, presencia de fibras anguladas pequeñas y atróficas y presencia de vacuolas “ribeteadas” basofílicas en citoplasma (Fardeau y Tome, 1997).

Genética molecular: Se han descrito formas autosómicas dominantes (OMIM 164300) y autosómicas recesivas (OMIM 257950) de DMOF, aunque la transmisión dominante es por mucho la más frecuente en las familias afectadas. El locus de la DMOF fue localizado inicialmente en 14q11 por medio de análisis de ligamiento en una numerosa familia franco-canadiense afectada (Brais et al. 1995). Utilizando una estrategia de clonación posicional se logró la identificación de expansiones cortas (GCG)₈₋₁₃ en el gen *PABPN1* (por las siglas en inglés de *polyalanine binding protein nuclear 1*) en todos los casos dominantes de DMOF (Brais et al. 1998). Estas mutaciones consisten de expansiones mitóticamente y meióticamente estables del repetido (GCG)_n en el primer exón del gen, estos repetidos de GCG codifican cada uno para una alanina en la proteína final. Las mutaciones dominantes consisten en la adición de 2 a 7 repetidos (GCG) al tracto normal de (GCG)₆. Hasta la fecha se han reconocido seis diferentes tamaños de mutación que originan de 8-13 repetidos de GCG. En un estudio que agrupó a 81 familias con DMOF, Brais y col. identificaron los siguientes tamaños de expansión: 5% (GCG)₈, 40% (GCG)₉, 26% (GCG)₁₀, 21% (GCG)₁₁, 7% (GCG)₁₂ y 1% (GCG)₁₃ (Brais et al. 1998) El porcentaje relativo puede variar de una población a otra pero en poblaciones con efecto fundador como en Franco-canadienses o Judíos Bukhara, la mayoría de las familias comparten la misma mutación histórica (Brais, 2003).

Dos estudios han postulado la posibilidad de que algunas mutaciones en DMOF no se deban a expansiones del tracto GCG sino que sean secundarias a inserción de tripletes no idénticos que codifican para alanina (Scacheri et al. 1999; Nakamoto et al. 2002). Se ha sugerido que ambos tipos de mutación se deben a entrecruzamiento

desigual ya que éste es el mecanismo mas importante de expansión en otras enfermedades por polialaninas (Warren, 1997).

La dosis génica tiene una influencia clara en la edad de inicio y en la severidad del fenotipo de la DMOF (Brais et al, 1998). El fenotipo más severo de DMOF ha sido observado en sujetos homocigotos para mutaciones dominantes de *PABPN1* (Blumen et al. 1999). El estudio de 4 homocigotos Franco-canadienses y de 3 homocigotos Bukhara reveló que en promedio la enfermedad se inicio 18 años antes que en heterocigotos (GCG)₉. La severidad del fenotipo dominante de DMOF también es variable. Los casos severos tienen un inicio más temprano, antes de los 45 años, de la ptosis y la disfagia, mientras que la debilidad proximal de miembros inferiores inicia antes de los 60 años. En una cohorte extensa de pacientes franco-canadienses con expansión (GCG)₉, 5-10% presentaron un fenotipo severo. Aproximadamente 20% de estos casos severos son heterocigotos compuestos para la mutación dominante con un polimorfismo (GCG)₇ en el otro alelo (Brais et al. 1998) Este polimorfismo tiene una prevalencia del 1-2% en Norteamérica, Europa y Japón. También en Italia y en Inglaterra han sido identificados pacientes heterocigotos compuestos con un fenotipo de DMOF más severo (Mirabella et al. 2000; Hill et al. 2001). La causa de la severidad aumentada en el restante 80% se desconoce. De manera interesante, los casos severos se agregan en familias, sugiriendo que otros factores genéticos son moduladores de la severidad. Los fenotipos severos observados en homocigotos y heterocigotos compuestos para una mutación dominante y una recesiva sugieren un claro efecto de dosis génica.

El fenotipo clínico de DMOF recesiva es similar, pero tiene una edad de inicio mayor. El único caso de DMOF de herencia autosómica recesiva confirmado genéticamente fue el de un homocigoto portador de dos mutaciones (GCG)₇ (Brais et al. 1998). De este modo, el alelo (GCG)₇ es un ejemplo de un polimorfismo que puede actuar como un modificador de un fenotipo dominante o como una mutación recesiva.

Un reporte de 3 familias Hispano-Americanas encontró que todos los afectados presentaban el alelo (GCG)₉ (Grewal et al. 1999). En contraste, un estudio reciente en familias Uruguayas con DMOF encontró una alta frecuencia del alelo (GCG)₁₁, por un efecto fundador de un ancestro que arribó de las Islas Canarias en el siglo XIX. El origen común de la mutación en esta población se demostró mediante un análisis de segregación familiar mediante la existencia de un haplotipo ancestral que relaciona los SNPs rs2239579(C) y SNP2622(C) con el genotipo (GCG)₁₁. La edad de esta mutación fue estimada en 37-53 generaciones usando los polimorfismos antes mencionados en un análisis (Rodríguez et al. 2005). Interesantemente, dos familias españolas en las que se demostró el alelo (GCG)₁₁ eran originarias de las Islas Canarias (Pou-Serradell et al. 2004).

En un estudio reciente en 7 familias españolas se concluyó que el alelo (GCG)₉ confería fenotipos más severos que los ocasionados por los alelos (GCG)₁₀ y (GCG)₁₁ (Pou-Serradell et al. 2004), Hill et al en el 2001 encontraron que el inicio de los síntomas se iniciaba a edades más tempranas en pacientes con mayor número de repetidos. Esta correlación se dedujo porque en su estudio los pacientes con (GCG)₁₃ iniciaron la sintomatología a los cuarentas, mientras que los pacientes que encontraron con (GCG)₈ lo iniciaron a los setentas. Sin embargo, como se ha sugerido en otras

series, los autores estiman que es necesario el estudio de cohortes mas numerosas y de otras poblaciones para atribuir definitivamente una correlación genotipo-fenotipo

Por otro lado, se han descrito casos excepcionales de DMOF con mutaciones por inserción o duplicaciones tales como $(GCG)_6 + GCA(GCG)_2$, $+GCA(GCG)_3$, $+(GCA)_2(GCG)_2$ o $+(GCA)_3(GCG)_2$ (Scacheri et al. 1999; Nakamoto et al. 2002; Van der Sluijs et al. 2003; Robinson et al. 2005).

La identificación de expansiones de repeticiones de trinucleótidos en genes específicos ha sido demostrada en varias enfermedades neurológicas hereditarias; sin embargo, la expansión en *PABPN1* en la DMOF es inusual en varios aspectos: (1) la expansión es modesta, aumentando de $(GCG)_6$ en sujetos normales a solo $(GCG)_{8-13}$ en los afectados; (2) la repetición es estable durante la mitosis y la meiosis, lo que sugiere que el mecanismo de expansión es diferente al de las otras enfermedades por expansión de tripletes (Robinson et al. 2005); (3) en la muy poco frecuente forma autosómica recesiva de la enfermedad, los afectados son homocigotos para el repetido $(GCG)_7$, un alelo que se observa en 2% de la población Franco-canadiense normal.

Después de la identificación del gen mutado en la DMOF, se ha realizado un trabajo extenso en la identificación de otras moléculas presentes en las inclusiones filamentosas intranucleares. La proteína *PABPN1* mutada ha demostrado ser parte integral de las inclusiones en músculo en la DMOF (Becher et al. 2000; Blumen et al. 1999). Las inclusiones nucleares DMOF-específicas están decoradas con anticuerpos anti-*PABPN1* bajo inmuno-microscopía electrónica. Las inclusiones también están decoradas con anticuerpos dirigidos contra subunidades de ubiquitina y proteasomales (Calado et al. 2000). Estas observaciones sugieren que las expansiones de polialanina

en *PABPN1* inducen alteraciones en el plegamiento y precipitación de proteínas marcadas por ubiquitina que no pueden ser degradadas por la maquinaria proteasomal. Interesantemente, se encontró que las inclusiones nucleares secuestran RNA poliadenilado (Calado et al. 2000).

Expansión	Porcentaje
(GCG) ₈	3%
(GCG) ₉	69%
(GCG) ₁₀	13%
(GCG) ₁₁	11%
(GCG) ₁₂	3%
(GCG) ₁₃	1%

Tabla 1: Frecuencias en porcentaje de expansiones GCG de *PABPN1* en 144 familias con DMOF de diferentes poblaciones (Brais, 2003).

Patogénesis: El conocimiento actual de la función de *PABPN1* lleva a proponer diferentes hipótesis acerca de la patogénesis de la enfermedad. A nivel de la proteína, las mutaciones en DMOF causan el alargamiento del dominio de polialanina N-terminal. *PABPN1* es una proteína nuclear abundante, implicada en la poliadenilación de todos los RNAs mensajeros (Wahle et al. 1993; Nemeth et al. 1995). *PABPN1* tiene al menos 4 dominios distintos: polialanina, de unión a RNA, dimerización, y señal de localización nuclear. Aunque el motivo de reconocimiento de RNA de *PABPN1* está altamente conservado en muchas especies, el dominio de polialaninas de longitud variable se

encuentra solo en algunos vertebrados, incluyendo al *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Xenopus laevis*. *PABPN1* es una proteína nuclear abundante de aproximadamente 49 kDa que se une con gran afinidad a las colas de poli (A) nacientes en el extremo 3' de los RNAs mensajeros. La cola de poli-A es añadida post transcripcionalmente al RNAm por diversas proteínas. Cuando han sido añadidos 10-11 nucleótidos a la cola de poli (A), oligómeros de *PABPN1* se unen a la cola de poli (A) y estimulan su elongación (Wahle et al. 1991). Cuando la cola alcanza aproximadamente 250 nucleótidos, la elongación se hace lenta, probablemente por un mecanismo de conteo mediado por *PABPN1* (Wahle, 1995). Se ha demostrado que *PABPN1* viaja entre el núcleo y citoplasma (Chen et al. 1995). La exportación nuclear de *PABPN1* es sensible a temperatura y depende de la unión del RNA. La importación nuclear de *PABPN1* es un proceso activo mediado por *transportina* (Calado et al. 2000).

Se han propuesto varios modelos de patogénesis por ganancia de función y toxicidad de polialaninas (Brais et al. 1998b, Galvao et al. 2001). En estos modelos, se sugiere que *PABPN1* porta un dominio expandido de polialaninas patogénico con características físicas que causan su acumulación e interfieren con procesos celulares normales. Los oligómeros de polialanina son muy resistentes a degradación tanto in vitro como in vivo. Los oligómeros de polialanina que contienen más de 8 residuos consecutivos forman fibrillas espontáneamente (Billingsley et al. 1994).

Otra posible explicación a la patogénesis de las enfermedades es que los dominios expandidos de *PABPN1* polimerizan para formar hojas beta estables que son resistentes a la degradación proteasomal nuclear. La polimerización de *PABPN1* ha demostrado ser muy importante para la formación de las inclusiones filamentosas

nucleares y su toxicidad, como se demuestra en estudios de transfección en los que la remoción del dominio de oligomerización redujo la toxicidad e impidió la formación de las inclusiones filamentosas intranucleares (Fan et al. 2001).

Corbeil-Girard et al. en el 2005 describieron en un modelo de células humanas infectadas por adenovirus que expresaban *PABPN1* mutada y normal, que la sobre expresión de *PABPN1* normal puede llegar a formar inclusiones intranucleares cuando se expresa en grandes cantidades. También demostró que en las células afectadas por DMOF con agregados intranucleares, había 202 genes que se veían afectados en su expresión, el 51% a la alta y el 49% a la baja. Se reconoció que algunos de los productos de los genes que se sobre-expresaban, eran de localización intranuclear, y algunos de estos se encontraban secuestrados en las inclusiones intranucleares (entre ellos factores de transcripción). Esto llevo a proponer que una probable vía de daño en la DMOF sea la falta de función de proteínas que se encuentran secuestradas en las inclusiones intranucleares lo que compromete la función celular.

Diagnóstico y tratamiento: Hasta antes de la identificación de mutaciones en *PABPN1* en la DMOF, el diagnóstico se basaba en la evaluación clínica y la presencia de los datos histopatológicos clásicos de la enfermedad (Tomé y Fardeau, 1994). Este abordaje ha sido reemplazado por el diagnóstico por DNA (Brais et al. 1998). Debido a que las formas dominante y recesiva de la DMOF son alélicas, el diagnóstico de ambos tipos es posible. La prueba tiene una especificidad cercana al 100%. Las principales

indicaciones para el diagnóstico por DNA en individuos sintomáticos son: (1) confirmación del diagnóstico en una familia sin estudio molecular previo; (2) cuadro clínico que presenta un dilema diagnóstico; (3) evaluación del tamaño de la mutación como posible indicador de severidad; (4) exclusión del estado de heterocigoto compuesto en un paciente con una forma severa, de inicio temprano; y (5) posibilidad de DMOF recesiva (Brais, 2003).

La severidad de la disfagia que se presenta en la DMOF se clasifica en leve, marcada, moderada y severa utilizando la clasificación desarrollada por Duranceau (Duranceau A. Pharyngeal and cricopharyngeal Disorders. In: Pearson GF, ed. Esophageal surgery. New York: Churchill Livingstone, 1995:389–415.) (Tabla 2).

SCORE DE SÍNTOMAS APLICADOS A LA DISFAGIA OROFARÍNGEA				
VARIABLE	UN PUNTO	DOS PUNTOS	TRES PUNTOS	CUATRO PUNTOS
1. FRECUENCIA	OCASIONAL (MENOS DE UNA VEZ AL MES)	MAS DE UNA VEZ AL MES PERO MENOS DE UNA VEZ A LA SEMANA	MAS DE UNA VEZ A LA SEMANA PERO NO DIARIO	DIARIO
2. DURACIÓN	< 6 MESES	>6 MESES, < 24 MESES	> 24 MESES, < 60 MESES	>60 MESES
3. SEVERIDAD	LEVE, SIN AFECTACIÓN	MODERADA, ALTERA LA CALIDAD DE VIDA	MARCADA, INTEFIERE CON UNA VIDA NORMAL	SEVERO, EXPERIENCIA TERRIBLE
PARA CALCULAR, SUMAR LA FRECUENCIA A LA DURACIÓN Y MULTIPLICARLO POR LA SEVERIDAD: 1-7 LEVE, MODERADA 8-15, 16-23 MARCADA, 24-32 SEVEROS				

Tabla 2: Índice de severidad para la disfagia orofaríngea

Debe tenerse mucho cuidado al solicitar un examen de DNA en un individuo asintomático; debido a que no existe tratamiento preventivo, no está claro si estos individuos se beneficiarán con la prueba. El examen pre-sintomático debe ofrecerse en un contexto en el que puedan ofrecerse consejo genético y apoyo psicológico.

No existe tratamiento médico disponible para la DMOF. Se recomienda la ingesta de una dieta alta en proteínas, particularmente a medida que la disfagia se vuelve más severa y los pacientes no pueden ingerir carne. Se recomienda la ligera anteroflexión de la cabeza durante las comidas ya que esta acción mejora la deglución, reduce el tiempo necesario para la ingesta de sólidos y líquidos, además de que reduce el riesgo de broncoaspiración. (de Swart, 2006). Debe ponerse especial atención para prevenir el auto-retiro social de los pacientes debido a la progresión de la disfagia. La neumonía por aspiración es una causa frecuente de muerte por lo que los afectados deben ser advertidos de buscar atención médica en caso de tos productiva acompañada de fiebre. Deben promoverse los ejercicios que mantengan una adecuada función cardiovascular sin llegara a la ejercitación extenuante. Los pacientes con cuadros severos pueden requerir silla de ruedas.

Actualmente, solo se dispone de tratamientos quirúrgicos para corregir algunos de los síntomas de la DMOF. Existen dos tipos de cirugías para corregir la ptosis con buenos resultados: resección de la aponeurosis del elevador palpebral y suspensión frontal de los párpados (Codère et al. 2001). La cirugía se recomienda cuando la ptosis interfiere con la visión o aparece dolor cervical debido a la constante dorsiflexión del cuello. La corrección quirúrgica de la disfagia debe considerarse cuando existe disfagia severa, pérdida importante de peso o neumonía recurrente. La miotomía cricofaríngea alivia los síntomas en la mayoría de los casos. Desafortunadamente, la disfagia puede reaparecer lentamente con el tiempo. La disfonía severa y la incompetencia del esfínter esofágico inferior son contraindicaciones de la cirugía (Duranceau, 1997). Se ha descrito que en las cirugías de estos pacientes durante el bloqueo neuromuscular con

cistracurio no hay diferencias en el tiempo de recuperación entre los pacientes afectados y controles sanos con cirugías similares. En un subgrupo de ese mismo estudio se demostró que no había diferencias en la duración del efecto del cistracurio entre pacientes con diferentes grados de severidad de la DMOF. (Caron et al, 2005)

Existen varias propuestas de probables tratamientos, entre ellos el trasplante autólogo de células satélite musculares (V. Mouly et. al. 2005), o la terapia anti-agregante. Sobre esta, un estudio en modelos murinos de DMOF demostró que la doxiciclina disminuía la agregación intranuclear, retrasaba las deficiencias motoras y disminuía los niveles de BAX, una molécula proapoptica que está elevada en este modelo de DMOF y en el cual se demostró también que al inhibir la cascada apoptótica se disminuía la muerte celular.(Davies et al. 2005).

La trealosa es un disacárido que se ha descrito como regulador del plegamiento y agregación de algunas proteínas en modelos de Amiloide y Huntington y recientemente ha demostrado disminuir la agregación y por lo tanto la toxicidad de *PABPN1* mutante en un modelo murino. A la trealosa se le considera una chaperona química y demostró aumentar la eliminación de *PABPN1* mutante por vía proteasomal (Davies et al 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no existen reportes sobre las características genotípicas de los pacientes con diagnóstico de DMOF ya sea sobre el número de repetidos y su prevalencia o cual es la mutación más frecuente en nuestro medio, se sabe que la mutación predominante varía según la población estudiada así, los reportes españoles reportan (GCG)₉, (GCG)₁₀ y (GCG)₁₁ repetidos de GCG (Pou-Serradell et al. 2004), los Uruguayos reportan (GCG)₁₁ como su alelo de mayor prevalencia (Rodríguez et al. 2005) y los canadienses el (GCG)₉ como el más frecuente (Brais et al. 2003). Por lo que establecer la mutación más prevalente en población Mexicana, contribuye a la caracterización genético-poblacional de la DMOF.

La distrofia muscular oculofaríngea es una de las pocas enfermedades por repetición de triplete en la que se desconoce si existe una correlación entre la severidad del fenotipo y el tamaño de la mutación. Es claro, sin embargo que la severidad de la enfermedad varía aún con portadores de la misma mutación por expansión en *PABPN1*. Los estudios preliminares no han demostrado si el tamaño de la mutación influencia la severidad del fenotipo, al menos cuando se considera la edad de inicio (Mirabella et al. 2000; Hill et al. 2001; Muller et al. 2001). Solo los sujetos con el alelo (GCG)₈ presentan un fenotipo claramente más leve, con una edad de inicio mayor en la 7ª década de la vida y presencia de ptosis y disfagia leves (Brais et al. 1998b; Hill et al. 2001). La comparación de cohortes extensas de portadores de diferentes expansiones en diversas poblaciones permitirá establecer si existe o no una correlación entre el tamaño de la expansión y la severidad de la DMOF.

OBJETIVOS

- Identificar los alelos mutantes (GCG)_n más frecuentes en una muestra de pacientes mexicanos con distrofia muscular oculofaríngea.
- Establecer una correlación entre la expansión (GCG)_n y la edad de inicio y/o severidad de la sintomatología.
- Identificar posible (s) efecto(s) fundador (es) entre las diferentes familias con la enfermedad en México.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

Se incluirán sujetos con diagnóstico confirmado o con sospecha diagnóstica de DMOF a los que se les realizará historia clínica completa, genealogía lo mas extensa posible y llenado de la Hoja de Recolección de datos (anexo I). Una vez realizado el estudio molecular de la expansión GCG, se eliminarán del estudio aquellos sujetos que presenten un número de repetidos (GCG)₆ normal en los dos alelos de *PABPN1*. En las familias en que se identifiquen más de un afectado, se incluirán a los familiares que desean ingresar al estudio. Aunque para los análisis comparativos se considerará solo al caso índice de cada familia, se realizará también una comparación clínica intrafamiliar cuando se estudie más de un afectado por familia.

A los pacientes se les aplicó una hoja de recolección de datos (Anexo 1) de la cual se obtenía la siguiente información: Identificación del paciente, antecedentes heredofamiliares junto con árbol genealógico, síntomas relacionados con DMOF

OBJETIVOS

- Identificar los alelos mutantes (GCG)_n más frecuentes en una muestra de pacientes mexicanos con distrofia muscular oculofaríngea.
- Establecer una correlación entre la expansión (GCG)_n y la edad de inicio y/o severidad de la sintomatología.
- Identificar posible (s) efecto(s) fundador (es) entre las diferentes familias con la enfermedad en México.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

Se incluirán sujetos con diagnóstico confirmado o con sospecha diagnóstica de DMOF a los que se les realizará historia clínica completa, genealogía lo mas extensa posible y llenado de la Hoja de Recolección de datos (anexo I). Una vez realizado el estudio molecular de la expansión GCG, se eliminarán del estudio aquellos sujetos que presenten un número de repetidos (GCG)₆ normal en los dos alelos de *PABPN1*. En las familias en que se identifiquen más de un afectado, se incluirán a los familiares que desean ingresar al estudio. Aunque para los análisis comparativos se considerará solo al caso índice de cada familia, se realizará también una comparación clínica intrafamiliar cuando se estudie más de un afectado por familia.

A los pacientes se les aplicó una hoja de recolección de datos (Anexo 1) de la cual se obtenía la siguiente información: Identificación del paciente, antecedentes heredofamiliares junto con árbol genealógico, síntomas relacionados con DMOF

sintomatología agregada en caso de haber, inicio de los síntomas, datos de exploración oftalmológica, tratamiento quirúrgico, hallazgos de biopsia en caso de haber sido realizada previamente (no se realizará toma de biopsia con fines diagnósticos en nuestro estudio) y genealogía. (Anexo 1).

Los síntomas relacionados con DMOF que se incluyeron en la hoja de recolección de datos fueron: disfagia (especificando si ésta era a sólidos, semisólidos o líquidos), debilidad de músculos faciales, debilidad muscular proximal de las extremidades y alteraciones a la marcha. Para los síntomas más frecuentes se registró la edad de inicio. También se interrogó la presencia de sintomatología agregada referida por el paciente o aquella que se considere de importancia. Cabe mencionar que debido a la naturaleza insidiosa de los síntomas en esta enfermedad, se realizó la mayor aproximación subjetiva por parte del paciente en la edad de presentación de los síntomas.

Los datos de la exploración oftalmológica que fueron básicos en la evaluación de estos pacientes fueron la posición palpebral, el reflejo pupila margen, la función del elevador y la exploración de los movimientos oculares.

La medición de la apertura palpebral se define como la distancia medida en milímetros entre el borde libre del párpado inferior al borde libre el párpado superior medido a la altura de la parte central de la pupila.

El grado de ptosis fue clasificado como leve si la apertura palpebral era ≥ 8 mm, moderada de 5-7 mm y severa ≤ 4 mm.

El reflejo pupila margen que se utilizó fue el tipo 1 que se define como el número de milímetros que separan el borde del párpado superior, con el reflejo que causa un estímulo luminoso ubicado en el mismo plano del ojo explorado sobre la cornea del paciente.

La función del músculo elevador se definió como la distancia en milímetros que recorre el borde libre del párpado superior cuando la mirada es dirigida de la infraducción a la supraducción mientras es inhibida la función del músculo frontal mediante fijación manual.

Limitación en los movimientos oculares, la cual se evaluó en las 4 posiciones secundarias (Wilson Fred M II 1996) de la mirada y será graduada de 0 – (-4) siendo cero la movilidad normal y (-4) la limitación hasta la línea media.

Se obtuvieron datos sobre la genealogía de las generaciones pasadas de los pacientes, especificando el país de origen o emigración en caso de conocerse.

EXTRACCIÓN DE DNA GENOMICO DE SANGRE PERIFÉRICA

Previo otorgamiento de consentimiento escrito (ver Carta de Información y Consentimiento, anexo II), a cada sujeto se le extrajo una muestra de 2 ml de sangre por punción venosa y se procedió a aislar el DNA genómico a partir de los leucocitos utilizando 1 ml del reactivo DNAzol BD (Invitrogen) por cada 500 μ l de muestra; se agregarán 400 μ l de alcohol isopropílico agitando vigorosamente el tubo durante 1 minuto. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para después centrifugarla a 6000 rpm durante 6 minutos, se añadió 500 μ l de DNAzol BD al botón residual y se agitó hasta disolver el botón. De nuevo, la muestra se centrifugará a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos, se decantó el sobrenadante, y se agregó al botón 1 ml de etanol al 75% y se agitó hasta disolver el botón. La muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el

exceso de alcohol con una micropipeta. Finalmente, se agregó al botón 200 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) 8 mM o de agua bidestilada estéril y se almacenó la muestra a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL DNA OBTENIDO

Se determinó la concentración y pureza del DNA extraído por medio de un análisis de absorbancia de la muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. La relación 260/280 permitió evaluar la pureza de la muestra, considerando que la lectura a 280 nm corresponde a la fracción proteica. Se considerarán adecuadas relaciones entre 1.6 y 2. Además se realizaron electroforesis en geles de agarosa de cada muestra de DNA obtenida para verificar que no exista degradación de este ácido nucleico.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN PABPN1 Y POLIMORFISMOS (RS2239579 Y SNP2622)

A partir del DNA genómico de los sujetos afectados se realizó la amplificación por PCR de una región de 245 pares de bases del exón 1 del gen *PABPN1* que incluye el tracto (GCG)_n. Se utilizó un par de oligonucleótidos específicos adquiridos en una casa comercial (ACCESOLAB) y derivados de la secuencia del gen *PABPN1* (no. de acceso del GenBank: AF026029): PABP(F) 5'-CGCAGTGCCCCGCCTTAGA-3' y PABP(R) 5'-ACAAGATGGCGCCGCCCGCCCGGC-3'. Cada reacción de PCR de 20 μ L contenía 1U de HotStart Taq polimerasa (Qiagen), 1.5 mM de MgCl_2 , 100 μ M de cada dNTP, 0.3 μ M de cada primer, DMSO al 8% de y 100 ng de DNA genómico. El

programa de amplificación constó de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45 seg, 58.7°C por 45 seg y 72°C por 45 seg; se incluyó un ciclo final a 72°C por 10 min.

Para el análisis molecular de los SNPs rs2239579 y SNP2622 (Blumen et al 2000) en aquellos pacientes que resultaron positivos para el alelo (GCG)¹¹ o (GCG)⁹ se realizó a partir del DNA genómico de los sujetos afectados (GCG)¹¹ la amplificación por PCR de una región de 209 pares de bases para el SNP rs2239579 y de 257 pares de bases para el SNP2622. Se utilizó un par de oligonucleótidos específicos para cada uno de los SNPs adquiridos en una casa comercial (ACCESOLAB): rs2239579(F) 5'-CCTGGATGGGGAAAGTAAGC-3' , rs2239579 (R) 5'-GAGGTCACATGACTAGCCAG-3' y SNP2622(F) 5'-GAAGCATGCCTGCAGGT TGAAT-3' , SNP2622(R) 5'-TGGGATCACCTGAGTCAGAGATGA-3' Cada reacción de PCR de 20 μ L contuvo 1U de HotStart Taq polimerasa (Qiagen), 1.5 mM de MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 0.3 μ M de cada primer, DMSO al 8% de y 100 ng de DNA genómico. El programa de amplificación constó de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1min, 56.6°C (para rs2239579) o 60.2 (para SNP2622) por 1 min y 72°C por 1 min; se incluyó un ciclo final a 72°C por 10 min.

Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar la banda específica con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pb.

Se identificaron las bandas de interés y se recortaron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando ya sea el método de adhesión a perlas de vidrio (QIAEX II) o el de purificación por columna (Promega). La concentración del DNA amplificado obtenido de la purificación se determinó por medio de la comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con respecto a un marcador de masa estándar (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DIRECTA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se realizarán nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica del fragmento amplificado del gen *PABPN1*. Cada reacción de 20 μ l contuvo 4 μ l de BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) que contiene los cuatro dideoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxionucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), $MgCl_2$ y la enzima ampliTaq polimerasa; se agregó además 1 μ l del oligonucleótido correspondiente para ambas cadenas de DNA a una concentración de 10 μ M, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 20 μ l. Para esta PCR se utilizará un programa de 25 ciclos que incluyen 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 μ l de formamida y posteriormente se desnaturalizó a 95°C por 5

min. Los productos se analizaron en un secuenciador automático ABI Prism 310 y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos sanos y enfermos se compararon con las secuencias silvestres del gen *PABPN1*.

CLONACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR DEL GEN PABPN1

El producto de la amplificación del fragmento de 245 pb del exón 1 del gen *PABPN1* y que incluye el tracto (GCG)₆ será ligado en un plásmido vector pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) de 3015 pares de bases (Figura 3); este es un plásmido abierto que en sus extremos presenta una timina “colgante” lo que facilita la incorporación de productos generados por PCR con polimerasas que añaden una adenina en el extremo 3' de la cadena, como el caso de la Taq polimerasa. La reacción de ligación de 10 μ l contenía buffer de ligación 2x, 50 ngs del vector, producto de PCR (con un índice inserto:vector 3:1) y 3 unidades de DNA ligasa T4. La reacción de ligación se efectuó por una hora a temperatura ambiente o de manera alterna 12 horas a 40C.

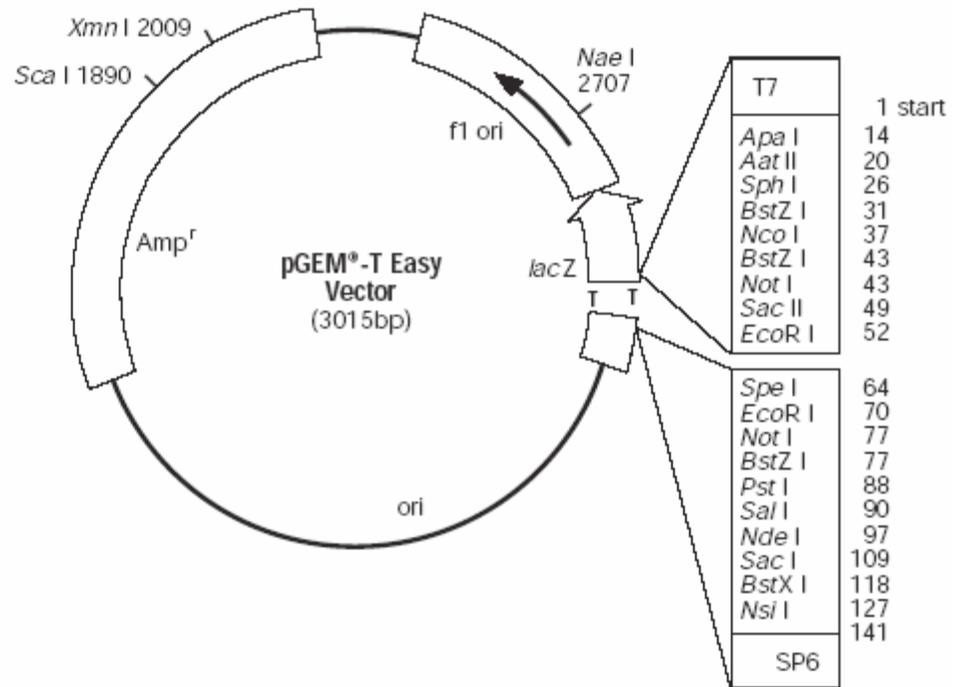


Figura 3.- Esquema del plásmido pGEM-T en el que se indican los sitios de clonación TA del fragmento de 245 pb del gen *PABPN1* y sitios de corte de distintas enzimas de restricción.

TRANSFORMACIÓN DE CELULAS COMPETENTES

El producto de ligación fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 alfa preparadas previamente con cloruro de Rubidio. A una alícuota de 200 μ l de células competentes se le añadió el producto de ligación (plásmido + producto de PCR) y se incubaron a 40°C por 30 minutos, seguido de la transformación con choque térmico a 42°C por 1 minuto e incubación a 40°C por 10 mins. A las células ya transformadas se les agregó 1 ml de medio SOC y se incubaron por 2 horas a 37°C; esta mezcla fue plaqueada en cajas Petri con medio BHI agar con y sin ampicilina y

contenían además IPTG y X-gal. El plásmido le confiere a la bacteria resistencia a la ampicilina por lo que solo las bacterias que hayan aceptado el plásmido crecerán en el medio con ampicilina; además, la adición de IPTG y X-gal al medio permitió seleccionar a las 24-48 hrs las colonias que aceptaron el inserto (blancas) de aquellas que no lo aceptaron y en las que el plásmido no se circularizó (azules).

Las colonias blancas fueron picadas con palillos estériles y crecidas en medio BHI por 12-24 hrs a 37°C; se tomaron 1.5 ml de este cultivo y se procedió a extraer el DNA plasmídico con ayuda del kit Wizard Plus SV Minipreps de Promega siguiendo las instrucciones referidas por el fabricante.

SECUENCIACION DE LOS PRODUCTOS CLONADOS DEL GEN PABPN1

Una vez extraído el DNA plasmídico se realizará secuenciación automatizada fluorescente utilizando el oligonucleótido pUC/M13 forward (cuya secuencia complementaria se encuentra adyacente al sitio de inserción del producto de PCR), siguiendo el protocolo descrito anteriormente para secuenciación automatizada directa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La mayor parte de resultados obtenidos fueron descriptivos, la comparación de frecuencias entre grupos (con diferentes expansiones) se realizará con análisis de X^2 o de X^2 con corrección de Yates, de ser necesario. Para la comparación de edad de inicio entre grupos con diferente mutación se utilizó la prueba de T de Student para medias.

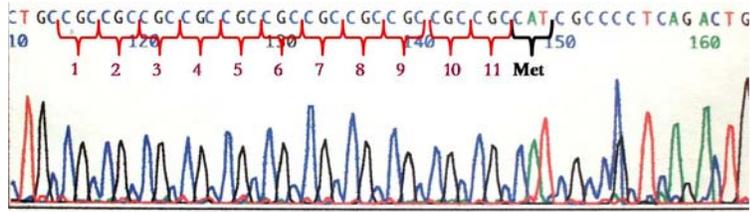


Figura 6. Expandido (GCG)11 secuencia de cadena antisentido.

Paciente No.	Sexo	NO. (GCG)	rs2239579	SNP2622
1	F	11/6	TC	TC
2	M	11/6	CT	CC
3	F	11/6	CC	CC
4	F	11/6	TC	CC
5	F	11/6	CC	CC
6	F	11/6	CC	CC
7	F	11/6	CC	CC
8	F	11/6	TC	CC
9	F	10/11/6	CC	CC
10	F	11/6	CT	CC
11	M	11/6	CT	CC
12	F	11/6	CC	CC
13	M	11/6	CC	CC
14	F	11/6	CC	CC
15	M	11/6	CT	CC
16	M	11/6	NR	NR
17	F	11/6	NR	NR
18	F	11/6	NR	NR
19	F	11/6	NR	NR
20	M	11/6	NR	NR
21	M	11/6	NR	NR
22	F	11/6	NR	NR
23	M	11/6	NR	NR
24	M	11/6	NR	NR
25	F	11/6	NR	NR
26	F	11/6	NR	NR
27	F	11/6	NR	NR
28	F	11/6	NR	NR
29	M	11/6	NR	NR
30	M	9/6	CT	CC
31	M	9/6	TT	CT
32	M	8/9/6	CT	CC
33	F	9/6	CT	CC
34	M	9/6	CT	CC
35	F	9/6	CT	CC
36	F	9/6	TT	CC
37	F	9/6	NR	NR
38	M	9/6	NR	NR
39	F	9/6	NR	NR
40	M	9/6	NR	NR
41	M	9/6	NR	NR
42	F	9/6	NR	NR
43	F	9/6	NR	NR
44	M	9/6	NR	NR
45	F	9/6	NR	NR
46	M	9/6	NR	NR
47	M	9/6	NR	NR
48	M	9/6	NR	NR

Tabla 3. Características genóticas de la población estudiada.

C – Citosina, T – Timina, F – Femenino, M – Masculino, NR-No registrado.

Cabe destacar un hallazgo muy significativo en dos pacientes: en el paciente 32 el cual catalogamos como (GCG)9 / (GCG)6 por haber presentado una clona con (GCG)9 y

PAC. 9	ALELO 1 (GCG)6 / %	ALELO 2 (GCG)11 / %	ALELO 3 (GCG)10 / %	TOTAL / %
	6 / 55%	4 / 36%	1 / 9%	11 / 100 %
PAC. 32	ALELO 1 (GCG)6 / %	ALELO 2 (GCG)9 / %	ALELO 3 (GCG)8 / %	
	3 / 38%	4 / 50%	1 / 12%	8 / 100%

Tabla 4. Frecuencia de los alelos GCG identificados en los pacientes 9 y 32.

En los 15 pacientes que presentaron el genotipo (GCG)11 / (GCG)6 se determinaron los polimorfismos rs2239579 y SNP2622. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

	No. de pacientes.	rs2239579			SNP2622		
		CC	CT	TT	CC	CT	TT
Pacientes (GCG)11	15	8	7	0	14	1	0
Pacientes (GCG)9	7	0	5	2	6	1	0

Tabla 5. Resultado del análisis molecular de los SNPs en la población estudiada con DMOF, información mostrada en dos grupos (GCG)11 y (GCG)9. C – Citosina, T – Timina.

En esta tabla se puede apreciar que de los pacientes a los que se identificaron los polimorfismos, el 100% (15 pacientes) de los pacientes (GCG)11 tuvieron consistentemente al menos una C en rs2239579 y al menos una C en SNP2622, con lo que se deduce que el alelo rs2239579(C) – (GCG)11-SNP2622 (C) está presente en todos los casos de pacientes mexicanos con (GCG)11 del presente estudio. Estos datos coinciden con el haplotipo ancestral descrito en la población uruguaya.

Con respecto a los pacientes (GCG)9 a los que se les secuenciaron los polimorfismos, el 100% (7 pacientes) tuvieron consistentemente al menos una T en rs2239579 y al menos una C en SNP2622, ninguno fue homocigoto C-C en rs2239579, ni T-T en SNP2622.

La edad promedio de inicio en el total de sujetos estudiados fue de 49.54 años. En el grupo de (GCG)11 (15 pacientes), la edad promedio de inicio fue de 46.5 años, mientras que en el grupo de (GCG)9 (7 pacientes) fue de 54.5 años. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) cuando ambas edades fueron comparadas mediante la prueba de T de Student.

El primer síntoma de aparición en los sujetos estudiados fue la ptosis en 20 (83%) de ellos y la disfagia fue el primer síntoma solo en 4 (17%).

En el grupo de (GCG)11 que se les realizó recolección de datos, el 87% (13/15 pacientes) presentaron ptosis y 13% (2/15 pacientes) disfagia como el síntoma inicial, mientras que en el grupo de (GCG)9 el 78% (7/9 pacientes) presentaron ptosis como el síntoma inicial y el 22% (2/9 pacientes) disfagia.

Del 100% de los pacientes entrevistados, 21 (88%) tenían familiares de generaciones anteriores afectados, 1 paciente (4%, Paciente 22) desconocía sus antecedentes familiares y 2 (8%, pacientes 4 y 34) negaron tener familiares afectados. El paciente que desconocía sus antecedentes presentó el genotipo (GCG)9/6 y los pacientes sin antecedentes familiares fueron positivos para el genotipo (GCG)9/6 el primero y para (GCG)11/6 el segundo.

Con respecto a la exploración de párpados en aquellos pacientes a los que se les realizó exploración física, la información recabada se resume en la tabla 6. En ella se

puede observar que 9 (38%) de los 24 pacientes explorados habían sido operados previo al diagnóstico. Debido al procedimiento quirúrgico los valores evaluados no pudieron ser fidedignos, sin embargo nos dan una idea de que la cirugía es un tratamiento paliativo, ya que aún después de la primera cirugía la ptosis en algunos pacientes regresa, incluso hasta valores semejantes a los que tienen los pacientes que no han tenido cirugía alguna. Un comportamiento semejante al de la apertura palpebral sucede con los valores de Reflejo pupila margen.

La “función del elevador” es una manera directa de evaluar la función muscular (músculo elevador), que generalmente no se ve afectado en pacientes postquirúrgicos, los valores normales son aquellos ≥ 13 mm (Yanoff M.2004). En los sujetos estudiados y explorados oftalmológicamente, 23 (96%) presentaron una función del elevador subnormal y solamente 1 (4.1%, Paciente 7) tuvo un registro normal pero en límites normales bajos (Tabla 6).

Con los datos de apertura ocular, y sin tomar en cuenta la condición postquirúrgica de los pacientes, la magnitud de la ptosis resulto ser severa en 11 (46%) pacientes y moderada en 13 (54%).

Pac.	CIRUGÍA PREVIA	OD Apertura. Palp.	OI Apertura. Palp.	OD Ref. Pup. Marg.	OI Ref. Pup. Marg.	OD Func. Elev	OI Func. Elev	Severidad de la ptosis. (mm)
1	NO	1	2	0	0	3	3	SEVERA
2	SI	4	5	0	1	6	6	SEVERA
3	NO	5	5	0	0	7	8	MODERADA
4	SI	5	7	1	2	3	4	MODERADA
5	NO	7	7	1	1	3	3	MODERADA
6	SI	4	6	1	2	4	6	MODERADA
7	NO	6	9	2	4	13	13	MODERADA,
8	SI	6	5	1	0	8	8	MODERADA
9	NO	4	3	-1	-2	7	7	SEVERA
10	NO	6	4	2	0	9	8	MODERADA
11	SI	7	5	1	0	6	7.5	MODERADA
12	NO	6	8	1	2	11	12	MODERADA
13	NO	4	4	-1	-0.5	4	4	SEVERA
14	NO	6	6	1	1	9	9	MODERADA
15	NO	4	3	1	1.5	6	7.5	SEVERA
30	NO	2	2	0	0	1	1	SEVERA
31	SI	3	2	0	0	4	3	SEVERA
32	SI	7	6	2	1	10	7	MODERADA
33	NO	6	5	1	0	9	9	MODERADA
34	SI	6	6	1	1	7	7	MODERADA
35	NO	4	4	0.5	0.5	11	11	SEVERA
36	NO	4	4	0	0	6	6	SEVERA
37	SI	4	3	-1	-1	7	6	SEVERA
38	NO	3	4	-2	-1	8	8	SEVERA

Tabla 6. Características clínicas oftalmológicas de los pacientes estudiados. Mediciones en milímetros. Los pacientes 16 al 29 no se incluyeron en este análisis pues no fue posible su exploración física.

Con respecto a la limitación de los movimientos oculares, los datos obtenidos se muestran en la tabla 7, en ésta se demuestra que la limitación a los movimientos oculares hacia alguna de las posiciones está presente en el 79% (19 pacientes) de los pacientes, al separarlos por tipo de mutación, vemos que algún tipo de limitación estuvo presente en el 73% (11 pacientes) de los pacientes con (GCG)11 y en el 89% de los pacientes con (GCG)9. La limitación a la supraducción fue la alteración más frecuentemente involucrada (71% en la población general, 60% en el grupo (GCG)11 y 89% en el grupo (GCG)9, seguida por la limitación a la abducción (50% en la población general, 47% en el grupo (GCG)11 y 56% en el grupo (GCG)9. Con menor frecuencia se identificó limitación a la aducción (46% del total de pacientes incluidos, 40% en el grupo (GCG)11 y 56% en el grupo (GCG)9) y la infraducción (17% en el total de pacientes, 20% en el grupo (GCG)11 y 11% en el grupo (GCG)9).

De los pacientes menores de 55 años, el 56% (5/9) presento algún tipo de limitación a los movimientos oculares, mientras que en los pacientes mayores de 55 años el 93% (14/15) presentó algún grado de limitación en los movimientos oculares.

Paciente	Edad	Limitación presente	OD Supra EOM Limit	OI Supra EOM Limit	OD Abd. EOMS Limit.	OI Abd. EOMS Limit.	OD Add. EOMS Limit.	OI Add. EOMS Limit.	OD Infra. EOMS Limit.	OI Infra. EOMS Limit.
1	64	SI	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
2	53	SI	0	0	-1	-1	-1	-1	0	0
3	54	NO	0	0	0	0	0	0	0	0
4	70	SI	-3	-3	-1	-1	0	0	0	0
5	48	NO	0	0	0	0	0	0	0	0
6	62	SI	-1	0	0	0	-1	0	0	0
7	41	NO	0	0	0	0	0	0	0	0
8	54	NO	0	0	0	0	0	0	0	0
9	56	SI	0	0	-2	-2	0	0	0	0
10	52	SI	-2.5	-2.5	-1	-1	0	0	0	0
11	53	SI	-2.5	-2.5	0	0	0	-1	0	0
12	53	SI	-1.5	-1.5	0	0	0	0	0	0
13	58	SI	-3	-3	0	0	-0.5	0	-0.5	0
14	44	SI	-3	-3	0	-1	0	0	1	1
15	57	SI	-1	-1	-0.5	-1	-1	-1	0	0
30	82	SI	-3	-3	-2	-1	0	0	0	0
31	72	SI	-3	-3	-3	-3	-3	-3	0	0
32	66	SI	-2	-2	0	0	-2	-2	-2	-2
33	59	SI	-3	-2.5	-1	-1	0	0	0	0
34	68	SI	-2	-2	0	0	0	0	0	0
35	59	NO	0	0	0	0	0	0	0	0
36	66	SI	-1	-1	0	0	-1	-1	0	0
37	82	SI	-2.5	-2.5	0	-2	0	-1	0	0
38	58	SI	-1	-1	0	-1	-1	0	0	0

Tabla 7. Datos de las limitaciones a los movimientos oculares en la población con DMOF. OD: Ojo derecho, OI: Ojo izquierdo, EOMS: Movimientos oculares, Limit: limitación, Supra: Supraducción, Abd: Abducción, Add: Aducción, Infra: Infraducción.

Los datos obtenidos acerca de los síntomas presentados en los pacientes con DMOF se resume en la tabla 8. Se puede apreciar que el 100% de los pacientes presentaron ptosis y 96% disfagia, de éstos dos síntomas la media de edad de presentación fue de 50.1 años y 53.3 años, respectivamente. El 83% (20/24) de los pacientes presentó como primer síntoma ptosis y como segundo disfagia. Cuando analizamos el inicio de la ptosis entre los grupos (GCG)11 y (GCG)9, las medias de

presentación en cada grupo es de 46.7 y 55.6 respectivamente. Esta misma comparación para la disfagia nos da una media de presentación de 49.8 y 58.8.

Otros síntomas que se presentaron con menor frecuencia fueron disfonía 58% (14 pacientes), facies inexpresiva 50% (12 pacientes), debilidad de miembros 50% (12 pacientes) y marcha anormal 8% (2 pacientes). Otro síntoma referido por el 21% (5 pacientes) fue cansancio inespecífico sin predominio de horario.

Pac.	PTOSIS / EDAD DE PRESENTACION	DISFAGIA/ EDAD DE PRESENTACION.	DISFONÍA	FACIES INEXPRESIVA	MIEMBROS DEBILIDAD	MARCHA ANORMAL
1	+ / 44	S+SS / 60	+	+	—	—
2	+ / 50	S / 48	+	+	—	—
3	+ / 45	S / 46	—	+	+	—
4	+ / 52	S+SS+L / 60	+	+	+	—
5	+ / 41	S+SS / 40	+	+	—	—
6	+ / 42	S+SS+L / 45	+	+	+	+
7	+ / 36	S+SS+L / 39	—	—	+	—
8	+ / 50	S+SS / 52	+	+	+	—
9	+ / 53	S / 54	—	+	—	—
10	+ / 47	S / 51	—	—	—	—
11	+ / 48	S / 48	—	—	—	—
12	+ / 50	S / 52	—	+	—	—
13	+ / 53	S+SS/55	+	—	+	—
14	+ / 42	-	—	—	+	—
15	+ / 48	S+SS/48	—	—	+	—
30	+ / 62	S+SS+L / 67	+	+	+	—
31	+ / 55	S / 60	+	+	—	—
32	+ / 48 165	S / 60	—	—	—	—
33	+ / 50	S / 54 174	+	+	—	—
34	+ / 60	S / 62	+	—	+	—
35	+ / 55	S/54	—	—	—	—
36	+ / 63 228	S/54 170	+	—	+	+
37	+ / 60	S / 62	+	-	-	--
38	+ / 48 108	S / 56 118	+	-	+	--

Tabla 8. Características clínicas no oftalmológicas presentadas por los pacientes con DMOF. S – SÓLIDOS, SS- SEMISOLIDOS, L- LÍQUIDOS

DISCUSIÓN.

Los datos sobre frecuencia de alelos mutados en la población mexicana (60% para el expandido de tripletes (GCG)¹¹ y 40% para el (GCG)⁹, contrastan con los descritos en otras poblaciones, en las cuales el alelo (GCG)⁹ es el más frecuente. Ejemplos de estas poblaciones con (GCG)⁹ como alelo prevalente son el Reino Unido (Hill et al. 2001), Canadá, Estados Unidos (Brais et al 2003.), Alemania (Muller et al. 2001), Italia (Mirabela et al 2000) e Israel en judíos Bukahara (Blumen SC et al. 2000).

En la población uruguaya Rodríguez et al. en el 2005 describió al alelo (GCG)¹¹ como el más común y encontró utilizando dos SNPs (rs2239579(c) – (GCG)¹¹-SNP2622 (C)) un haplotipo indicativo de un efecto fundador proveniente de inmigrantes de las islas canarias que llegaron a América en los movimientos migratorios de los siglos XVIII – XIX.

Por medio de la genealogía y los antecedentes heredofamiliares estudiados en los pacientes (GCG)¹¹ no se pudo establecer un antecedente común a ellos, sin embargo en base a nuestros resultados de biología molecular y que todos nuestros pacientes (GCG)¹¹ presentaron un alelo positivo a rs2239579(C) – (GCG)¹¹-SNP2622 (C) se propone un origen común para el haplotipo rs2239579(C) – (GCG)¹¹-SNP2622 (C) entre las poblaciones mexicana y uruguaya, por lo que se podría considerar este como un efecto fundador común para población latinoamericana, proveniente de los mismos pobladores iniciales que migraron de las islas canarias.

Ningún efecto fundador se vio relacionado para los pacientes mexicanos con (GCG)⁹ después del estudio de la genealogía y antecedentes familiares. Sin embargo algunas conjeturas se pueden realizar con respecto a los SNPs estudiados en estos pacientes;

dado que ningún paciente presentó el alelo rs2239579(C) – (GCG)9-SNP2622 (T), este podría no estar relacionado con la DMOF de (GCG)9. La combinación de rs2239579(T) y de SNP2622 (c) al estar en la totalidad de los pacientes podría estar sugiriendo un haplotipo rs2239579(T) – (GCG)9-SNP2622 (C) asociado al alelo mutado (GCG)9, razón por la cual no se puede descartar un efecto fundador. Se requieren de mayores estudios de frecuencia de estos SNPs en población sana y con DMOF. Es importante tomar estos datos con cautela debido a la posible variación de frecuencia de los SNPs entre diferentes poblaciones.

La presencia de alelos con tres expansiones diferentes en dos pacientes (GCG)6/11/10 y (GCG)6/9/8 es un hallazgo nunca antes descrito para la DMOF. El hecho de que este evento se haya dado en 2 sujetos diferentes descarta la posibilidad de un artefacto *in vitro*. Es importante resaltar la baja frecuencia que tuvo este tercer alelo: Una clona de 11 (9%) en el paciente 9 y 1 clona de 8 (12%) en el paciente 18. Esta baja frecuencia con respecto a los otros dos alelos más predominantes podría hacer más difícil su detección por otros métodos moleculares de menos sensibilidad. Dada la alta sensibilidad y especificidad del método utilizado y debido al elevado número de alelos que se secuenciaron en todo este estudio, la posibilidad latente de encontrar en alguna clona un alelo de baja frecuencia, se hizo presente con estos dos pacientes.

La presencia de este tercer alelo es sugerente de inestabilidad mitótica de la mutación por repetidos GCG en la DMOF, lo cual contrasta con lo hasta ahora descrito para esta mutación, la cual es considerada como una expansión de trinucleótidos mitótica y

meióticamente estable (Brais et al 2003)¹³. Con esta evidencia se propone que la mutación es mitóticamente inestable en un pequeño porcentaje de las células en división (leucocitos en este estudio) de tal manera que en la mayor parte de las células la mutación se comporta mitótica y meióticamente estable. Por otro lado, es posible que en otras líneas celulares, la frecuencia de este tercer alelo sea diferente.

La diferencia de edad de presentación entre el grupo (GCG)11 con una edad media 46.5 años y el grupo (GCG)9 con una media de 54.5 años fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) mediante la prueba de T de Student. Estos resultados indican que en población mexicana el genotipo (GCG)11 confiere un inicio de la sintomatología más temprano que el genotipo (GCG)9.

El antecedente de que los pacientes con (GCG)11 tengan historia familiar positiva es una condición que apoya la posibilidad de un efecto fundador. Sobre el paciente con 11 repetidos que desconoce sus antecedentes familiares se tendrán reservas sobre si proviene del mismo ancestro común, aunque el estudio de los SNPs reveló el haplotipo rs2239579(C) – (GCG)11-SNP2622 (C) en dicho paciente lo que lo liga al efecto fundador. Acerca de los pacientes con la mutación (GCG)9, no se conoce información sobre un efecto fundador, y el paciente que refirió no tener antecedentes familiares podría sugerir una mutación *de novo*, aunque no hubo una revisión médica a los familiares no afectados de generaciones anteriores de este paciente.

En lo referente a la exploración de los párpados, debido a que el 38% de los pacientes fueron ingresados al protocolo cuando ya habían sido operados al menos una vez, los

valores obtenidos en la exploración de los párpados no podrá ser adecuadamente analizada, lo que si será de nuestra atención es que el 100% de los pacientes presentó ptosis de moderada a severa incluso aquellos postquirúrgicos. De cualquier manera la ptosis postquirúrgica puede variar dependiendo del procedimiento quirúrgico, el cirujano y la presencia o ausencia del fenómeno de Bell, todos estos, parámetros que no fueron evaluados en este estudio.

El hallazgo de la función del músculo elevador disminuida en el 96% de los pacientes, lo hace un parámetro útil y fácil de explorar que generalmente no es evaluado en pacientes con DMOF, por lo que proponemos que debería de ser explorado de manera regular para la DMOF.

Es de notar que el paciente con función del elevador en valores normales limítrofes fue el paciente al que se le exploró la función del elevador a la edad más temprana (41 años), por lo que probablemente este paciente presentará una función del elevador alterada con el progreso de su enfermedad.

Como es de esperarse en una enfermedad progresiva como la DMOF a mayor edad existió una mayor frecuencia de limitación a los movimientos oculares en los pacientes (56% en menores de 55 años y 93% en mayores de 55 años).

Tomando las medias de edad de presentación de la ptosis y la disfagia, podemos corroborar que los síntomas más frecuentemente encontrados en estos pacientes para hacer el diagnóstico clínico, son en una etapa más temprana la ptosis y alrededor de 4

años más tarde la disfagia, ya que el 83% de los pacientes presenta esta secuencia cronológica de aparición de síntomas. En este subgrupo de pacientes la edad de inicio de la ptosis fue a los 50.1 años y la disfagia a los 53.3 años.

Debido a la expresividad variable de esta enfermedad, algunos pacientes en nuestra muestra desarrollaron otros síntomas con menor frecuencia: disfonía (58%), facies inexpresiva (50 %), debilidad de miembros (50%) y marcha anormal (8%).

Ningún paciente se presentó con biopsia previa y ésta no fue realizada con fines diagnósticos en ninguno de los casos, debido a que se trata de una prueba invasiva y la sensibilidad del estudio molecular de *PABPN1* por muestra de sangre periférica es muy alta.

Los datos obtenidos en este estudio contribuyen a un mayor conocimiento de la DMOF en población latinoamericana, en donde se encontró un efecto fundador común al ya descrito en población uruguaya. En nuestro estudio describimos las características clínicas de la DMOF más comunes en nuestra población, para que con futuros estudios se pueda obtener una correlación fenotipo – genotipo más acertada. En la población mexicana encontramos una mayor frecuencia de la mutación (GCG)¹¹, lo cual contrasta con lo descrito para la mayoría de las poblaciones. Finalmente describimos datos que evidencian inestabilidad mitótica de una mutación que se creía hasta la fecha estable, mayores estudios serán necesarios para caracterizar este comportamiento de los repetidos GCG en la DMOF.

REFERENCIAS

Becher MW, Morrison L, Davis LE, Maki WC, King MK, Bicknell JM, Reinert BL, Bartolo C, Bear DG. Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans. *J Am Med Assoc.* 2001;286:2437-2440.

Billingsley GD, Cox DW, Duncan AM, Goodfellow PJ, Grzeschik KH. Regional localization of loci on chromosome 14 using somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet.* 1994;66:33-38.

Blumen SC, Brais B, Korczyn AD, Medinsky S, Chapman J, Asherov A, Nisipeanu P, Codere F, Bouchard JP, Fardeau M, Tome FM, Rouleau GA. Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann Neurol.* 1999;46:115-1188.

B J M de Swart, B M van der Sluijs, A M C Vos, J G Kalf, S Knuijt, J R M Cruysberg, B G M van Engelen. Ptosis aggravates dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:266–268

Bouchard J-P, Brais B, Brunet D, Gould PV, Rouleau GA. Recent studies in oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec. *Neuromuscul Disord.* 1997;7:S22-29.

Boukriche Y, Maisonobe T, Masson C. Neurogenic involvement in a case of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2002;25:98-101.

Brais B. Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet Genome Res.* 2003;100:252-260.

Brais B, Bouchard J-P, Xie Y-G, Rochefort DL, Chretien N, Tome FMS, Lafreniere RG, Rommens JM, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korcyn AD, Heutink, Mathieu J, Duranceau A, Codere F, Fardeau M, Rouleau GA. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genet.* 1998;18:164-167.

Brais B, Xie Y-G, Sanson M, Morgan K, Weissenbach J, Korcyn AD, Blumen SC, Fardeau M, Tome FMS, Bouchard J-P, Rouleau GA. The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha and beta myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. *Hum Molec Genet.* 1995;4 429-434.

Calado A, Tome FM, Brais B, Rouleau GA, Kuhn U, Wahle E, Carmo-Fonseca M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2321-2328.

Caron Marie-Josée, MD, Francois Girard, MD, Dominique C. Girard, MD, Daniel Boudreault, MD, Bernard Brais, MD, MPhil, PhD, Edgard Nassif, MD, Philippe Chouinard, MD, Monique Ruel, RN, and André Duranceau, MD. Cisatracurium Pharmacodynamics in Patients with Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *Anesth Analg* 2005;100:393–7

Codere F, Brais B, Rouleau G, Lafontaine E. Oculopharyngeal muscular dystrophy: What's new? *Orbit.* 2001;20:259-266.

Corbeil-Girard Louis-Philippe, Arnaud F. Klein, A. Marie-Josée Sasseville, Hugo Lavoie,

Marie-Josée Dicaire, Anik Saint-Denis, Martin Page´, Andre´ Duranceau, Francois Code`re, Jean-Pierre Bouchard, George Karpati, Guy A. Rouleau, Bernard Massie, Yves Langelier, and Bernard Brais. *PABPN1* overexpression leads to preglutination of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiology of Disease* 18 (2005) 551– 567

Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 1999;18:2273-2283.

Davies Janet E., Sovan Sarkar and David C. Rubinsztein. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, No. 1 23–31

Duranceau A. Cricopharyngeal myotomy in the management of neurogenic and muscular dysphagia. *Neuromuscul Disord.* 1997;7:S85-89.

Fan X, Dion P, Laganier J, Brais B, Rouleau GA. Oligomerization of polyalanine expanded *PABPN1* facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2341-2351.

Fardeau M, Tome FM. Oculopharyngeal muscular dystrophy in France. *Neuromuscul Disord.* 1997;7:S30-33.

Galvao R, Mendes-Soares L, Camara J, Jaco I, Carmo-Fonseca M. Triplet repeats, RNA secondary structure and toxic gain-of-function models for pathogenesis. *Brain Res Bull.* 2001;56:191-201.

Grewal RP, Cantor R, Turner G, Grewal RK, -Detera-Wadleigh SD: Genetic mapping and haplotype analysis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuroreport*. 1998;9:961-965.

Hill ME, Creed GA, McMullan TF, Tyers AG, Hilton-Jones D, Robinson DO, Hammans SR. Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain*. 2001 Mar;124(Pt 3):522-6.

Little BW, Perl DP. Oculopharyngeal muscular dystrophy. An autopsied case from the French-Canadian kindred. *J Neurol Sci*. 1982;53:145-158.

Lotz BP, Engel AG, Nishino H, Stevens JC, Litchy WJ. Inclusion body myositis: observation in 40 patients. *Brain*. 1989;112:727-747.

Mirabella M, Silvestri G, de Rosa G, Di Giovanni S, Di Muzio A, Uncini A, Tonali P, Servidei S. GCG genetic expansions in Italian patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurology*. 2000;54:608-614.

Muller T, Schroder R, Zierz S. GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2001;24:120-122.

Mouly V., A. Aamiri, A. Bigot, R. N. Cooper, S. Di Donna, D. Furling, T. Gidaro, V. Jacquemin, K. Mamchaoui, E. Negroni, S. Perie, V. Renault, S. D. Silva-Barbosa, G. S. Butler-Browne. The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol Scand* 2005, 184, 3–15

Nakamoto M, Nakano S, Kawashima S, Ihara M, Nishimura Y, Shinde A, Kakizuka A. Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch Neurol*. 2002; 59:474-477.

Nemeth A, Krause S, Blank D, Jenny A, Jeno P, Lustig P, Wahle E. Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucl Acids Res.* 1995;23:4034-4041.

Porschke H, Kress W, Reichmann H, Goebel HH, Grimm T. Oculopharyngeal muscular dystrophy in a northern German family linked to chromosome 14q, and presenting carnitine deficiency. *Neuromuscul Disord.* 1997;1:S57-62.

Pou Serradell A, Lloreta Trull J, Corominas Torres JM, Hammouda EH, Urtizberea JA, Richard P, Brais B. Oculopharyngeal muscular dystrophy: study of patients from seven Spanish families with different GCG expansions in PABP2 gene *Neurologia.* 2004;19:239-247.

Robinson DO, Hammans SR, Read SP, Sillibourne J. Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the *PABPM1* gene expansion sequence in 86 patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism. *Hum Genet.* 2005;116:267-271.

Rodriguez M, Camejo C, Bertoni B, Braida C, Rodriguez MM, Brais B, Medici M, Roche L. (GCG)¹¹ founder mutation in the *PABPM1* gene of OPMD Uruguayan families. *Neuromuscul Disord.* 2005;15:185-190.

Scacheri PC, Garcia C, Hebert R, Hoffman EP. Unique PABP2 mutations in "Cajuns" suggest multiple founders of oculopharyngeal muscular dystrophy in populations with French ancestry. *Am J Med Genet.* 1999;86:477-481.

Schmitt HP, Krause KH. An autopsy study of a familial oculopharyngeal Muscular dystrophy (OPMD) with distal spread and neurogenic involvement. *Muscle Nerve* 1981;4: 296-305.

Stajich JM, Gilchrist JM, Lennon F, Lee A, Yamaoka L, Helms B, Gaskell PC, Donald L, Roses AD, Vance JM, Pericak-Vance MA. Confirmation of linkage of oculopharyngeal muscular dystrophy to chromosome 14q11.2-q13. *Annls Neurol.* 1997;40:801-804.

Taylor EW. Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis: a contribution to the group of family diseases. *J Nerv Ment Dis.* 1915;42:129-139.

Tomé FMS, Chateau D, Helbling-Leclerc A, Fardeau M. Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1997;7:S63-69.

Tome FMS, Fardeau M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropath.* 1980;49: 85-87.

Van der Sluijs BM, van Engelen BG, Hoefsloot LH. Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) due to a small duplication in the *PABPN1* gene. *Hum. Mutat.*, 2003;21:553.

Verheesen Peter, Anna de Kluijver, Silvana van Koningsbruggen, Marjolein de Brij, Hans J. de Haard³, Gert-Jan B. van Ommen, Silve`re M. van der Maarel and C. Theo Verrips. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear poly(A)-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, No. 1 105–111

Victor M, Hayes R, Adams RD. Oculopharyngeal muscular dystrophy; a familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. *New Engl J Med.* 1962;267:1267-1272.

Wahle E, Lustig A, Jenö P, Maurer P. Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J Biol Chem*. 1993;268:2937-2945.

Wahle E. 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1261:183-194.

Wahle E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell*. 1991;66:759-768.

Warren ST. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science*. 1997;275:408-409.

Wilson Fred M II. Practical Ophthalmology A Manual for beginning residents. 4th edition. American Academy of Ophthalmology 1996.

Yanoff M, Duker Jay S, Augsburger James J. Ophthalmology. 2nd edition. Mosby. 2004.

ANEXOS

Anexo I

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LA DISTROFIA MUSCULAR OCULOFARÍNGEA EN MÉXICO

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Fecha _____

Nombre _____

Edad _____

Sexo _____ Lugar de nacimiento _____

Otros familiares afectados?:

Ojos :

Ptosis mm: Leve () Moderada () Severa ()
Limitación de los movs. oculares) Leve () Moderada () Severa ()
Degeneración pigmentaria Retiniana Si () No ()

Gastrointestinal :

Disfagia: Sólidos () Semisólidos () Líquidos ()

Neurológico :

Parálisis faríngea Si () No ()
Disfonía/voz nasal Si () No ()

Muscular :

Debilidad de músculos faciales: Si () No ()
Debilidad muscular distal de extremidades: Si () No ()
Marcha anormal: Si () No ()
Debilidad de esfínter anal: Si () No ()
Debilidad de esfínter vesical: Si () No ()

Inicio:

Edad de inicio:

Edad de diagnóstico:

Primer síntoma referido:

Orden y edad de aparición de los síntomas (ptosis, disfagia, debilidad de extremidades, etc.):

- 1.- Edad:
2.- Edad:
3.- Edad:
4.- Edad:
5.- Edad:

Sintomatología agregada:

Tratamientos quirúrgicos (tipo y fecha):

Hallazgos de la biopsia:

Fecha de realización:

Músculo analizado:

Edad al momento de la biopsia:

Vacuolas ribeteadas en citoplasma:

Fibras anguladas atróficas:

Variación anormal del tamaño de fibras musculares:

Otros hallazgos:

Genealogía

Lugar de nacimiento y apellidos de los bisabuelos (o anterior):

Lugar de nacimiento y apellidos de los abuelos:

Lugar de nacimiento y apellidos de los padres:

*En caso de migración de ancestros desde otros países hacia México, tratar de establecer el año o década en que ocurrió.

Anexo II

CARTA DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO

Yo _____, declaro libremente que acepto participar de manera voluntaria en el estudio “**Caracterización Clínica y Genética de la Distrofia Muscular Oculofaríngea en México**” que se realizará en los servicios de Genética y Oculoplástica del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” y que estará bajo la responsabilidad de los Drs. Juan Carlos Zenteno Ruiz y Ángel Nava. Se me ha explicado que se requiere de la toma de una muestra de 2 mililitros de sangre venosa y que esta toma no representa ningún riesgo para mi salud más que la posible formación de un pequeño moretón en el área de la punción. Se me ha asegurado que el material genético que se extraiga de mi muestra de sangre se utilizará exclusivamente para investigar las alteraciones genéticas que produjeron mi enfermedad. Manifiesto que se me ha informado que este estudio puede identificar a sujetos que en mi familia presenten la alteración genética y que aún siendo sanos en este momento, desarrollarán la enfermedad posteriormente; se me ha asegurado que esta información será utilizada para fines de atención médica de la familia y solo podrá ser divulgada con nuestro consentimiento explícito. También me ha sido señalado que puedo retirar mi consentimiento para participar en la investigación en el momento en que yo lo desee y que esta decisión no afectaría la calidad de la atención que recibo por parte del personal de este hospital. Finalmente manifiesto que se me han respondido satisfactoriamente todas mis dudas y que los médicos responsables han señalado su compromiso de aclarar las que pudieran surgir en el transcurso del estudio.

Atentamente, _____ Nombre y firma

México, D.F., a _____ de _____ de 200__

Dirección y teléfono _____

Médico responsable _____ Nombre y firma

Testigo 1 _____ Nombre y firma

Testigo 2 _____ Nombre y firma

ARTÍCULOS PUBLICADOS.

Downloaded from bjournal.bmj.com on 26 June 2008



Two different PABPN1 expanded alleles in a Mexican population with oculopharyngeal muscular dystrophy arising from independent founder effects

D Rivera, H Mejia-Lopez, E N Pompa-Mera, C Villanueva-Mendoza, A Nava-Castañeda, L Garnica-Hayashi, S Cuevas-Covarrubias and J C Zenteno

Br. J. Ophthalmol. 2008;92:998-1002
doi:10.1136/bjo.2007.131482

Updated information and services can be found at:
<http://bjournal.bmj.com/cgi/content/full/92/7/998>

These include:

References This article cites 24 articles, 6 of which can be accessed free at:
<http://bjournal.bmj.com/cgi/content/full/92/7/998#BIBL>

Rapid responses You can respond to this article at:
<http://bjournal.bmj.com/cgi/eletter-submit/92/7/998>

Email alerting service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

Notes

To order reprints of this article go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *British Journal of Ophthalmology* go to:
<http://journals.bmj.com/subscriptions/>

Two different *PABPN1* expanded alleles in a Mexican population with oculopharyngeal muscular dystrophy arising from independent founder effects

D Rivera,¹ H Mejia-Lopez,¹ E N Pompa-Mera,² C Villanueva-Mendoza,³ A Nava-Castañeda,⁴ L Garnica-Hayashi,⁴ S Cuevas-Covarrubias,⁵ J C Zenteno¹

¹ Research Unit and Department of Genetics, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana", Mexico City, Mexico; ² Medical Research Unit on Immunology and Infectious Diseases, Infectology Hospital, National Medical Center "La Raza", IMSS, Mexico City, Mexico; ³ Department of Genetics, "Dr. Luis Sánchez Buñes" Hospital and the "Asociación para Evitar la Ceguera en México", Mexico City, Mexico; ⁴ Department of Oculoplastics, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana", Mexico City, Mexico; ⁵ Department of Genetics, Hospital General de México, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico City, Mexico

Correspondence to: Dr J C Zenteno, Department of Genetics, Institute of Ophthalmology "Conde de Valenciana", Chimalpopoca 14, Col. Obrera, Mexico City 06800, México; jzenteno@instituto.deofthalmologia.org

Accepted 19 March 2008

ABSTRACT

Background: Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is a late onset hereditary myopathy of autosomal dominant transmission characterised by ptosis, dysphagia and limb weakness. The disease is caused by short heterozygous expansions of a (GCN)₁₀ triplet located in the first exon of the *PABPN1* gene at chromosome 14q11.1. Most affected individuals from North America and Europe carry a mutant (GCN)₁₃ allele. Although evidence for a founder mutation effect has been shown in several populations with OPMD, analysis of large groups of patients from different ethnic backgrounds will help to identify the relative contribution of each allele to the disease and a possible genotype-phenotype correlation.

Methods: 22 unrelated patients with OPMD from Mexico, a previously uncharacterised population, were clinically and molecularly analysed. Detailed ophthalmological and clinical examinations were performed in each proband and molecular analysis of the *PABPN1* gene was carried out by PCR amplification and allele-specific cloning/sequencing. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) linked to *PABPN1* were determined in each individual and in a number of affected first-degree relatives.

Results: 15 subjects (68%) carried a mutant (GCN)₁₅ or (GCC)₁₁(GCA)₃(GCG) *PABPN1* allele; the remaining 7 (32%) exhibited an abnormal (GCN)₁₃ or (GCC)₉(GCA)₃(GCG) allele. Analysis of two SNPs linked to *PABPN1* strongly suggests that both expanded alleles originate from two independent founder effects. In addition, in this particular population the (GCN)₁₅ allele was associated with an earlier onset of the disease (mean 46.5 years) compared with the (GCN)₁₃ allele (mean 54.7 years).

Conclusion: The results of this study suggest that OPMD in the Mexican population is mostly due to (GCC)₁₁ or (GCC)₉ *PABPN1* expanded alleles arising from two independent founder effect mutations. These findings add to the definition of the genetic features of the disease and to the establishment of a probable genotype-phenotype correlation.

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD, OMIM No 164300) is a distinct autosomal dominant myopathy characterised by a late-onset and progressive clinical triad of palpebral ptosis, dysphagia and proximal limb weakness.¹ Once believed to be a cranial neuropathy, it has been established that the disease results from the selective affection of specific muscular (palpebral, pharyngeal and proximal limb) groups. OPMD was first described by Taylor in 1915, but it was not

called OPMD until 1962.^{2,3} The disease has a worldwide distribution with significant variations in incidence in different geographical areas or ethnic groups, ranging from 1 in 1000 in the province of Quebec to 1 in 200 000 in France.^{1,4}

Typically, symptoms start to appear during the fourth or fifth decades of life, with ptosis being the first reported clinical sign in most cases.⁵ All extraocular and other voluntary muscles may become affected later in the disease. Chronic dysphagia will result in undernutrition and may cause death due to aspiration pneumonia. Additional symptoms include expressionless face, neck muscle weakness, nasal voice due to palatal weakness, weakness and atrophy of the tongue, dysarthria, abnormal gait and hyporreflexia.¹ Histological examination of affected muscles characteristically shows abnormal fibre size, increased endomysial fibrosis and cytoplasmic basophilic-rimmed vacuoles.⁶

The disease has an autosomal dominant mode of transmission with complete penetrance among most families. However, uncommon cases with apparent autosomal recessive inheritance have also been identified.^{7,8} The molecular pathological basis of OPMD involves short heterozygous expansions of a (GCN) triplet located in exon 1 of the poly(A) binding protein 1 (*PABPN1*) gene which is situated at chromosome 14q11.1.⁹ Normal individuals exhibit a tract of 10 consecutive GCN repeats, (GCC)₆(GCA)₃(GCG), while subjects with dominant OPMD have expanded alleles ranging from 12 to 17 (GCN) repeats.⁹⁻¹² These abnormal expansions cause the lengthening of a polyaniline tract located at the N-terminus of PABPN1, a protein involved in the polyadenylation of messenger RNAs.¹⁴ It has not been definitively established if the OPMD is more severe in larger mutation carriers, which contrasts sharply with other trinucleotide-related diseases in which larger expansions are typically associated with more severe or earlier onset of phenotypes.¹⁵ The extremely uncommon autosomal recessive form of OPMD has been shown to result from homozygosity for a *PABPN1* (GCN)₁₁ expansion, a mutation with a prevalence of up to 2% in the French Canadian population.⁹

Molecular *PABPN1* analysis of patients with OPMD from different ethnic backgrounds has shown that the most prevalent allele is (GCC)₉ (GCA)₃(GCG) or (GCN)₁₃, followed by (GCC)₁₀ (GCA)₃(GCG) or (GCN)₁₄ and (GCC)₁₁(GCA)₃(GCG) or (GCN)₁₅.^{11,16} The prevalence of

given (GCN) expanded allele in a specific OPMD population is largely dependent upon founder effect mutations, and this effect has been demonstrated in several populations.^{3-5, 10} Analysis of large groups of patients with OPMD from different ethnic backgrounds will help to identify specific genotype-phenotype correlations as well as the relative contribution of each expanded allele to the disease.

We report the results of *PABPN1* gene analysis in a group of 22 Mexican patients with OPMD. Our results show that the most prevalent allele is (GCC)₁₁(CCA)₃(GCC), which is consistent with a common origin for this allele in Latin American populations studied to date. Our findings showed that the (GCC)₁₁(CCA)₃(CCC) allele was associated with an earlier onset of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-two non-related Mexican patients with a clinical diagnosis of OPMD were included in the study. None of the patients was from the same family. Data concerning familial history of the disease, age of onset of major symptoms, presence of associated symptoms and past history of surgical eyelid procedures were collected for each subject. Because of the insidious onset of signs in OPMD, the age of onset could not be recorded accurately. All participants were questioned about age of onset of symptoms before performing any *PABPN1* molecular analysis. In patients reporting ptosis as the initial symptom, available photographs of the face were analysed to further estimate the age of onset. Each individual underwent a detailed ophthalmological examination in addition to measurement of palpebral fissure height, margin-reflex distance and palpebral levator function, as well as assessment of ocular movements. Ocular movement limitation was evaluated in the four secondary positions of gaze and graded from 0 (normal) to -4 (ophthalmoplegia). Familial data were obtained from each subject indicating country of origin of their ancestors and/or

possible immigration history. A total of 19 clinically and/or molecularly affected first-degree relatives were also included.

DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the DNA Puregene kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). A *PABPN1* gene exon 1 fragment of 245 bp, including the region where the OPMD-related (GCN)_{>10} triplet is located, was amplified by PCR using primers previously described.¹⁹ Each 25 µl PCR reaction contained 1.25 U HotStart Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 1.5 mM MgCl₂, 100 µM of each dNTP, 0.3 µM of each primer, 10% DMSO and 200 ng genomic DNA. PCR buffer included 20 mM Tris-Cl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA and 0.5% (v/v) Tween 20. The PCR amplification programme consisted of an initial denaturation cycle of 15 min at 95°C, 35 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at 62°C, 45 s at 72°C and a final step of 10 min at 72°C.

To test for a probable founder effect, *PABPN1*-linked single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2239579 and SNP2622 were characterized by direct sequencing in all probands and their participating relatives. Oligonucleotides used for SNP analyses were rs2239579(F) 5'-CTC GAT CCG CAA ACT AAG C-3' along with rs2239579(R) 5'-GAG GTC ACA TGA CTA GCC AG-3' and SNP2622(F) 5'-CAA CCA TGC CTC CAC GTT GAA T-3' along with SNP2622(R) 5'-TGC GAT CAC CTG ACT CAC ACA TGA-3'. PCR products were analysed in 1.5% agarose gels from which the bands with the amplified templates were excised and the DNA subsequently purified using the Qiaex II kit (Qiagen). Direct sequencing was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All samples were analysed in an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). In order to characterize both *PABPN1* alleles in subjects with heterozygous (GCN) expansions, an allele specific-cloning/sequencing approach was used. Briefly, new *PABPN1* products were amplified from genomic DNA, gel purified, ligated by means of a TA-ligation method into the TA-cloning vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) and subcloned into

Table 1 Clinical data and *PABPN1* expansion sequences found in 22 Mexican patients with oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)

Patient no	Gender	Age of onset (years)	Age at recruitment (years)	Presenting symptom	(GCC) _n *	rs2239579	SNP2622
1	F	44	64	Ptosis	11/6	TC	TC
2	M	48	53	Dysphagia	11/6	CT	CC
3	F	45	54	Ptosis	11/6	CC	CC
4	F	52	70	Ptosis	11/6	TC	CC
5	F	40	48	Dysphagia	11/6	CC	CC
6	F	42	62	Ptosis	11/6	CC	CC
7	F	36	41	Ptosis	11/6	CC	CC
8	F	50	54	Ptosis	11/6	TC	CC
9	F	53	56	Ptosis	11/6	CC	CC
10	F	47	52	Ptosis	11/6	CT	CC
11	M	48	53	Ptosis	11/6	CT	CC
12	F	50	53	Ptosis	11/6	CC	CC
13	M	53	58	Ptosis	11/6	CC	CC
14	F	42	44	Ptosis	11/6	CC	CC
15	M	48	57	Ptosis	11/6	TC	CC
16	M	62	82	Ptosis	9/6	CT	CC
17	M	55	72	Ptosis	9/6	TT	TC
18	M	48	66	Ptosis	9/6	CT	CC
19	F	50	59	Ptosis	9/6	CT	CC
20	M	60	68	Ptosis	9/6	CT	CC
21	F	54	59	Dysphagia	9/6	TC	CC
22	F	54	66	Dysphagia	9/6	TT	CC

* (GCC)₁₁ refers to a (GCC)₁₁(CCA)₃(GCC) allele; (GCC)₆ refers to a (GCC)₆(CCA)₃(GCC) allele; (GCC)₆ is the wild type (GCC)₆(CCA)₃(GCC) allele. The identity of two *PABPN1* linked single nucleotide polymorphisms is also indicated.

By the time of the study, 8 patients (36%) had undergone palpebral surgery elsewhere so preoperative ophthalmological data could not be obtained. Moderate ptosis was observed in 12 patients (71%) and severe ptosis in 5 (29%). Most patients (21/22, 95%) presented with abnormal function of the superior palpebral levator. Seventeen subjects (77%) exhibited some degree of ocular movement limitation. When analysed by type of mutation, eye movement limitation was found in 11 patients (78%) in the (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) group and in 6 patients (86%) in the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) group. The most common anomaly of ocular movement was limited elevation with a frequency of 68% in the whole sample (86% in the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) group and 60% in the (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) group), followed by limited abduction with a total frequency of 50% (43% in the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) group and 46% in the (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) group). Other symptoms frequently observed included expressionless face in 12 patients (55%), dysphonia in 12 (55%), limb weakness in 11 (50%), non-specific fatigue in 4 (18%) and abnormal gait in 2 (9%).

Analysis of PABPN1 SNPs

All 15 patients with (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) expansions consistently had at least one cytosine in rs2239579 and at least one cytosine in SNP2622 (table 1). This enabled us to deduce the disease haplotype as rs2239579(C)-(GCC)₁₁-SNP2622(C) in this group of subjects. Segregation analysis was performed in six (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) families. In three of these families (12 affected and 5 unaffected relatives), gametic phases were unambiguously established confirming rs2239579(C)-(GCC)₁₁-SNP2622(C) as the OPMD-linked haplotype. In the remaining three families, affected relatives were concordant with rs2239579(C)-(GCC)₁₁-SNP2622(C) as the disease allele. Interestingly, this haplotype is identical to that recently identified in (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) Uruguayan patients with OPMD,¹⁸ suggesting a common ancestral origin for this allele in Latin American OPMD populations. On the other hand, all seven patients carrying the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) mutation consistently had at least one thymine in rs2239579 and at least one cytosine in SNP2622 (table 1). No instances of C-C homozygosity in rs2239579 or T-T homozygosity in SNP2622 were identified. Although gametic phases could not be established in this group of subjects due to the small size of the pedigrees, seven affected relatives from three of these families were also concordant with the rs2239579(T)-(CCG)₉-SNP2622(C) haplotype. These results indicate that the disease haplotype in this group of patients is rs2239579(T)-(CCG)₉-SNP2622(C) and is consistent with a common origin of the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) mutation in Mexico.

DISCUSSION

We present detailed clinical and genetic data obtained from a group of patients with OPMD of Mexican Mestizo origin, a previously uncharacterised ethnic group. Our results add to the definition of the genetic features of the disease and to the establishment of a probable genotype-phenotype correlation. Molecular analyses in different ethnic groups, mainly from North America and Europe, have shown that the most prevalent PABPN1 alleles in OPMD are (GCN)₁₃, (GCN)₁₄ and (GCN)₁₅.⁹⁻¹³ In addition, recent studies have shown that, besides the pure GCG extra triplets, GCA interspersions or different types of expansion mutations can also occur in some patients, most probably resulting from PABPN1 unequal recombination

mechanisms.²⁰⁻²² An exceptional case of OPMD resulting from a PABPN1 point mutation has also been identified.²³

Other than Uruguayan patients,¹⁸ this is the only Latin American OPMD population that has been molecularly characterised to date, and our data are consistent with a common ancestral origin of the most prevalent allele, (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC), in these two countries. All remaining non-(GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) patients in our sample had a (CCG)₉(GCA)₃(GCC) expansion. This molecular homogeneity suggests two different founder effects in the Mexican population, as supported by the analyses of PABPN1-linked SNPs in probands and their affected first-degree relatives. Indeed, all analysed subjects with the (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) genotype consistently demonstrated a rs2239579(C)-(GCC)₁₁-SNP2622(C) haplotype. Interestingly, this mutated haplotype is identical to that recently described in Uruguayan patients with (GCC)₁₁ OPMD by Rodriguez *et al*,¹⁸ which suggests that the (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) allele probably arose from a common ancestor in Mexican and Uruguayan population. The (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) mutation found in Uruguayan families with OPMD originated between the 10th and 14th centuries in the Old World, and it was brought by a family of settlers from the Canary Islands during the immigration waves of the 18th and 19th centuries.¹⁸ Similarly, analysis of SNPs in patients with OPMD and affected relatives carrying a (CCG)₉(GCA)₃(GCC) expansion in our study revealed that they all shared a common rs2239579(T)-(CCG)₉-SNP2622(C) haplotype. Although based on a small sample, these results point towards a founder effect for the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) allele in our population. None of the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) patients in our sample had the haplotype rs2239579(C)-(GCC)₉-SNP2622(T), which is related to the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) founder allele of Bukhara Jews in Israel.¹⁸ These data indicate that the OPMD (GCC)₉(GCA)₃(GCC) allele has arisen independently in distinct populations. Our results suggest that OPMD in Mexican subjects results from two independent founder effects. Founder effects have been demonstrated previously in several OPMD populations.¹⁶⁻¹⁸ Conversely, other populations have demonstrated genetic heterogeneity with several different mutations associated with the disease.¹¹⁻¹³

No specific genotype-phenotype correlation has so far been established in OPMD, in contrast with other triplet expansion-related diseases. Several authors have tried to correlate the age of onset and severity of the disease with the number of (GCN) repeats, with conflicting results.¹¹⁻¹³ In our study, patients with the (GCC)₁₁(GCA)₃(GCC) mutation had an earlier onset of symptoms than those carrying the (CCG)₉(GCA)₃(GCC) allele (46.5 years vs 54.7 years), a difference which was statistically significant ($p < 0.05$). It should be noted, however, that a limitation of our study is the small size of both groups which could have an effect on this apparent correlation in age of onset. Alternatively, genetic features particular to the population under study could account for this clinical difference.

PABPN1 (GCN) expansions in OPMD have been classically considered as mitotically and meiotically stable,⁹⁻¹¹ but a high proportion of uncommon alleles arising from unequal recombination has recently been demonstrated in some populations.¹²⁻²¹ To characterise our OPMD population molecularly, we used an allele-specific cloning/sequencing approach. This technique has not previously been used to analyse the DNA of patients with OPMD, and it enabled us to characterise both expanded and normal PABPN1 alleles accurately. No uncommon PABPN1 alleles were identified in our sample.

The finding of abnormal levator function in 95% of patients in this study indicates that this sign should be explored in the regular clinical assessment of OPMD. Levator function is not usually reported in the clinical evaluation of individuals suffering OPMD. Ptosis and dysphagia were the two most common symptoms found in the patients in our sample. Ptosis was the initial symptom in 82% of patients and dysphagia in the remainder. Patients in whom ptosis was the first symptom developed dysphagia approximately 4 years later. This indicates that, if a patient with OPMD presents at an early stage of the disease with ptosis as the only sign, the disease could be erroneously excluded in the absence of dysphagia. In this context, it has recently been shown that palpebral ptosis can aggravate dysphagia in subjects with OPMD.²⁴ In individuals examined at the initial phase of the disease, molecular diagnosis can easily confirm or exclude a diagnosis of OPMD.

The data obtained in this study contribute to the molecular knowledge regarding OPMD, particularly in Latin American populations. Our results are consistent with a common founder effect between Mexican and Uruguayan OPMD populations carrying the common (CCC)₁₁(CCA)₃(CCG) allele. More studies are needed to confirm the apparent earlier disease onset associated with the (CCC)₁₁(CCA)₃(CCG) mutation in our population.

Funding: Financial support was provided by the "Conde de Valenciana" Patronage.

Competing interests: None.

Ethics approval: Local institutional ethics committee approval was obtained.

Patient consent: Informed consent was obtained from each participating patient.

REFERENCES

1. **Brak B.** Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet Genome Res* 2003;**100**:252–60.
2. **Taylor EW.** Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis. Contribution to group of family diseases. *J Nerv Ment Dis* 1915;**42**:129–39.
3. **Victor M, Hayes R, Adams RD.** Oculopharyngeal muscular dystrophy. A familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. *N Engl J Med* 1962;**267**:1267–72.
4. **Blumen SC, Napeanu P, Sadeh M, et al.** Epidemiology and inheritance of oculopharyngeal muscular dystrophy in Israel. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**:538–40.
5. **Brak B, Rouleau GA, Bouchard JP, et al.** Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Sem Neurol* 1999;**19**:59–66.
6. **Tané FMS, Chateau D, Habling-Ledier A, et al.** Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**:563–5.
7. **Haber S, Webberley MJ, Lunt P, et al.** Siblings with recessive oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2007;**17**:254–7.
8. **Sannier A, Kress W, Vielhaber S, et al.** Variability of the recessive oculopharyngeal muscular dystrophy phenotype. *Muscle Nerve* 2007;**35**:681–4.
9. **Brak B, Bouchard JP, Xie YG, et al.** Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;**18**:164–7.
10. **Mimbella M, Silvestri G, de Rosa G, et al.** GCG genetic expansions in Italian patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurology* 2000;**54**:1938–41.
11. **Hill ME, Creed GR, McMullan TF, et al.** Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain* 2001;**124**:522–6.
12. **Muller T, Schroder R, Ziet S.** GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2001;**24**:120–2.
13. **Robinson DO, Hammans SR, Read SP, et al.** Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the PABP1 gene expansion sequence in 86 patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism. *Hum Genet* 2005;**115**:267–71.
14. **Wahle E, Lustig A, Jeno P, et al.** Mammalian poly(A)-binding protein 1: Physical properties and binding to polynucleotides. *J Biol Chem* 1993;**268**:2937–45.
15. **Cummings CJ, Zoghbi HY.** Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;**1**:281–328.
16. **Blumen SC, Korczyn AD, Lavie H, et al.** Oculopharyngeal MD among Bukhara Jews is due to a founder (GCG)₉ mutation in the PABP2 gene. *Neurology* 2000;**55**:1267–70.
17. **Becher MW, Morrison L, Davis LE, et al.** Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans. *JAMA* 2001;**286**:2437–40.
18. **Rodriguez M, Cornejo C, Bertoni B, et al.** (GCG)₁₁ founder mutation in the PABP1 gene of OPMD Uruguayan families. *Neuromuscul Disord* 2005;**15**:185–90.
19. **Ramirez-Mimansa A, Zenteno JC.** PABP gene intragenic deletions in Mexican patients with congenital amsidia. *Mol Vis* 2006;**12**:318–23.
20. **Nakanoto M, Nakano S, Kawashima S, et al.** Unequal crossing over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch Neurol* 2002;**59**:474–7.
21. **van der Sluis BM, van Engelen BG, Hoefsloot LH.** Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) due to a small duplication in the PABP1 gene. *Hum Mutat* 2003;**24**:553.
22. **Robinson DO, Wills AJ, Hammans SR, et al.** Oculopharyngeal muscular dystrophy: a point mutation which mimics the effect of the PABP1 gene triplet repeat expansion mutation. *J Mol Genet* 2006;**43**:a23.
23. **Muller T, Drauschauer M, Kolbe-Fehr F, et al.** Genetic heterogeneity in 30 German patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol* 2006;**253**:892–5.
24. **de Swart BJ, van der Sluis BM, Vos AM, et al.** Ptosis aggravates dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;**77**:266–8.