



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ANÁLISIS DE LOS REPETIDOS CTG EN EL GEN DMPK EN LA POBLACIÓN MEXICANA: DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE LOS ALELOS LARGOS NORMALES CON RESPECTO A LA PRESENCIA DE DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1) EN MÉXICO”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

NADIA MIREYA MURILLO MELO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: Canizales Quinteros Samuel
VOCAL	Profesor: Fernández Salgado Ma. Benita Leonor
SECRETARIO	Profesor: Magaña Aguirre Jonathan Javier
1er. SUPLENTE	Profesor: Maldonado Jiménez Perla Deyanira
2° SUPLENTE	Profesor: Dimitrova Dinkova Tzvetanka

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Medicina Genómica, Departamento de Genética. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

ASESOR DEL TEMA:

Dr. en C. Jonathan Javier Magaña Aguirre

SUSTENTANTE (S):

Nadia Mireya Murillo Melo

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Medicina Genómica del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), bajo la dirección del Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre.



Para la realización del presente trabajo fue indispensable el apoyo del grupo encabezado por la Dra. Lorena Orozco del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y el grupo liderado por la Dra. Rocío Gómez del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) para la obtención de las muestras de grupos nativo-americanos.



Contenido

1. Introducción	6
1.1. Marco Teórico	6
1.1.1. Elementos del Genoma Humano	6
1.1.2. Elementos repetidos en tándem	8
1.1.2.1. Microsatélites.....	11
1.1.2.2. Variabilidad de los elementos microsatélites.....	13
1.2. Mecanismos de inestabilidad	15
1.2.1. Replicación	15
1.2.3. Reparación	17
1.2.4. Recombinación.....	17
1.2.5. Otros mecanismos involucrados	18
1.3. Enfermedades por expansión de repetidos	20
1.4. Distrofia miotónica tipo 1 (DM1)	22
1.4.1. Papel de los repetidos CTG en la patogénesis de la DM1	24
1.4.2. Patogénesis molecular de la DM1	25
1.4.3. Prevalencia de la DM1.....	27
1.5. DM1 en México y el papel de los repetidos CTG en la población sana	28
2. Justificación	31
3. Planteamiento del problema	32
4. Objetivo General	33
4.1. Objetivos particulares	33
5. Metodología	34
5.1. Estrategia experimental	34
5.2. Sujetos de estudio.....	35
5.2.1. Población General Mestizo Mexicana	35
5.2.2. Familiares sanos de pacientes con DM1	36
5.2.3. Grupos étnicos de la población mexicana (nativo-americanos).....	36
5.3. Extracción de DNA genómico	37
5.4. Cuantificación de DNA.....	38
5.5. Determinación del número de repetidos CTG en el gen DMPK	38
5.5.1. Reacción en cadena la polimerasa (PCR).....	38

5.5.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	40
5.6. Análisis mediante electroforesis capilar.....	41
5.7. TP-PCR para individuos heterocigotos	42
5.8. Determinación de la conformación de los repetidos CTG a través de secuenciación.....	44
5.9. Análisis estadístico y poblacional	44
6. Resultados	46
6.1. Genotipificación de los repetidos CTG del gen <i>DMPK</i> en la población mestizo-Mexicana: Poblaciones de tres regiones del país	46
6.2. Frecuencia de los repetidos CTG normales en familiares de pacientes con DM1.....	48
6.3. Distribución de los repetidos CTG en diversos grupos étnicos de México: análisis de poblaciones Nativo-Americanas.....	49
6.3.1. Región Sur-Este	51
6.3.2. Determinación de los repetidos CTG en los grupos étnicos de la región Norte de México	52
6.3.3. Determinación de los repetidos CTG en los grupos étnicos de la región centro de México.....	53
6.3.4. Determinación de los repetidos CTG en los grupos étnicos de la región Sur de México	55
6.4. Comparación de la Distribución alélica de los grupos étnicos y la población Mestizo Mexicana	57
6.5. Parametros poblacionales para los grupos analizados	59
6.6. Análisis de los alelos largos normales en la población mexicana	60
6.7. Efecto de la composición de los repetidos CTG de los alelos largos normales	62
7. Discusión	64
7.1. La DM1 en nuestro país y su carga genética	65
7.2. Comportamiento genético del triplete CTG en la población mestizo-mexicana.....	69
7.3. Repetidos CTG en diversos grupos étnicos y su efecto en la población general.....	70
7.4. Análisis de los alelos largos normales y su importancia.....	72
7.5. El efecto de la composición del tracto de repetidos, un primer análisis.....	744
8. Conclusiones	76
9. Perspectivas	77
10. Bibliografía	78

1. Introducción

1.1.Marco Teórico

1.1.2 Elementos del Genoma Humano

Con el inicio del siglo XXI, el conocimiento en el área de la genómica se incrementó considerablemente, el desarrollo de técnicas de secuenciación a mayor escala tuvo como resultado en el año 2001 la secuenciación del genoma humano. Los resultados de esta etapa muestran que nuestro genoma se encuentra comprendido por alrededor de 3.2×10^9 pb, lo que llevó a los investigadores inicialmente a pensar que un genoma de tal magnitud se conformaba por unos 30000 a 40000 genes repartidos en 23 pares de cromosomas (Venter et al. 2001; International Human Consortium Genome Sequencing Consortium, 2001).Actualmente, se sabe que el número de genes que originan a una proteína es menor de lo que se pensaba, se han determinado alrededor de unos 20000 genes implicados, muchos de los cuales aún no se conoce su función específica (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).El genoma humano consta tanto de regiones de codificación, como de regiones no codificantes, y a pesar de la magnitud de nuestro genoma, se considera que solo el 1.4% del genoma presenta una función codificante (Gregory Ryan, 2005). Las regiones codificantes pueden dividirse en: genes que codifican para el ARN mensajero (ARNm) que posteriormente se traducen para la formación de polipéptidos y proteínas; y los genes que codifican de manera exclusiva para los ARN's como su producto final (tARN, rARN, miARN, etc.). A diferencia de los procariontes, los vertebrados y las plantas superiores presentan proporciones mucho más bajas de regiones codificantes.

Por otro lado, las regiones no codificantes (anteriormente conocidas como “*ADN basura*” por su falta de función) pueden contener regiones que desempeñan papeles importantes en la estructura cromosómica y la regulación de genes

(Gregory, 2005), lo cual ha llevado a los investigadores a determinar si estas regiones pueden contribuir funcionalmente con las regiones codificantes anteriormente descritas. Dentro de las regiones no codificantes, se presentan en gran proporción secuencias repetidas, que pueden constituirse por repeticiones de pequeños fragmentos (mononucleótidos, dinucleótidos, hasta hexanucleótidos), hasta de repeticiones compuestas por fragmentos dispersos constituidos por decenas, cientos o miles de pares de bases (Figura 1).

Los elementos repetidos de mayor magnitud son los elementos dispersos o transponibles que pueden estar conformados por variaciones con un tamaño de 6 a 8 kb, como son los elementos dispersos de secuencia larga (LINES), también se han descrito repeticiones que van de 300 a 400pb como los elementos dispersos de secuencia corta (SINES), o elementos más pequeños como los semejantes a retrovirus o transposones de ADN (García Barreno, 2001). Se piensa que gran parte del ADN no codificante se formó a partir de la replicación de estos elementos, así como algunos genes que se encuentran altamente conservados entre sí. Por ejemplo, la secuencia Alu conocida por ser el elemento más común de los SINES, se conforma por aproximadamente de 300 pb de longitud y se repite aproximadamente hasta 300,000 veces en el genoma humano, lo que representa el 5 % del genoma (Jones and Bartlett, 2011). Estas secuencias repetidas pueden estar presentes en diferentes números de copias y se han utilizado para la detección de diferencias entre los individuos en una población o en especies relacionadas.

Aunado a estos, se han descrito unidades de repeticiones en tándem conocidas como minisatélites (VNTR's; del inglés variable number of tándem repeats) y microsatélites (STR, short tándem repeats). Estos repetidos se constituyen por repeticiones de fragmentos más pequeños y que presentan una tasa de mutación mayor a lo establecido en otras regiones del ADN, por lo que pueden ser usados como marcadores polimórficos para el mapeo de genomas, trabajos forenses y genética de la conservación (Ellegren, 2004).

Por mucho tiempo se pensaba que estos elementos repetidos solo se distribuían en el material genético no codificante y que no tenían algún papel de importancia en la constitución y funcionalidad del genoma, ahora se sabe que pueden localizarse tanto en regiones reguladoras de genes específicos, así como en regiones codificantes, por lo que variaciones de estos elementos pueden tener una consecuencia funcional y en algunos aspectos afectar la maquinaria molecular de las células de nuestro organismo. Por lo tanto, el estudio de los elementos repetidos en tándem, son de gran importancia, no solo como marcadores moleculares, si no como factores que puedan tener una implicación en la funcionalidad de un organismo.

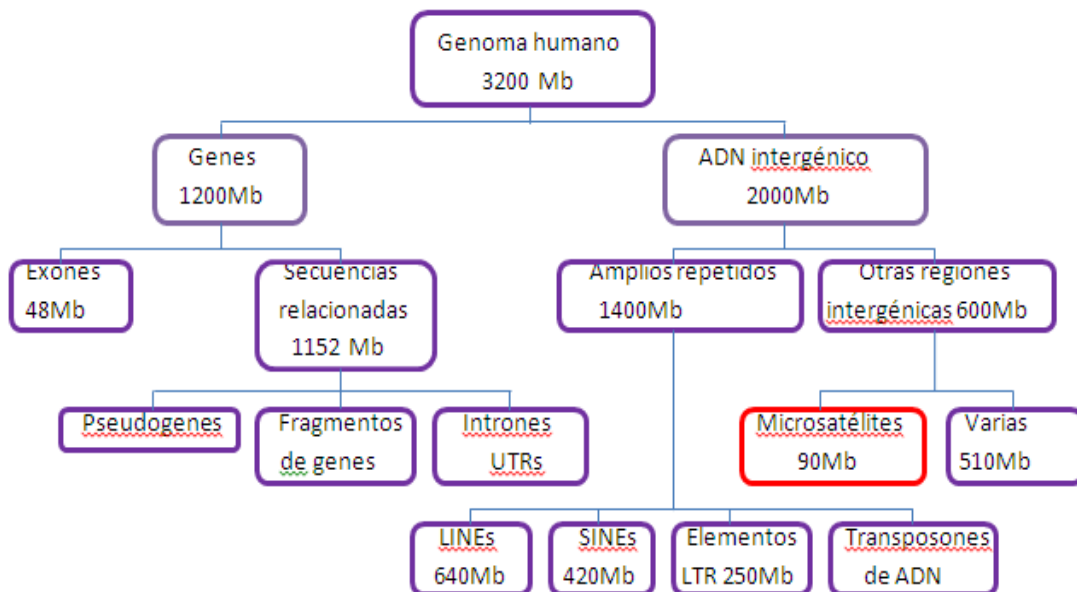


Figura 1: La composición del genoma humano. Abreviaturas: UTR (untranslated regions) región no traducida.

1.1.2. Elementos repetidos en tándem

La mayoría de estos repetidos en tándem se han encontrado localizados en regiones no codificantes y debido a su alta variabilidad entre individuos y poblaciones son conocidas como variantes altamente polimórficas, por lo que su

análisis ha llevado a que estos marcadores sean utilizados para la realización de mapas genéticos y pueden ser usados de manera extensiva para la asociación de genes susceptibles en el desarrollo de diferentes enfermedades. Además son usados para el análisis de exclusión de paternidad e identificación entre individuos, así como para determinar variabilidad poblacional, en estudios de parentesco o afinidad, en estudios de genética de población, en estudios de hibridación entre especies emparentadas, en la comparación de niveles de variación de especies y poblaciones ya que pueden proveer un uso para la valoración genética total, y estimar tamaños de población efectiva y migración entre subpoblaciones (Hartl and Jones, 2009). Como marcadores para la asociación de enfermedades han sido los más usados a finales de la década de los 90's y principios de éste siglo. Históricamente las repeticiones en tándem formaban parte del ADN no funcional "basura", esto por su naturaleza altamente inestable. Sin embargo, reciente evidencia aclara el importante papel que las repeticiones pueden desempeñar en los genomas. En la década de 1960, los científicos identificaron estos elementos repetitivos como la explicación de la correlación negativa entre organismos en la complejidad fenotípica y el tamaño de su genoma (Gemayel R. et al. 2012).

Las principales clases de ADN repetido en tándem son: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite, que varían en el tamaño de la repetición así como en la localización cromosómica (Brown, 2007) (Tabla 1).

El genoma humano contiene en total unas 250 Mb de ADN satélite (llamado así porque al separar el ADN genómico en gradientes de densidad aparece como 3 bandas "satélites" de la banda principal). El ADN satélite está formado por la repetición de una secuencia de ADN miles de veces en tándem, es decir unas copias pegadas a otras. Esto da lugar a regiones repetidas con tamaños que van desde 100 kb hasta varias megabases. Por ejemplo, el ADN Satélite 1 es una secuencia de 42 nucleótidos, mientras que en el Satélite 2 la secuencia repetida es (ATTCCATTTCG). Un tipo de ADN satélite muy importante es el ADN alfoide ó Satélite alfa, en el que la secuencia repetida tiene un tamaño de 171 nucleótidos, y

que forma parte del ADN de los centrómeros de los cromosomas humanos. Otros tipos de ADN satélite son el Satélite beta (repetición de 68 nucleótidos) y el Satélite gamma (repetición de 220 nucleótidos), que también se encuentran en la cromatina centromérica de varios cromosomas (Guízar-Vázquez, 2001).

Tabla 1: Principales clases de ADN humano repetido en tándem. Tomado de Strachan T (Strachan and Read 2004).

Clase	Tamaño de la repetición	Localización cromosómica mayor (s)
ADN Satélite (bloques frecuentemente de 100 kb a varios Mb de longitud)	5-171 pb	Especialmente en los centrómeros
α (ADN alfoide)	171 pb	Heterocromatina centromérica de todos los cromosomas
β (<i>Sau3</i> Una familia)	68 pb	Heterocromatinacentromérica de 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 y Y
Satélite 1 (AT-ricos)	25-48 pb	Heterocromatina centromérica de la mayoría de los cromosomas y otras regiones heterocromáticas
Satélites 2 y 3	5 pb	La mayoría, posiblemente, todos los cromosomas
ADN Minisatélite (bloques de frecuencia dentro de la gama de 0,1-20 kb)	6-64 pb	En o cerca de los telómeros de los cromosomas
familia telomérica	6 pb	Todos los telómeros
familia hipervariable	9-64 pb	Todos los cromosomas, a menudo cerca de los telómeros
ADN Microsatélite (bloques a menudo menores a 150 pb) Secuencias repetidas simples	1-6pb	Dispersos a lo largo de todos los cromosomas; algunos pequeños arreglos de secuencia simple

El ADN de tipo Minisatélite está formado por secuencias de 14 a 75 nucleótidos que se repiten en tándem hasta dar un tamaño total de fragmento entre 100 nucleótidos y 20 kb. Algunas repeticiones de este tipo son polimórficas, y dan lugar a los marcadores de tipo VNTR, dichos elementos fueron los primeros en ser utilizados para estudios de identificación humana, sin embargo al ser fragmentos de mayor tamaño son susceptibles a degradación y a presentar un menor poder estadístico en la discriminación de individuos.

Por último el ADN de tipo Microsatélite está formado por secuencias de ADN hasta de 6 nucleótidos que se repiten para dar bloques con un tamaño total habitualmente no superior a 150 nucleótidos. Hay repeticiones de este tipo por todo el genoma humano, y muchas de ellas son muy útiles como marcadores genéticos porque el número de repeticiones varía entre individuos, utilizándose como los marcadores de elección para identificación humana, dejando en desuso a los marcadores minisatélite debido a su alta confiabilidad. En la actualidad se estima que aproximadamente el 3% del genoma humano está constituido por ADN microsatélite o pequeños elementos repetidos en tándem (*short tandem repeats* ó STRs y/o *simple sequences repeats* ó SSRs por sus siglas en inglés) (Strachan and Read, 2004; Magaña, 2012). Estos elementos, a diferencia del ADN satélite y los minisatélite, pueden presentarse en mayor frecuencia en regiones reguladoras de muy diversos genes, así como se han identificado diversos elementos en regiones codificantes, por lo que su estudio es de gran importancia para la regulación del genoma y posibles implicaciones en diversas patologías.

1.1.2. Microsatélites

Los microsatélites o secuencias cortas de repetición en tándem (STR) son sistemas multialélicos altamente polimórficos, en los cuales el número de repeticiones en tándem es de 1 a 6 pb por lo que se les clasifica como: a) mononucleótidos, cuyos representantes más comunes en el humano (*Homo sapiens*) son las secuencias poli(A)/poli(T); b) los dinucleótidos, siendo los más comunes los CA/TG, los cuales ocurren con una frecuencia hasta dos veces mayor que AT, y tres veces más que AG/TC; c) los trinucleótidos, entre los que se encuentran CAG y AAT como los más comunes; y d) los tetranucleótidos, e) los pentanucleótidos y f) los hexanucleótidos que son los STR más estables (Strachan and Read, 2004).

Estos marcadores se encuentran distribuidos en todo el genoma humano. Los STR se encuentran, principalmente, en los genomas de los mamíferos así

como en los cloroplastos y se han clasificado como puros, compuestos e imperfectos (Tabla 2). El tamaño de los alelos de la mayoría de los loci STR se encuentran en el rango de 100 a 400pb, lo que les permite ser explorados fácilmente en muestras degradadas y escasas; además se pueden detectar fácilmente por técnicas sencillas como la electroforesis en poliacrilamida seguida de la tinción de plata y más recientemente haciendo uso de la electroforesis capilar (EC) en analizadores de ADN automáticos. La electroforesis en gel ha sido el método convencional para determinar el tamaño de los productos de PCR, sin embargo la técnica consume mucho tiempo y no es cuantitativa. La EC es una importante herramienta para este propósito, porque ofrece los beneficios de una separación rápida (24 min) y eficiente de los fragmentos del ADN, empleando los principios de carga, hidrofobicidad, estereoespecificidad y tamaño. Estos marcadores presentan importantes ventajas, ya que se encuentran en grandes cantidades, y relativamente espaciados a lo largo de todo el genoma, son importantes debido a que son más específicos, sobretodo en poblaciones con niveles bajos de variación de aloenzima y ADN mitocondrial (mtADN).

Tabla 2. **Clasificación de los polimorfismos STR en base al patrón de repetidos**

Puros	CACACACACACACAACACACACA
Compuestos	CACACACACAGAGAGAAGAGAGA
Imperfectos	CACATTCACATTCATTCATTCACAT

Los polimorfismos del tipo microsatélite deben su variabilidad principalmente a la longitud de sus alelos, más que a las diferencias en la secuencia de ADN. Como se ha mencionado, son altamente polimórficos y generalmente presentan una baja tasa de mutación, en ocasiones pueden comportarse de manera inestable presentando expansiones en el número de unidades repetidas durante los procesos de mitosis y/o meiosis (Schlötterer, 2000). Los marcadores tipo microsatélite tienen una tasa de mutación en un rango aproximado de 10^{-6} a 10^{-2} ,

sin embargo en existen algunos repetidos que al parecer pueden tener un efecto a nivel celular y fenotípico en un organismo produciendo múltiples patologías, es en estos casos en que la tasa de mutación aumenta considerablemente, a lo que se le denomina como “mutaciones dinámicas”(Schlötterer, 2000).

A lo largo del tiempo, se han establecido varios modelos donde explican el comportamiento dinámico expansión/contracción de las secuencias que incluyen estos repetidos, principalmente están involucrados procesos genéticos en donde ocurre una separación entre las dos hebras del ADN, como es el caso de la replicación, recombinación y sistemas de reparación, que pueden actuar de forma independiente o en conjunto. La formación de estructuras secundarias no comunes del ADN, también conocidas como estructuras “no B-ADN” (tales como horquilla/bucle, cadena triplex, cadena cuatruplex) son la principal causa que pueden originar estas modificaciones estructurales (Mirkin, 2007; Wells, 2005).

1.1.2. Variabilidad de los elementos microsatélites

El origen de los microsatélites y sus expansiones fue explicado a través del deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN, cuando la hebra naciente se re-alinea incorrectamente y provoca un aumento o disminución de las unidades de repetidos (Strachan and Read, 2004; Sharma et al. 2007; Magaña, 2012)(Figura 2). A pesar de que estos eventos son corregidos por el sistema que repara el apareamiento incorrecto (MismatchRepair o MMR), existe un bajo número de variantes que escapan a dicha reparación originando una nueva mutación (Wells, 2006; Schlötterer, 2000).Este deslizamiento se ha comprobado en sistemas *in vivo*, y puede ser observado *in vitro* durante la misma amplificación de unidades repetidas por PCR, fenómeno conocido como “stutter” (Edwards et al. 1991; Lins et al. 1998).Sin embargo este fenómeno solo ha podido explicar claramente las expansiones y contracciones de mononucleótidos y dinucleótidos.

Actualmente, el origen y la inestabilidad de los microsatélites tri-, tetra-, penta-, o hexanucleótidos no se han comprendido por completo. Este grupo de STR's es fundamental, ya que son los repetidos que se han asociado al desarrollo de diversas enfermedades monogénicas (Strachan and Read, 2004). A pesar de que la variabilidad de los elementos repetidos es explicada por pequeños errores durante la acumulación de cientos o miles de años, originados principalmente por cambios evolutivos, en ocasiones la expansión y contracción de estos repetidos pueden ser aún más inestables considerando cambios que pueden desembocar en el desarrollo de una patología.

Una prominente inestabilidad de repetidos se asocia a mecanismos complejos que probablemente surgen a través de múltiples procesos que se producen de forma individual o en combinación dependiendo del tejido, estado de proliferación y etapa de desarrollo celular (Pearson, 2005). Los mecanismos de expansión/contracción de las secuencias que incluyen estos repetidos, ocurren a través de diversos procesos celulares como son la replicación, recombinación y los sistemas de reparación (Schlötterer 2000). Este deslizamiento no sólo ocurre in vivo, también se ha observado durante la amplificación por PCR (Edwards et al. 1991).

Con base en lo anterior, se puede decir que las mutaciones a veces involucran más de una unidad de repetidos y que los eventos de mutación no son heterogéneos con respecto a los loci, a los tipos de repetidos o a los mismos organismos (Schlötterer 2000). Además, esta heterogeneidad se hace evidente en el constante cambio de longitud de los microsatélites, posiblemente causado por la cantidad de repetidos en loci individuales o debido a la estructura de la secuencia. Afortunadamente, la alta tasa de mutación en los microsatélites facilita el estudio de estos eventos, principalmente en modelos bacterianos y/o levaduras (Ellegren, 2004).

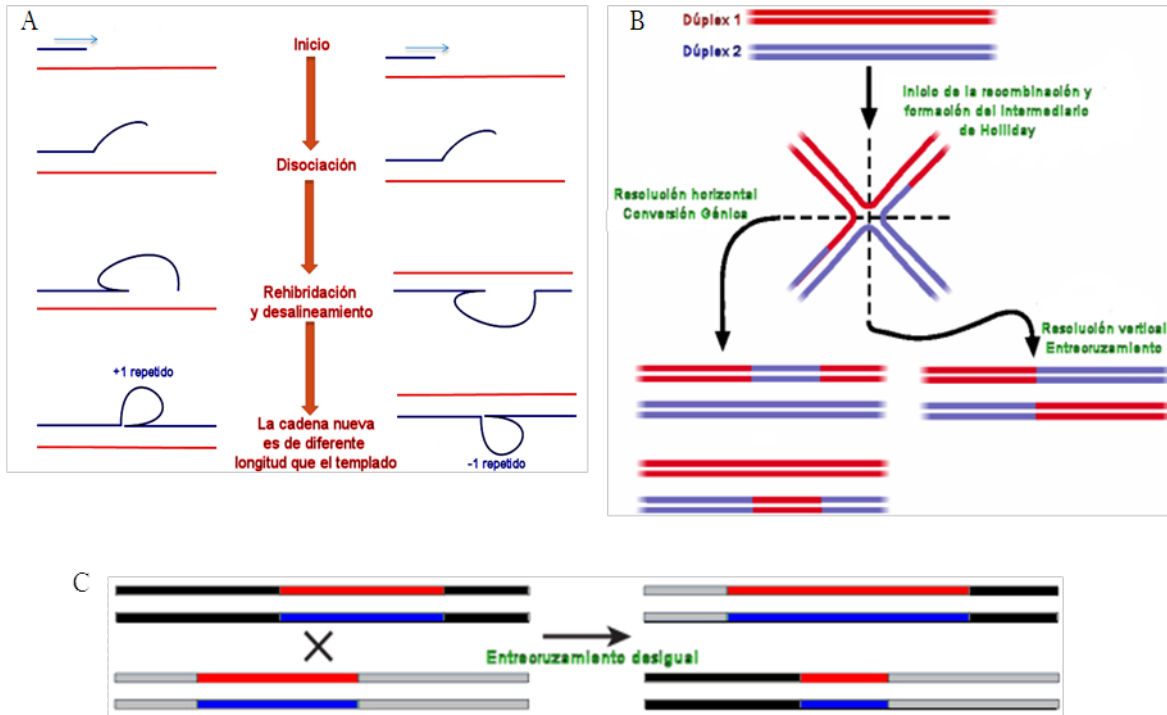


Figura 2: Mecanismos de mutación en los locimicrosatélites. A) Después de que inicia la replicación en un repetido, las dos hebras pueden separarse. Si la hebra se alinea fuera de sitio, la replicación continuará alterando el número de repetidos. Un deslizamiento en la hebra naciente provocará un aumento del repetido, por el contrario, si sucede en la hebra molde se disminuirá el número de repetidos. B) y C) Los procesos de recombinación que producen conversión génica introducen mutaciones en la secuencia microsatélite más larga.

1.2. Mecanismos de inestabilidad

1.2.1. Replicación

La asociación que existe entre la inestabilidad de repetidos (principalmente trinucleótidos) y la proliferación celular apoya el papel de la replicación en la inestabilidad. La formación de estructuras ADN-no B y el deslizamiento de la cadena rezagada podrían facilitar la inestabilidad (Figura 3). Existen evidencias del papel que juega la cadena rezagada en la inestabilidad, como la similitud entre el umbral de inestabilidad y la longitud del Fragmento de Okazaki, así como la inestabilidad de repetidos en levaduras mutantes para rad27/fen 1 (enzimas exo o

endonucleasas involucradas en el procesamiento de Okazaki). Además el tratamiento con fármacos que alteran la progresión de la horquilla de replicación en células de pacientes con una enfermedad producida por expansiones de repetidos como la Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1) afecta el curso de la expansión de los tripletes CTGs (Yang et al. 2003; Pearson et al. 2005). Además, la orientación de las secuencias de repetidos en relación a la dirección de replicación, la localización de las secuencias de repetidos y la participación de la endonucleasa son componentes interesantes en este proceso (Wells et al. 2005; Wells, 2006). La localización del origen de replicación podría ser crucial, debido a que un cambio en la localización determina la dirección de replicación en el repetido y define el templado de la cadena rezagada, lo que afecta la estabilidad en diversos modelos.

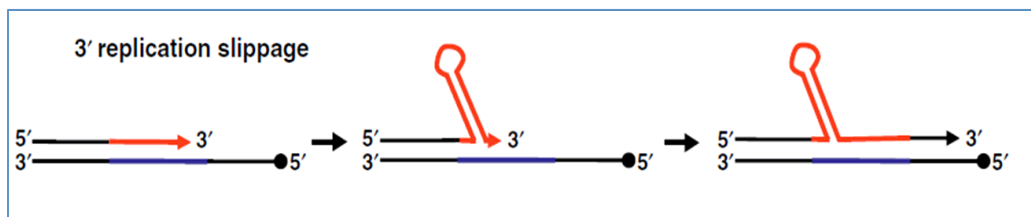


Figura 3. Formación de hairpin durante la replicación (tomada de Kim and Mirkin 2013).

Hasta ahora el elemento más interesante relacionado a la replicación es la *pausa* de la ADN polimerasa en las diferentes estructuras de ADN–no B, lo que causa que la horquilla de replicación se colapse. Esta pausa se ve afectada por el tamaño de los repetidos, la pureza y la dirección de replicación. La restauración de esta pausa involucra mecanismos de deslizamiento y/o rupturas de doble cadena dentro o cerca de los trectos de repetidos, lo que hace imprescindible la intervención de las maquinarias de reparación y recombinación para que la replicación pueda continuar (Wells, 2006).

1.2.3. Reparación

La acumulación de inestabilidad de CAG en tejido no mitótico de pacientes y la estabilidad alterada en diversos tejidos de ratón deficientes en reparación apoya la participación de los procesos de reparación del ADN en la inestabilidad. La reparación de la inestabilidad de repetidos en tándem puede involucrar el procesamiento de intermediarios mutagénicos que se forman en las horquillas de replicación, sitios de rotura de cadena doble o simple o daño endógeno del ADN, dentro o cerca del tracto de repetición (Pearson et al. 2005).

Las proteínas MMR (*Mismatch-repair*) están directamente implicadas en la inestabilidad CAG/CTG. En diversos modelos murinos se observa que este tipo de expansiones requieren de las proteínas funcionales MSH2, MSH3 y PMS2 (Savouret et al 2003). También se ha sugerido un papel importante del complejo MSH2:MSH3 en la inestabilidad debido a que en un modelo de ratón con deficiencia de MSH6 aumentó la cantidad del complejo MSH2:MSH3 y esto potenció la expansión (van denBroeck et al. 2002). Por lo tanto, variaciones y mutaciones que afecten la funcionalidad de este complejo de proteínas de reparación, podrían estar implicadas en un aumento en la variación de repetidos STRs, siendo un aspecto importante cuando existen expansiones de gran magnitud tanto a nivel germinal como somático, lo cual puede estar implicado en el desarrollo de patologías asociadas a expansiones anormales de repetidos.

1.2.4. Recombinación

La recombinación entre secuencias que flanquean el tracto de repetición es raro en la mayoría de desórdenes que involucran repetidos en tándem. En los seres humanos, la expansión masiva en línea germinal en los loci *DM1*, *DM2*, *FRAXA*, *SCA8*, *SCA10* y *FRDA* podría involucrar recombinación dentro de la tracto, probablemente por hibridación intracromosomal (entre cromátidas

hermanas) como resultado de la síntesis de ADN dependiente de hibridación (Pearson et al. 2005).

También se han utilizado modelos de levadura para estudiar la inestabilidad y en particular la reparación de rupturas de doble cadena. En experimentos con más de 250 repetidos CTG/CAG se pudo probar que las rupturas de doble cadena y la recombinación estaban implicadas en los mecanismos de inestabilidad. Demostraron que los trectos de repetidos largos inducen las rupturas de doble cadena de una forma dependiente a su longitud y que este tipo de secuencias son propensas a expandirse cuando los eventos de recombinación inician en lugares cercanos a los repetidos (Freudenreich et al. 1998; Wells, 2006).

En otro modelo de levadura se indujeron las rupturas de doble cadena con la endonucleasa “homing” (HO) y observó que en presencia de repetidos cortos, casi el 20% de las rupturas inducían eventos de conversión génica que llevaban deleciones de las secuencias repetidas. Sin embargo cuando se utilizaban repetidos más largos (98 repetidos), la conversión génica llevaba a eventos de expansión en aproximadamente 30% de las rupturas (Richard et al. 1999; Wells, 2006). Sin embargo el papel exacto de la recombinación en la inestabilidad es difícil de determinar debido a que es difícil detectar los eventos de recombinación que tienen puntos de ruptura dentro de los trectos de repetición (Pearson et al. 2005).

1.2.5.Otros mecanismos involucrados

Además de los mecanismos antes mencionados, existe una variabilidad interpersonal que puede influir en una mayor o menor estabilidad, como:

A) Elementos en cis

Los elementos en “*cis*” son regiones de ADN o ARN que regulan la expresión de genes localizados en la misma molécula de ADN. Este término proviene del latín *cis* que significa “en el mismo lado”. Los elementos en *cis* que pueden afectar la estabilidad se clasifican en internos y externos. Dentro de los internos se

encuentran: la longitud o número de repetidos y la secuencia de los repetidos (si presentan o no interrupciones a lo largo del microsatélite). Por otro lado, dentro de los externos se encuentran las secuencias que flanquean los repetidos, los nucleosomas, la metilación y los orígenes de replicación (Cleary and Pearson, 2003; Pearson et al. 2005; Polak, 2013).

A mediados de la década de los 90's se demostró que repetidos expandibles tienen propiedades estructurales inusuales, suelen plegarse en estructuras de horquillas que comprenden pares de bases de tipo Watson-Crick y diferentes a Watson-Crick. El potencial de formación de estructuras en repetidos expandidos cambia drásticamente el resultado de deslizamiento de la cadena de ADN.

La formación de estructuras inusuales en el ADN es más improbable en regiones con repetidos que no se han expandido; por otra parte las interrupciones de estabilización dentro de regiones con repetidos en alelos largos normales hacen que la formación de estructuras inusuales en el ADN sea más difícil. El principal evento que desencadena la formación de estructuras inusuales en el ADN por repeticiones expandibles en el ADN genómico es cuando éste se está desenrollando o incluso en la separación completa de la cadena; el principal proceso celular que implica la separación de las cadenas de ADN es la replicación (Mirkin, 2006).Fig 4.

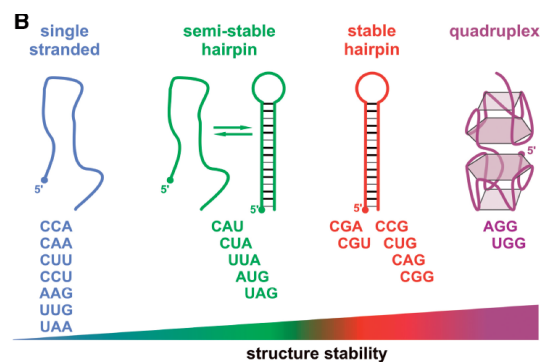


Figura 4: Formación de estructuras secundarias en relación al tipo de secuencia de los repetidos (Krzyzosiak, et al. 2012).

1.3. Enfermedades por expansión de repetidos

Como se mencionó anteriormente, a pesar de que la mayoría de estos elementos se encuentran en regiones no codificantes, se han identificado algunos elementos localizados en regiones 5' y 3' UTRs e intrones de muy diversos genes, así como diversos trinucleótidos o hexanucleótidos comunes en algunas regiones codificantes. Se ha descrito que las expansiones anormales de estos elementos repetidos que sobrepasan un umbral en el rango de normalidad pueden asociarse a múltiples patologías de origen neuromuscular y neurodegenerativo (Castel et al. 2010). En 1991, La Spada *et al.*, y Kremer *et al.*, mostraron que la atrofia muscular espinal y bulbar y el síndrome de X frágil son causadas por expansiones de repeticiones CAG y CGG, respectivamente. Desde entonces, se han encontrado numerosas enfermedades originadas por la expansión anormal de regiones STRs. La revelación de que la repetición de tripletes puede tener un impacto patológicamente significativo fue una sorpresa desde el primer descubrimiento de secuencias simples (ahora conocido generalmente como microsatélites) que habían sido considerados como estructuras esencialmente neutras, útiles como marcadores genéticos pero con ninguna importancia evolutiva más allá de eso (Hancock and Santibáñez, 1998).

La inestabilidad de repetidos es una importante y única forma de mutación que se encuentra ligada con más de 40 desórdenes neurológicos, neurodegenerativos y neuromusculares. Esta mutación es dinámica con productos que continúan mutando dentro de los tejidos y de generación en generación. La longitud de la sección con repeticiones correlaciona con la gravedad de la enfermedad y la edad de inicio, este fenómeno conduce a la anticipación genética que es característica de la mayoría de los trastornos de repetición. La categoría más amplia de los trastornos de repetición está dada por trinucleótidos repetidos; estos trastornos también incluyen tetranucleótidos, pentanucleótidos, minisatélites y megasatélites (Pearson et al. 2005). Tabla 3.

Tabla 3: Resumen de enfermedades hereditarias asociadas a repeticiones inestables.

Enfermedad	Locus	Gen	Proteína	Unidad de repetición	Localización de la repetición	Normal	Patológico	Mecanismo
Distrofia miotónica tipo 1	DM1	DMPK	DMPK	CTG	3'UTR NC	5-37	50-4000	GF ARN
Distrofia miotónica tipo 2	DM2	ZNF9	ZNF9	CCTG	Intrón 1 NC	104-176	75-11000	GF ARN
Ataxia de Friederich	FRDA	X25	Frataxina	GAA	Intrón NC	6-32	200-1700	PF gen
Síndrome de X frágil	FMR1	FMR1	FMR-1	CGG	5'UTR NC	6-53	230-2000	PF gen
Síndrome de X frágil asociado a ataxia tremor	FXTAS	FMR1	FMR-1	CGG	5'UTR NC	6-53	55-200	GF ARN?
Síndrome de X frágil II	FMR2	AFF2	FMR-2	GCC	5'UTR NC	4-39	200-900	PF gen
Ataxia espinocerebelar tipo 8	SCA8	KLHL1AS	Ninguna	CTG	Extremo 3'NC	19-92	100-127	GF ARN
Ataxia espinocerebelar tipo 12	SCA12	PPP2R2B	PPP2R2B	CAG	5'UTR promotor NC	7-45	55-78	PF?
Ataxia espinocerebelar tipo 10	SCA10	ATXN10	Ataxina10	ATTCT	Intrón NC	10-22	800-4500	PF?
Atrofia dentatorubral	DRPLA	DRPLA	Atrofina 1	CAG	Codificante N-t	3-35	49-88	Gfproteína
Huntington	HD	HD	Huntingtina	CAG	Codificante N-t	10-34	40-121	Gfproteína
Huntington tipo II	HDL2	JPH3	Junctofilina	CTG		8-28	44-57	GF ARN?
Atrofia muscular espinobulbar	SBMA	AR	AR	CAG	Codificante N-t	9-36	38-62	Gfproteína
Ataxia espinocerebelar tipo 2	SCA2	ATXN2	Ataxina2	CAG	Codificante N-t	13-33	32-200	Gfproteína
Ataxia espinocerebelar tipo 3	SCA3	ATXN3	Ataxina3	CAG	Codificante C-t	13-44	55-84	Gfproteína
Ataxia espinocerebelar tipo 6	SCA6	CACNA1A	CACNA1A	CAG	Codificante C-t	4-18	21-33	Gfproteína
Ataxia espinocerebelar tipo 7	SCA7	ATXN7	Ataxina7	CAG	Codificante N-t	4-35	37-306	Gfproteína

Tabla 3: AR, receptor de andrógeno; DMPK, *Myotonicdystrophyproteinkinase*; CACNA1A, subunidad α 1A de canal de calcio dependiente de voltaje. PPP2R2B subunidad reguladora específica de cerebro de la fosfatasa PP2A; ZNF9, proteína con dedos de zinc 9; KLHL1AS, Kelch-like 1 antisense; G F, ganancia de función, P F, pérdida de función y N-t, amino terminal; C-t, carboxilo terminal; NC, no codificante. Tabla modificada de Cummings y Zoghbi 2000 (Cumming and Zoghbi 2000).

Estos desórdenes son de gran importancia debido a su evolución clínica degenerativa y discapacitante, y algunos presentan una gran prevalencia en la población, entre los que sobresalen el SXF que es la causa de retraso mental más importante a nivel mundial solo por debajo de trisomía 21 o la Distrofia miotónica tipo 1 (DM1) que es considerada como la distrofia muscular más importante en los adultos a nivel mundial.

1.4. Distrofia miotónica tipo 1 (DM1)

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es una enfermedad autosómica dominante causada por una expansión de trinucleótidos repetidos CTG en la región 3'UTR del gen *DMPK* (Brook et al.1992)(Fig 5).

Fue inicialmente descrita por el médico alemán Hans Steinert en 1909 siendo la primera entidad clínica que se definió por miotonía (prolongación involuntaria en el tiempo de relajación muscular posterior a una contracción) y actualmente es considerada como la distrofia más común en los adultos con una incidencia a nivel mundial de 1/8000 individuos (Harper et al. 1992).

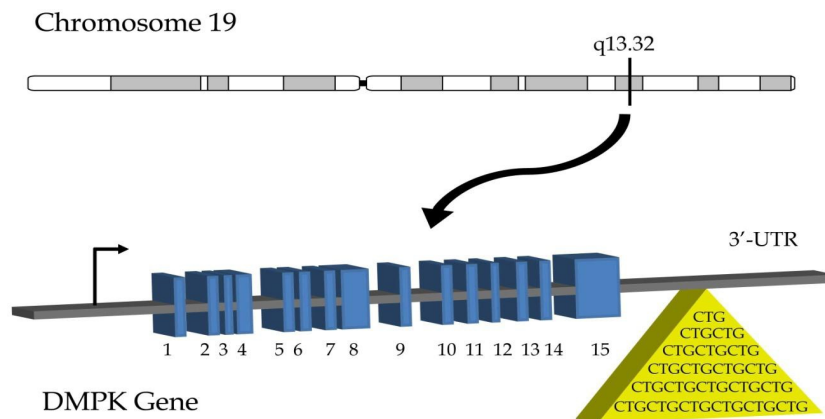


Figura 5: Localización y conformación del gen *DMPK* (Magaña, 2012).

El cuadro clínico característico de ésta enfermedad es multisistémico, inicialmente afecta a los músculos distales de las extremidades y más tarde a la musculatura proximal; además hay participación temprana de los músculos de la cara y el cuello; la debilidad de los músculos extraoculares produce ptosis y limitación de los movimientos extraoculares; la atrofia de músculos maseteros, esternocleidomastoideo y músculo temporal produce un aspecto característico conocido como “facies inexpresivas”. Otros rasgos de la DM1 son la alopecia frontal, cataratas, problemas respiratorios, alteraciones del músculo cardiaco que

produce arritmias auriculares y bloqueo cardiaco, también se presentan anomalías gastrointestinales, resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipogonadismo y atrofia testicular. Los pacientes presentan además, alteraciones del sistema nervioso central y periférico que incluyen hipersomnolencia, hipoventilación central, alteraciones de la personalidad y retraso mental (D'Angelo, 2006).

La DM1 se clasifica en cuatro subtipos aunque generalmente se presenta entre la tercera y cuarta década de vida:

-Leve: los síntomas aparecen en la tercera edad de la vida y se caracteriza por cataratas y posiblemente la presencia de diabetes; la expectativa de vida de estos pacientes es normal.

-Clásica: aparece entre los 12 y 60 años de edad y presenta un cuadro clínico multisistémico el cual incluye daño muscular, miotonía y alopecia frontal, entre otros. Estos pacientes presentan una expectativa de vida promedio de 48 a 55 años de edad.

-Infantil: los síntomas aparecen antes de los doce años e incluyen daño muscular, retraso mental y problemas respiratorios; la expectativa de vida se encuentra alrededor de los 40 años de edad.

-Congénita: se presentan síntomas prenatales o al nacimiento. Durante la gestación el feto presenta complicaciones como hiperhidramnios, movimientos reducidos, hipotonía generalizada, deformidades esqueléticas y problemas respiratorios. En estos casos se presenta una alta tasa de mortalidad y los pacientes que sobreviven desarrollan la forma clásica de la enfermedad antes de los diez años (D' Angelo, 2006; Bird, 2013).

1.4.1. Papel de los repetidos CTG en la patogénesis de la DM1

En esta patología se presenta el fenómeno de anticipación genética, el cual se define como la predisposición de los repetidos de trinucleótidos para aumentar o expandirse durante la transmisión a su descendencia, causando un aumento en la severidad de la enfermedad, y una disminución en la edad de inicio de la misma (McMurray, 2010).

Los alelos del gen DMPK que portan de 5 a 34 repeticiones del trinucleótido CTG se encuentran en individuos sanos y se comportan de una manera estable a través de la herencia ya que tienen una tasa de mutación relativamente baja. Por el contrario, los alelos con un número de repeticiones del triplete CTG mayor de 50 y hasta aproximadamente 4000 están presentes en los pacientes con DM1 y son inestables al heredarse (Magaña, 2009). Tabla 4

Existe un rango de repetidos conocido como “premutación”, el cual incluye la presencia entre 35 y 49 repetidos, los individuos con estas expansiones no presentan manifestaciones clínicas a lo largo de su vida, por lo que no son considerados como pacientes; sin embargo estas expansiones son consideradas altamente inestables de manera germinal, por lo que pueden tener una descendencia con un mayor número de repetidos, alcanzando el grado de mutación o penetrancia completa, debido a que poseen una susceptibilidad aumentada para mutar en una transmisión subsecuente (McMurray, 2010).

Tabla 4: correlación genotipo- fenotipo en la DM1

Fenotipo	Número de repetidos CTG	Edad de inicio
Normal	5-34	Asintomático
Premutación	35-49	Asintomático
Adulto (Clásica)	50-149	30-70 años
Congénita	> 1000	Desde el nacimiento

1.4.2. Patogénesis molecular de la DM1

A lo largo del tiempo, la paradoja de que una mutación fuera de la región codificadora del gen DMPK causara la extensa variedad de síntomas de la DM1 se mantuvo sin resolver, sin embargo después de un extenso número de estudios en pacientes, ratones transgénicos y modelos celulares para la DM1, se han logrado proponer diversos modelos para explicar las bases moleculares de la enfermedad; tales como haploinsuficiencia del gen DMPK, haploinsuficiencia de genes adyacentes al gen DMPK, ganancia de función del ARN mutante (Magaña et al. 2009).

Hasta ahora el mecanismo más aceptado es el de ganancia de función del ARN que postula que el transcrito del alelo mutado es suficiente para producir las características de la enfermedad. En el transcrito los repetidos expandidos CUG pueden originar cadenas complementarias que inducen la formación de estructuras secundarias tallo-asa (*hairpinloops*), de tal forma que no pueden ser exportados del núcleo y son acumulados adquiriendo una nueva función tóxica (Mankodi et al. 2000; Seznec et al. 2001; Wang et al. 2007; Orengo et al. 2008; Lee and Cooper, 2009).

La acumulación del ARN mutante en el núcleo de células musculares o nerviosas provoca su unión aberrante con proteínas que participan en la regulación de procesos nucleares, tales como moduladores del proceso alternativo de transcritos (splicing) y factores de transcripción, lo que modifica finalmente la expresión de determinados genes impidiendo que las proteínas para las cuales codifican llevan a cabo sus funciones. En el secuestro de factores de transcripción se ha identificado a Sp1 (proteína específica 1), STAT1 y STAT 3 (miembros de la familia de proteínas de transducción de señales y de activación de la transcripción) y la subunidad gamma del receptor de ácido retinoico. Por otra parte cuando se asocia a moduladores del splicing se ha encontrado a la proteína de unión a repetidos CUG (CUG-BP1), la proteína de unión a regiones con repetidos CUG-2 (ETR-3), las proteínas similares a muscleblind (MBNL1, MBNL2 y MBNL3), las

proteínas de unión a ARN con actividad cinasa PKR y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPH) (Magaña, 2009).Fig 6.

De manera general, se ha observado que el ARN mutante de la DM1 provoca que la actividad de MBLN disminuya y se produzcan formas de *splicing* comunes del adulto y de manera contraria, que la actividad de la CUG-BP1 se eleve y se originen formas de *splicing* fetales (Figura 6).Durante el desarrollo de la DM1 se han reportado alteración de diversos eventos de procesamiento alternativo de ARNs; de los cuales, siete se presentan tanto en el músculo cardiaco como en el músculo esquelético, afectando los genes TNNT2 (gen de la troponina T cardiaca), IR (gen del receptor de insulina), MTMR1 (gen de la proteína 1 relacionada con la miotubularina), TNNT3 (gen de la troponina T de músculo esquelético), RyR (gen del receptor de rianodina), SERCA2 (gen de la ATPasa 2 Ca^{2+} del retículo endoplásmico/sarcoplasmático) y el gen CIC-1 (Charlet et al. 2002; Kimura et al. 2005; Magaña et al. 2009). Por otra parte, en el cerebro de individuos con DM1 se han identificado alteraciones en el procesamiento de transcritos de los genes de la proteína tau, del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR1) y del precursor de la proteína amiloide (APP). Mientras la afectación del receptor de Insulina (IR) podría explicar la presencia de la resistencia a la insulina (Jiang et al. 2004; Savkur et al. 2001).

Cabe mencionar que hasta la fecha no se conocen todos los genes alterados que pudieran estar involucrados en la patogénesis molecular de la DM1, además de que en los 2 últimos años, se han descrito algunos otros probables mecanismos que pudieran co-adyuvar con el secuestro de factores de transcripción y la alteración del *splicing alternativo*, lo que hace más complejo el entendimiento de la patogénesis molecular de la DM1, como es la alteración de miRNAS's o la presencia de ARNsno canónicos que pudieran estar implicados en los mecanismos que originan la enfermedad (Udd and Krahe, 2012).

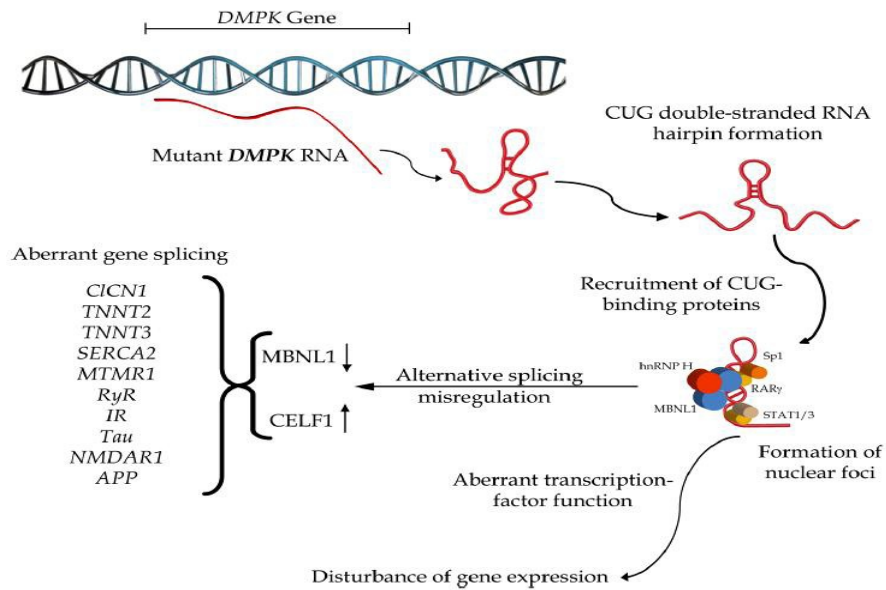


Figura 6: Patogénesis de la Distrofia Miotónica Tipo 1, modelo de ganancia de función del ARN mutante.

1.4.3. Prevalencia de la DM1

La prevalencia global de la DM1 se estima en 1 de cada 8000 individuos (Musova et al. 2009). Esta prevalencia es considerada como alta para una enfermedad huerfana y de origen genético, sin embargo presenta variabilidad en el número de casos encontrados alrededor del mundo, por ejemplo, en la región de Saguenay de la provincia de Quebec, la prevalencia de la distrofia miotónica es de 1 en 475 individuos, debido a la presencia de alrededor de 600 casos en una población de 285.000 habitantes. Mathieu et al., (1990) estimaron que la prevalencia de la distrofia miotónica en la región de Saguenay- Lac -Saint -Jean de la provincia de Quebec es de 30 a 60 veces mayor que la prevalencia en la mayoría de otras regiones del mundo. De Braekeleer et al., (1991) estimaron la prevalencia de la distrofia miotónica en la población franco-canadiense en la región de Saguenay- Lac -Saint -Jean de la provincia de Quebec, es mayor a

1/514 individuos, en contraste con la estimación de 1/25, 000 de la población europea en general (De Braekeleer, 1991).

Por otro lado, en poblaciones de origen africano los casos de DM1 son poco comunes, por lo que se piensa que el origen étnico es muy importante para el desarrollo de esta patología. Actualmente, se considera que la presencia de DM1 es común en países de origen caucásico, y en países asiáticos, excluyendo a la población de Taiwan donde se observó una baja prevalencia de la patología (Tishkoff et al. 1998).

1.5. DM1 en México y el papel de los repetidos CTG en la población sana

En la actualidad no existen registros epidemiológicos de la prevalencia de la DM1 en la población Mexicana, sin embargo en los últimos años se ha registrado un alto número de pacientes con esta patología. Posteriormente a la estandarización del diagnóstico molecular en año 2010-2011, en el Instituto Nacional de Rehabilitación, el cual es considerado como un centro de referencia de enfermedades neuromusculares en el país, se han descrito alrededor de 230 pacientes positivos para DM1 (Márquez, 2013), lo que sugiere que se podría encontrar frecuentemente la enfermedad en nuestra población. Fortaleciendo esta hipótesis, en el año 2011, Magaña et al., sugirieron a través de un estudio de caracterización genotípica de la población mexicana sana, que la prevalencia de la DM1 podría ser comparable a poblaciones caucásicas y asiáticas (Magaña et al. 2011). Este estudio se basó en la identificación de la presencia de alelos largos normales (alelos mayores a 18 repetidos CTG) en la población Mexicana. Como se mencionó anteriormente los alelos largos normales con más de 18 repeticiones CTG no son causa de la patología, pero se consideran como susceptibles a un mayor incremento y posible inestabilidad genética, que con el paso de las generaciones pudiesen evolucionar y aumentar a un rango de premutación. Existe una notoria relación entre la presencia de alelos largos normales con altas

prevalencias de la DM1, como se ha observado en poblaciones Caucásicas y en poblaciones asiáticas (Japón y Corea del Sur) (Deka et al. 1996; Tishkoff et al. 1998), en contraparte la baja frecuencia de estos alelos se ha asociado a bajas prevalencias de la patología, como lo reportado en poblaciones de origen africano (Africo-americanas y Africo-negroides) y en la población Taiwanesa (Acton et al. 2007; Goldman et al. 1994; Hsiao et al. 2003). Esta correlación también ha sido observada en algunas otras patologías producidas por expansiones de repetidos, como Corea de Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo 2 y 3, entre otras (Squitieri et al. 1994; Takano et al. 1998; Laffita-Mesa et al. 2014). Por lo que la prevalencia de estos alelos en una población nos puede dar una idea de la prevalencia de la enfermedad (Tishkoff et al. 1998).

En el estudio realizado por Magaña JJ. et al, se comparó la distribución alélica de la población mexicana con lo reportado para seis diferentes poblaciones, con lo que se determinó que la frecuencia de alelos por encima de 18 repetidos CTG es mayor en la población mexicana que en las poblaciones de Coreanos, taiwanés, afro-americanos y afro- negroide, lo que sugiere la existencia de un número elevado de casos de DM1 en nuestra población (Magaña et al. 2011).

Además en dicho estudio se aprecia un análisis poblacional comparativo conforme al comportamiento de nuestra población con el de otras poblaciones reportadas en la literatura y se observa la presencia de una distribución alélica bimodal, con picos en 5 y 11 a 13 repetidos CTG, similar entre las diferentes poblaciones analizadas, sin embargo, hay algunas diferencias importantes que distinguen a nuestra población (Fig. 7). La población mexicana muestra la más baja frecuencia de los alelos con 5 y 12 repetidos CTG, siendo el alelo de 5 repeticiones prácticamente el alelo más común a lo largo del mundo. Por el contrario, en nuestra población se reportó la frecuencia más alta para los alelos de 11 y 13 repetidos, en comparación con el resto de las poblaciones, siendo el alelo de 13 repeticiones CTG el más común, con una frecuencia de 38,8% (Figura 7). Esta distribución particular podría atribuirse al background genético de nuestra población, ya que somos una mezcla de ancestros europeos, nativo americanos y

africanos. Este estudio también reveló que las altas frecuencias de los alelos de 11 y 13 repetidos fueron comunes en una muestra de población mixteca (grupo étnico de México), por lo que probablemente la distribución de la población Mestizo-Mexicana presenta una alta influencia de la población nativo-americana, por esta razón es importante conocer el comportamiento de la frecuencias de los repetidos CTG en el gen *DMPK* en poblaciones de diferentes grupos étnicos de nuestra población e identificar la presencia de los alelos largos normales, con el objetivo de determinar si existe también la influencia de la población nativo-americana para la alta prevalencia de la patología en nuestra población (Magaña et al. 2011).

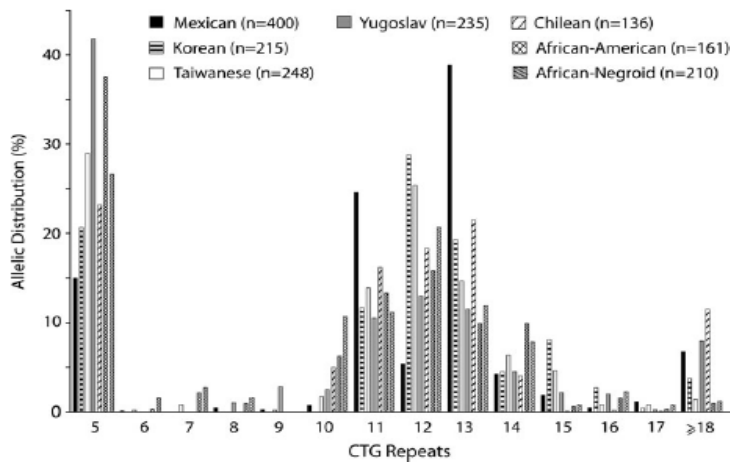


Figura 7: Distribución de repetidos CTG del gen DMPK en diferentes poblaciones.

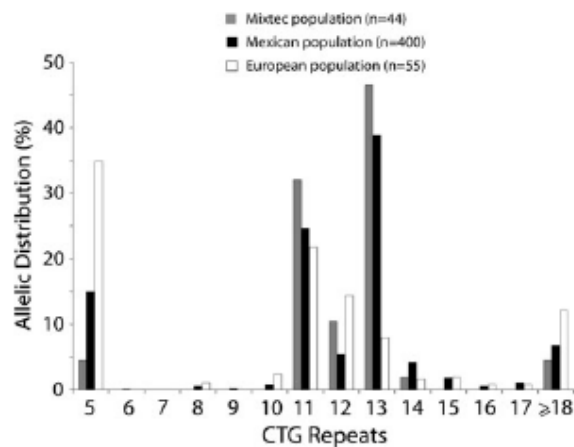


Figura 8: Distribución de los repetidos CTG del gen DMPK en personas saludables de tres diferentes poblaciones humanas: Mexicana, mixteca y europea.

2. Justificación

La Distrofia Miotónica tipo 1 es considerada como la distrofia muscular más frecuente en adultos a nivel mundial. Estudios recientes realizados por Magaña y colaboradores, sugieren que la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país puede ser semejante a lo reportado en poblaciones caucásicas o japonesas (poblaciones con mayor prevalencia de la enfermedad), lo que es de gran relevancia ya que es una enfermedad altamente discapacitante, lo que repercute directamente en el Sector Salud de nuestro país, así como en la calidad de vida y economía familiar de los pacientes y sus familiares. Por lo tanto, es indispensable conocer más del comportamiento de esta patología en nuestro medio. De manera peculiar se sabe que la frecuencia alélica del triplete repetido CTG del gen *DMPK* (mutación que origina la DM1) en nuestra población parece ser muy diferente a lo reportado en otras poblaciones, por lo que es fundamental describir las frecuencias alélicas en diferentes regiones de nuestro país y determinar si ese comportamiento *sui géneris*, presenta una influencia de nuestras poblaciones nativo-americanas. Esto es de relevancia, ya que se sabe que la presencia de la patología varía dependiendo del grupo étnico y región geográfica, por lo que conocer si existe alguna relación de este marcador con el desarrollo de la patología de acuerdo con nuestra constitución poblacional de origen mestizo puede aportar datos que reflejen la aparición de más casos, ya que hasta la fecha es una patología sub-diagnosticada. Por esta razón, y al no existir datos epidemiológicos se puede sugerir la importancia de la magnitud del problema. Un mayor conocimiento del tracto CTG y la presencia de alelos de riesgo, podría fortalecer el estudio de esta patología y reflejar su importancia en nuestro país.

3. Planteamiento del problema

En el presente trabajo se analizará el número de repetidos CTG del gen *DMPK* en diversas poblaciones mestizo-mexicanas de diferentes regiones del país, para determinar si existen variaciones y compararlo con lo reportado en la población general Mexicana. Posteriormente se plantea, analizar el tracto de repetidos CTG del gen *DMPK* en diversas poblaciones de origen étnico (nativo-americanas) de nuestro país, evaluar su comportamiento genético y ver su influencia en los grupos mestizos. La determinación de la presencia de alelos largos normales en poblaciones mestizas y nativo-americanas nos puede reflejar de manera indirecta el grado de presencia de la patología en México. Además se plantea determinar la constitución de los repetidos para evaluar la posible presencia de factores en *cis* (interrupciones de tripletes repetidos), que pudieran explicar si existe algún efecto relacionado con la inestabilidad de este tipo de repetido. Por lo tanto la pregunta de investigación es ¿Existen alelos largos normales en la población nativo-americana que refleje su alta frecuencia en la población mestizo mexicana; y la constitución de éstos que papel pudiera jugar en la inestabilidad para una expansión en consecuentes generaciones?

4. Objetivo General

Determinar el número de repetidos CTG del gen *DMPK* en población mexicana (grupos mestizo-mexicanos y grupos de origen étnico); así como el papel de los alelos largos normales con respecto a la presencia de distrofia miotónica tipo 1 en nuestro país.

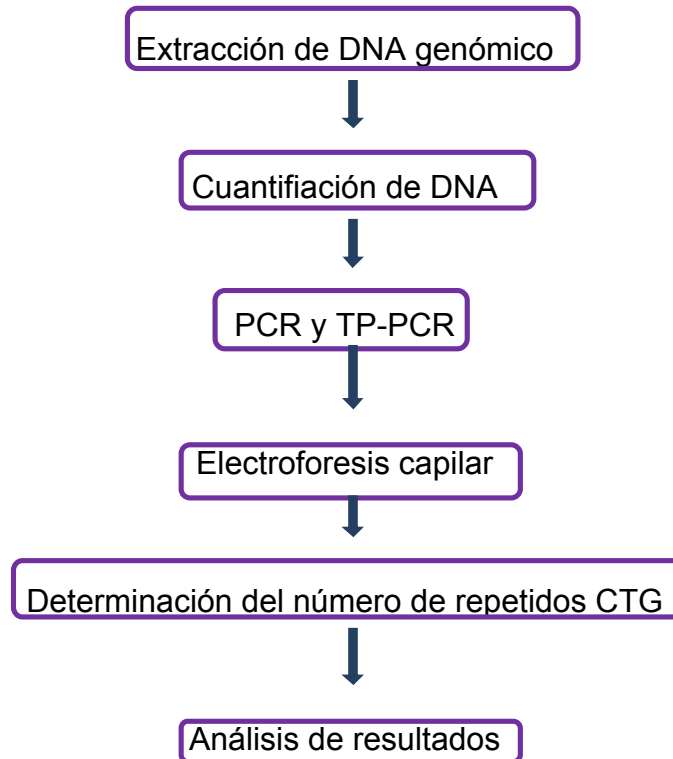
4.1. Objetivos particulares

- Determinar el número de repetidos CTG de una muestra de la población general mestizo mexicana sana de tres regiones del país.
- Determinar el número de repetidos CTG de los alelos normales en familiares y pacientes con DM1.
- Genotipificar los tripletes repetidos CTG en 10 grupos étnicos nativo-americanos representativos de diversas regiones de México.
- Comparar las distribuciones alélicas y genotípicas de los diversos grupos de estudio.
- Determinar la frecuencia de los alelos largos normales en la población Mexicana, tanto en grupos mestizos mexicanos como en grupos étnicos.
- Determinar el comportamiento genético del tracto de repetidos CTG en las diversas poblaciones a través de parámetros de genética de poblaciones (EHW, H_e , Diversidad genética) y compararlas entre sí a través de un análisis de componentes principales.
- Identificar la constitución de la región de repetidos CTG a través de secuenciación automática en alelos normales y alelos largos normales y su relación con la inestabilidad del microsatélite.

5. Metodología

5.1. Estrategia experimental

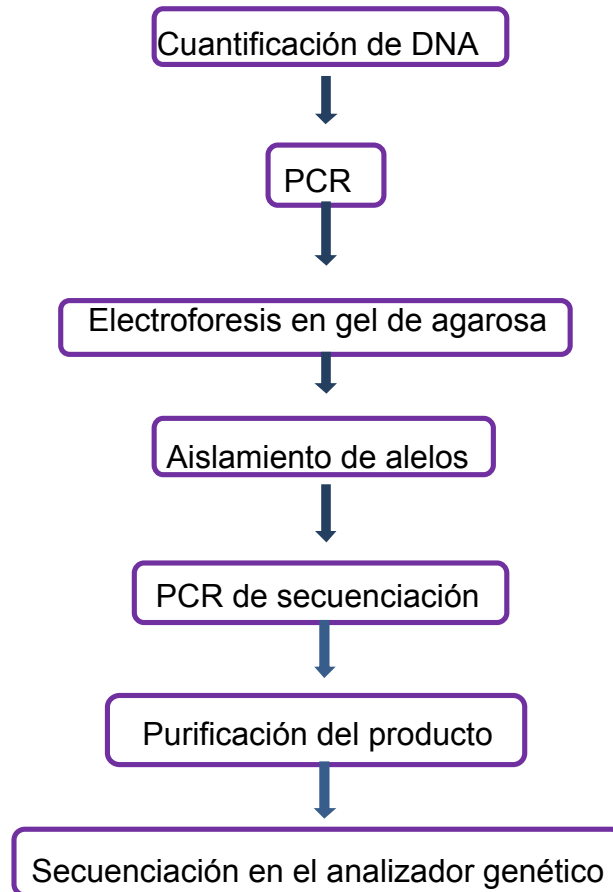
Fase 1



Fase 2

Se realizó la selección de manera azarosa de individuos con alelos largos normales (≥ 18 repetidos CTG) e individuos con alelos normales para realizar la secuenciación.

Secuenciación



5.2. Sujetos de estudio

5.2.1. Población General Mestizo Mexicana

Criterios de Inclusión: Se incluyeron muestras obtenidas de 406 voluntarios saludables (hombres y mujeres) no relacionados entre sí, los cuales contaban con una historia familiar de por lo menos tres generaciones establecidas en México, específicamente en la región geográfica de origen (edades de 18 a 65 años; 34.68 +/- 10). Los grupos de población general se agruparon de acuerdo a su estado de origen:

- a) 258 individuos de la Ciudad de México
- b) 113 individuos de Torreón, Coahuila
- c) 34 individuos de Morelia, Michoacán

Criterios de exclusión: Se excluyeron aquellos casos en los cuales no fue posible realizar el 100 % de los procesos moleculares requeridos en la investigación. Así mismo se eliminaron individuos con expansiones anormales del triplete CTG en el gen *DMPK* a través del estudio molecular para DM1.

5.2.2. Familiares sanos de pacientes con DM1

Criterios de Inclusión: Familiares de primer y segundo grado sanos en riesgo de heredar la mutación, identificados por árbol genealógico y que sean asintomáticos para DM1.

Criterios de exclusión: Todos aquellos individuos con otro tipo de distrofias y que no sean familiares directos de algún afectado o que no estén en riesgo de heredar la mutación por ejemplo por ser hijos adoptivos.

Criterios de eliminación: Individuos positivos para la mutación (asintomático) o pre-mutación de la DM1, y todos aquellos casos en los cuales no fue posible realizar el 100% de los procesos requeridos en la investigación.

5.2.3. Grupos étnicos de la población mexicana (nativo-americanos)

Criterios de Inclusión: Se seleccionaron individuos voluntarios de ambos sexos no relacionados entre sí establecidos en distintas áreas de México:

- * 78 Nahuas-Xochimilco, de la delegación Xochimilco en la Ciudad de México.
- * 31 Nahuas del Estado de Morelos.

- * 90 Mayas, del Estado de Yucatán.
- * 46 Zapotecas del Estado de Oaxaca.
- * 45 Mixes del Estado de Oaxaca.
- * 85 Pames del Estado de San Luis Potosí.
- * 74 Tarahumaras del Estado de Chihuahua.
- * 32 Yaquis del Estado de Sonora.
- * 34 Popolucas del Estado de Veracruz.
- * 46 Totonacas del Estado de Veracruz.

Criterios de exclusión: Todos aquellos individuos con tipo sanguíneo diferente a RH 0+ y con historia familiar con antecedentes familiares externos a la región de origen (se verificó el origen de sus apellidos y su estado antropológico de las comunidades analizadas).

Criterios de exclusión: Se excluyeron aquellos casos en los cuales no fue posible realizar el 100 % de los procesos moleculares requeridos en la investigación. También no se consideró a individuos con expansiones anormales del triplete CTG en el gen *DMPK* a través del estudio molecular para DM1.

Los individuos participantes en este estudio (pacientes con DM1, familiares de pacientes, población general y población de grupos nativo-americanos), firmaron una carta de consentimiento informado para la realización de este trabajo (Anexo 1).

5.3. Extracción de DNA genómico

El DNA se extrajo a partir de 5mL de sangre periférica de cada individuo de estudio. La sangre se recolectó en un tubo Vacutainer con EDTA como anticoagulante, se realizó la separación de leucocitos, para el aislamiento del

material genético empleando el kit de purificación GENTRA PUREGENE (Qiagen, Duesseldorf, Germany), como se describe a continuación:

Las muestras se centrifugaron a 400x g durante 10 minutos, se aisló la fase de los leucocitos (localizada entre los eritrocitos y el plasma). Se adicionaron 750µL de solución lisis de células rojas RBC (*Red Blood Cells*) y se homogenizó con agitación, posteriormente se centrifugó a 1,400 x g durante 30 segundos y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 300-400µl de solución de lisis de células blancas CLS (*Cell Lysis Solution*) con agitación en vórtex. Se colocó en baño María a 37°C por el tiempo necesario para homogenizar y se adicionó 150µl de *Puregene-Proteinase K*. La mezcla fue centrifugada a 13,000 x g durante 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se precipitó el DNA con 700µL de isopropanol a una temperatura de 4° C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 x g durante 4 minutos, seguido de la decantación del isopropanol. Se realizaron lavados con 700µl de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 x g durante 4 minutos, repitiendo este paso al menos 2 veces. Se decantó y dejó secar el botón de DNA a temperatura ambiente y finalmente se hidrató el DNA con 120 µL de agua inyectable.

5.4. Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA se realizó por espectrofotometría utilizando el sistema NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, USA). La pureza del DNA se determinó por el cociente de las absorbancias de 260nm/280nm. Según los datos de concentración obtenidos, se realizaron las diluciones de las muestras a una concentración de 15ng/µL.

5.5. Determinación del número de repetidos CTG en el gen DMPK

5.5.1. Reacción en cadena la polimerasa (PCR)

Los repetidos CTG fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); empleando un par de oligonucleótidos los cuales

flanquean la región de repetidos CTG como se observa en la figura 9. La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente: P1 5'-AGAAAGAAATGGTCTGTGATCCC-3'; y P2 5'-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG-3'; el oligonucleótido P1 se marcó con el fluoróforo “Hexaclorofluoresceina” (HEX) para poder llevar a cabo posteriormente su identificación mediante el análisis de electroforesis capilar.

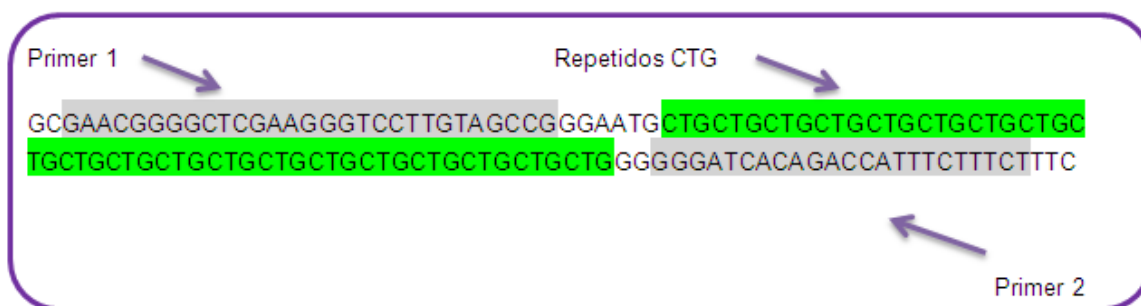


Figura 9: Fragmento de la secuencia del gen *DMPK* humano en el cromosoma 19q13.3. En color gris se observa la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. En color verde se observa la secuencia STR analizada.

La mezcla de reacción para la PCR se realizó como se muestra a continuación:

Componente	Concentración	Volumen
Buffer	10X (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.6 µL
MgCl ₂	2µM (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.18µL
dNTPs	200µM (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.25µL
Taqpolimera	0.5U (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.08µL
OligonucleotidoForward	0.38Mm (Invitrogen TM. Life Technologies)	0.23µL
Oligonucleotido Reverse	0.38µM (Invitrogen TM. Life Technologies)	0.23µL
DNA	15ng	1 µL
Betaína	31% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Ger)	1.86µL
H ₂ O	-----	c.b.p. 6 µL

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 6 μ L, bajo las siguientes condiciones:

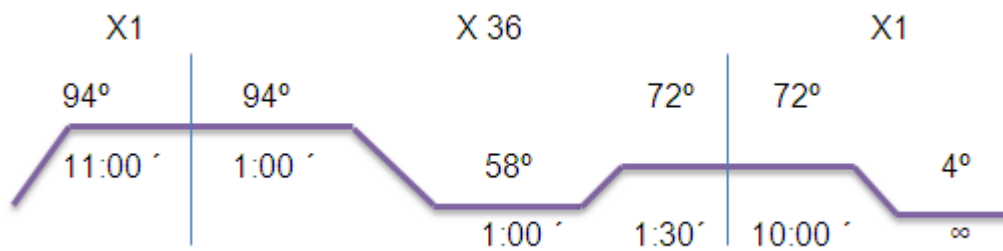


Figura 10: La reacción de PCR constó de 36 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 94°C por 60s; hibridación a 58°C por 60s y la polimerización a 72°C por 90s.

5.5.2. Electroforesis en gel de agarosa

El DNA obtenido de la sangre fue corrido en un gel de agarosa al 0.8%. Se estandarizaron las condiciones de PCR eliminando cualquier banda inespecífica, de la misma forma se establecieron las cantidades óptimas para la reacción de PCR, disminuyendo los oligonucleótidos para evitar que estos pudiesen afectar las lecturas durante la técnica de EC, para ello al término de las reacciones de PCR, los tubos se guardaron a 4°C, a cada tubo se le agregaron 2.5 μ l de buffer de carga 6X (ficoll 400, azul de bromofenol en TE pH 8.0) y posteriormente se analizaron los productos de reacción en geles de agarosa al 3%. Se realizaron las electroforesis a 100 V en buffer TBE 0.5 X (tris-borato 0.045M, EDTA 0.001M) hasta que el colorante alcanzó el final del gel. Cada gel se corrió en presencia de un marcador de peso molecular. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a concentración final de 0.5 μ g/ml y posteriormente se fotografiaron.

Las amplificaciones de los fragmentos de DNA, se realizaron en un termociclador 2400 (Applied Biosystems™). El producto de amplificación se encuentra localizado entre 100pb y 200pb (fig. 11), lo cual corresponde al peso molecular reportado por *Tsukamoto et. al. 2000*.

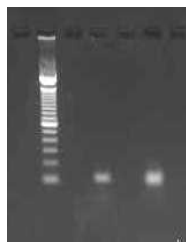


Figura 11:Amplificación de DNA en Gel de Agarosa al 3%. En el primer carril se observa el Marcador de peso molecular (100 pbLadder Plus), el segundo y tercer carril pertenecen a la banda específica para los repetidos CTG en el gen DMPK.

5.6. Análisis mediante electroforesis capilar

La EC es una herramienta alternativa en el análisis de fragmentos de DNA con pesos moleculares parecidos. Separa cada alelo de acuerdo a sus pesos moleculares a través de un capilar de un diámetro de 50 μm , corridos simultáneamente con un marcador de peso molecular, el cual permite determinar el tamaño en pares de bases de los fragmentos de PCR en forma más precisa que en una electroforesis en gel. La detección del DNA migrado se obtiene a través de una ventana por medio de fluorescencia inducida por laser (LIF). Es un sistema automatizado que disminuye el tiempo de detección (24 min), teniendo una gran resolución, así como una fácil manipulación en el análisis de resultados, además de realizar el análisis con una pequeña cantidad del producto de PCR. En cada corrida el equipo de EC, realiza una curva patrón con los puntos del marcador TAMRA 500 y cuya $\chi^2 < 1$. Por medio de esta curva se obtienen el (los) peso(s) molecular(es) de cada alelo(s).

Cada alícuota del producto de PCR se mezcló con una solución 74:1 de Formamida (desionizada) y el estándar de peso molecular (TAMRA TM 500 N° 401733; PE Biosystems), se desnaturalizó elevando la temperatura a 95°C por 5 minutos y posteriormente disminuyendo la temperatura a 4°C. Las muestras se

analizaron por medio de electroforesis capilar en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), utilizando una temperatura constante (60°C), un voltaje de 15 kV y un tiempo de corrida de 24 minutos, empleando el polímero POP-4TM (Nº. Cat. 402838; PE Biosystems). Para el análisis de los alelos y la genotipificación se empleó el programa GeneScanV.2.01.

5.7. TP-PCR para individuos heterocigotos

Debido al límite de detección de la técnica de PCR acoplada al análisis de fragmentos por electroforesis capilar, no es posible determinar alelos con expansiones mayores a 100 repetidos CTG. Por lo tanto es necesario utilizar una reacción de PCR modificada conocida como “triplet primer PCR” (TP-PCR), para evitar una falsa asignación de un homocigoto sano. La técnica de TP-PCR utiliza una triada de primers: un primer que flanquea un locus específico y marcado con un fluoróforo (P1); un primer quimérico con la unidad de repetición en el extremo 3' y una cola con secuencia de ADN no específica para el genoma humano en el extremo 5' (P2); y finalmente un primer que reconoce la secuencia quimérica del primer P2 (P3). En los primeros ciclos de amplificación, el primer con las repeticiones (P2) hibrida en múltiples sitios a lo largo de la región de repetición, generando varios productos de PCR diferentes por una repetición (Fig 12).

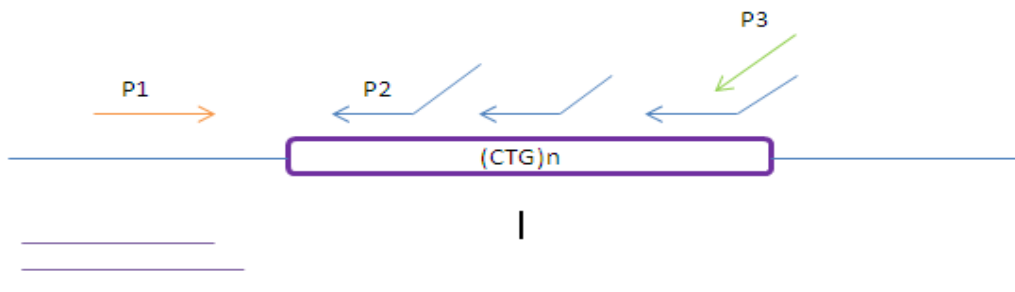


Figura 12: Representación de la técnica TP.PCR, en donde se muestran los sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados.

Basado en la TP-PCR para el análisis de los repetidos CTG del gen DMPK, se utilizó el oligonucleótido sentido marcado fluorescentemente (previamente descrito como P1); el primer P3R 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3' y un oligonucleótido quimérico P2 CTG 5'-TACGCATCCGAGTTTGAGACGT GCTGCTGCTGCTGCT-3' conforme a lo reportado por Magaña y colaboradores.

Los componentes de la mezcla de reacción para la PCR se muestran a continuación:

Componente	Concentración	Volumen
Buffer	10X (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	1µL
MgCl ₂	2µM (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.3 µL
dNTPs	200µM (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.42µL
Taq polimersa	0.5U (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	0.2µL
Oligonucleotido Forwad P1	0.38Mm	0.4µL
Oligonucleotido Reverse P3	0.38µM	0.4µL
Oligonucleótido Quimérico P4 CTG	0.38µM	0.4µL
DNA	30ng	2µL
Betaína	31% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Ger)	3.1µL

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 6 µL bajo las siguientes condiciones:

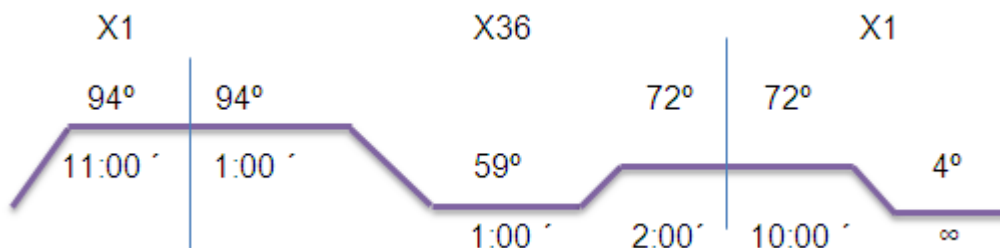


Figura 13: La reacción de PCR constó de 36 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 94°C por 60s, la hibridación a 59°C por 60s y la polimerización a 72°C por 120s, así como un ciclo de desnaturalización final por 12 min.

Estos productos de TP-PCR fueron analizados a través de electroforesis capilar, en las mismas condiciones descritas anteriormente en la sección 3.6.

5.8. Determinación de la conformación de los repetidos CTG a través de secuenciación

Se seleccionaron azarosamente individuos de las poblaciones nativo-americanas con alelos normales con un número de repetidos CTG determinado anteriormente por medio de electroforesis capilar, para realizar la técnica de secuenciación, teniendo 2 alelos de 11 y 2 alelos de 13 repetidos CTG; y se seleccionaron individuos con alelos largos normales, teniendo así: 1 alelo con 26 repetidos CTG, 1 con 20 repetidos CTG, 1 alelo con 19 repetidos CTG, 1 alelo con 22 repetidos CTG y por último 1 alelo con 21 repetidos CTG.

El número de repetidos CTG presentes en cada alelo se verificó mediante secuenciación de ADN. Alelos homocigotos fueron secuenciados con el kit de secuenciación de ciclo BigDyeTerminator (AppliedBiosystems), y se analizaron en el ABI PRISM 310 GeneticAnalyzer (PE AppliedBiosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Alelos heterocigotos fueron analizados mediante amplificación por PCR, como se describe anteriormente y, a continuación, los productos de la PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se secuenciaron en el Analizador Genético.

5.9. Análisis estadístico y poblacional

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas a través del programa STATA 8.0 software package (Statcorporation, CollegeStation, TX, USA). Para determinar las diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los diferentes grupos poblacionales, se realizó la prueba de chi cuadrada (χ^2) mediante una tabla de 2 x 2. El análisis de genética poblacional se realizó

mediante los programas: *Genétix*(University of Montpellier, Francia) y PopGen 32 (University of Alberta & Center for International Forestry Research, Canadá) obteniendo a través de ellos las frecuencias alélicas y genotípicas, el índice de *Shannon* (SI), la heterocigocidad (H), así como determinar si nuestras poblaciones de estudio se encontraban en equilibrio con relación a la ley de *Hardy-Weinberg*(HW) por medio de Weir and Cockerham *F_{is}* test. Los niveles de significancia fueron determinados empíricamente mediante un análisis de permutaciones (10000 permutaciones) empleando para ello el programa *Genétix*.

La relación genética entre las poblaciones estudiadas se analizaron con base en las distancias génicas (valores de *R_{ST}* y *F_{ST}* usando 5000 permutaciones) con el programa Arlequin v.3.5 y visualizadas con el plot de escalas multidimensionales (MDS) con el programa SPSSv.11.

6. Resultados

6.1. Genotipificación de los repetidos CTG del gen *DMPK* en la población mestizo-Mexicana: Poblaciones de tres regiones del país

Inicialmente en el presente trabajo, se realizó la genotipificación de los repetidos CTG del gen *DMPK* en tres poblaciones originarias de diferentes regiones del país (Norte, Centro y Sur-oeste), con la finalidad de determinar si se presentan diferencias en la distribución alélica dependiendo la región geográfica de México. Se determinó el número de repetidos CTG en 113 individuos de la población general originaria de la Ciudad de Torreón, 258 individuos de la Ciudad de México y 34 de la Ciudad de Morelia. La genotipificación se realizó a través de electroforesis capilar; en la Figura 14 se aprecian algunos de los electroferogramas obtenidos, el patrón electroforético ejemplifica los resultados tanto para un individuo homocigoto (Figura 14 A) , como para un individuo heterocigoto (Figura 14 B).

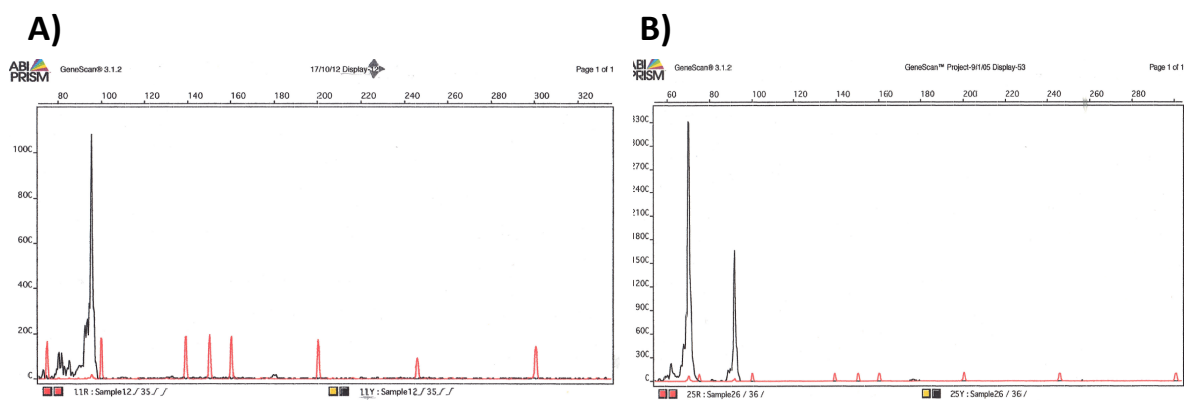


Figura 14: Electroferogramas para la determinación de repetidos CTG en el gen *DMPK*. En el eje de las abscisas se encuentra graficado el número de pares de bases con lo que se puede determinar número exacto de repetidos CTG de cada individuo utilizando un marcador de peso molecular, el cual se aprecia en color rojo. En el eje de las ordenadas se encuentran graficadas unidades de fluorescencia la cual está dada por el primer marcado con el fluoróforo. A) Se aprecia un individuo homocigoto para el alelo de 13 repetidos CTG. B) Se aprecia un individuo heterocigoto con alelos de 5 y 13 repetidos CTG respectivamente.

En la Tabla 5 se observan los alelos encontrados para cada población y su frecuencia obtenida, de manera paralela en la última columna se realizó un comparativo con los resultados obtenidos en la población mexicana en general, conforme a los resultados reportados recientemente por Magaña y colaboradores (Magaña et al. 2011).

En cada una de las poblaciones analizadas se observa una distribución bimodal, lo que significa que se presentan 2 grupos de alelos de mayor frecuencia, el primero en 5 repetidos CTG y el segundo contempla alelos entre 11 y 13 repetidos. Se puede observar que los alelos más comunes para todas las poblaciones analizadas son el de 13 repetidos, seguido del de 11 repetidos. Lo que nos sugiere que la distribución alélica en las tres regiones del país presenta un comportamiento similar. De manera peculiar se observó que el alelo con 5 repetidos es más común en la población del DF comparada con las poblaciones de provincia, por el contrario el alelo de 11 repetidos muestra una menor frecuencia en el D.F., sin embargo no se observa una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 5: Frecuencia alélica en la población General mestizo Mexicana

Repetidos CTG (Alelos)	D.F. (n=516) (%)	Torreón (n=226) (%)	Morelia (n=68) (%)	P. General Mex ^{ref} (%)
5	18.02	8.84	7.35	15.000
6	0	0	0	0.125
8	0.39	0.44	1.47	0.500
9	0	0.88	0	0.250
10	0.78	0.88	0	0.750
11	22.28	28.32	25	24.620
12	5.81	6.64	1.47	5.370
13	36.63	40.7	41.17	38.875
14	5.38	2.65	2.94	4.250
15	0.97	3.54	4.41	1.875
16	0.58	0.44	1.47	0.500
17	0.58	1.33	0	1.125
18	0.2	0.44	4.41	0.375
19	0.97	0.44	0	0.750
20	0.2	1.33	0	0.875
21	1.94	0.44	0	1.500
22	1.16	0.88	2.94	1.000
23	0.39	0.44	0	0.500
24	0.19	0	1.47	0.125
25	1.16	0.44	1.47	0.875
27	0.39	0	0	0.250
28	0.19	0	2.94	0.125
29	0.19	0	1.47	0.125
31	0	0.44	0	0.125
34	0.19	0.44	0	0.125

Como era de esperarse el genotipo más común fue 11/13 en las tres poblaciones (16.34% (DF), 23.89% (Torreón), 19.35% (Morelia)), seguido de 11/11 (15.11% (DF), 20.35% (Torreón), 16.13% (Morelia)).

Con respecto a los alelos largos normales (>18 repetidos) se observa que todas las poblaciones presentan una alta frecuencia de estos alelos, siendo la población de Morelia la que presenta la mayor frecuencia (10.29%), seguida de la población del Distrito Federal (6.97%), y por último la población de Torreón (4.85%). Lo que sugiere que la población del norte presentan una menor frecuencia de alelos largos normales. Sin embargo, al considerar a los 3 grupos geográficos como parte de la población general Mexicana se sigue observando una alta frecuencia de este tipo de alelos (6.25%).

Es importante mencionar que los repetidos CTG son altamente polimórficos, ya que conjuntando las poblaciones en estudio se identificaron alrededor de 25 alelos diferentes, sin embargo muchos de estos se presentan en una baja frecuencia (<2.0%).

6.2. Frecuencia de los repetidos CTG normales en familiares de pacientes con DM1

Por otro lado, de manera paralela se determinó la frecuencia de los repetidos CTG en 230 individuos sanos familiares de pacientes diagnosticados molecularmente con DM1. A partir del análisis de los 460 cromosomas se identificaron 22 alelos diferentes que van de 5 a 31 repetidos CTG, siendo el más frecuente el de 13 repetidos con una frecuencia del 42.17%, en segundo lugar el de 11 repetidos con una frecuencia del 20.43% y en tercer lugar el de 5 repetidos con 16.3% (Figura 15). Como se muestra en la Figura 15, la frecuencia alélica presenta una distribución bimodal. Estas frecuencias son comparables a lo observado en las poblaciones sanas mestizo mexicanas, ya que el alelo de mayor frecuencia es el alelo de 13 repetidos CTG con una frecuencia de 38.87%, seguido

del de 11 repetidos CTG con una frecuencia de 24.62% y el de 5 repetidos CTG con una frecuencia de 16.3% presentando también una distribución de tipo bimodal. De manera peculiar, se observa que la frecuencia de los alelos largos normales es alta (5.0%), a pesar de que estos individuos se encuentran relacionados con pacientes que presentan la patología de DM1, lo que fortalece la idea de una alta frecuencia de alelos largos normales en nuestra población Mexicana.

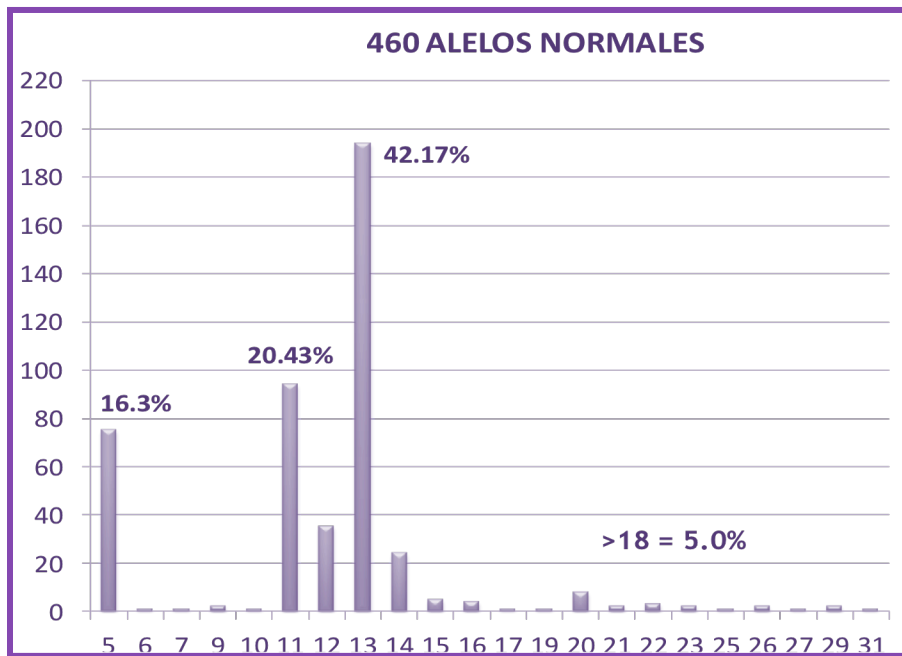


Figura 15: Distribución alélica de los repetidos CTG en el rango normal (Márquez, 2013).

6.3. Distribución de los repetidos CTG en diversos grupos étnicos de México: análisis de poblaciones Nativo-Americanas

El comportamiento suigeneris de la población Mexicana con respecto a otras poblaciones (Magaña et al. 2011) nos llevó a la determinación del comportamiento genético de grupos nativo americanos de nuestro país. Se analizaron 10 grupos étnicos, los cuales fueron clasificados de acuerdo a su localización geográfica del país:

- A. Región Sur-Este: Mayas de Yucatán, Totonacas de Veracruz y Popolucas de Veracruz.
- B. Region Sur: Zapotecas de Oaxaca y Mixes de Oaxaca.
- C. Region centro: Nahuas de Xochimilco y Nahuas de Morelos.
- D. Región Norte: Pames de San Luis Potosí, Tarahumaras de Chihuahua y Yaquis de Sonora.

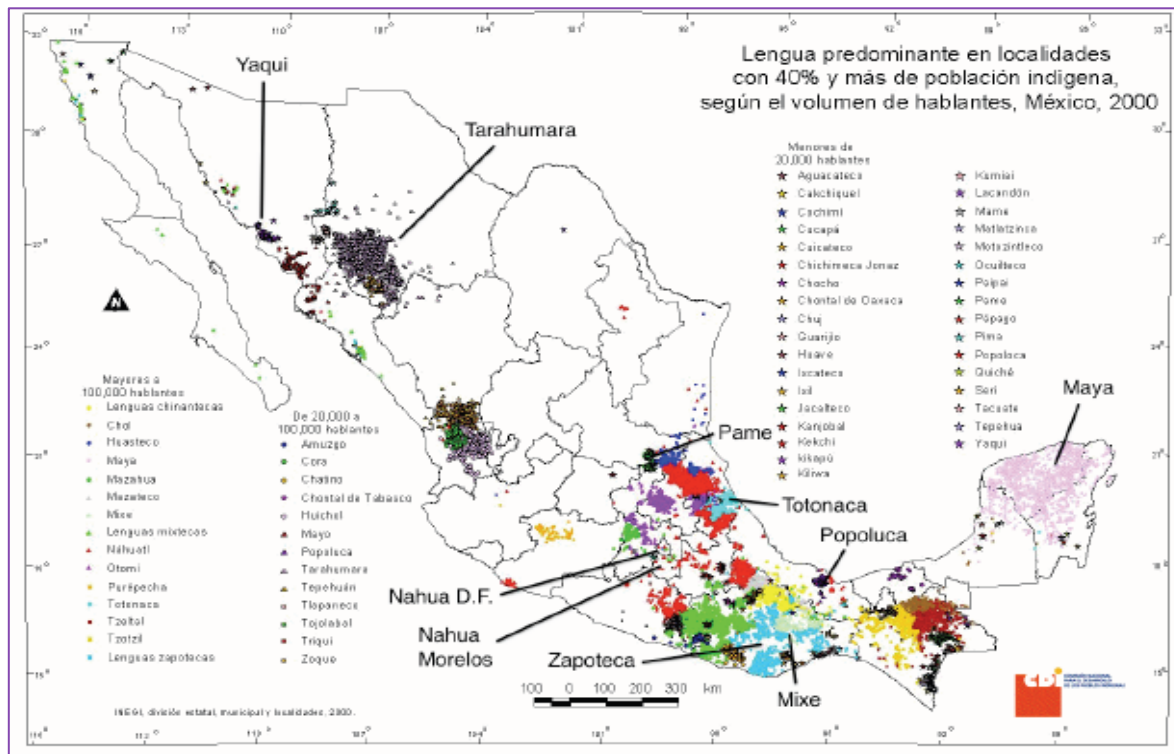


Figura 16: Mapa lingüístico que muestra la localización de los grupos Nativos Americanos analizados (CDI).

La región geográfica coincide en pocos aspectos con las bases lingüísticas de cada población, en la región sureste el grupo Maya pertenece a la familia lingüística Macro-Maya, los Totonacas a la familia Toto-tepehua y los Popolucas a la familia Mixe-zoque. En la región Sur el grupo Zapoteco pertenece a la familia lingüística Oto-mangue y el Mixe a la Mixe-zoque. Mientras que los grupos Nahuas, pertenecen a la familia lingüística Yuto-nahua. Por último de los grupos que pertenecen a la región Norte, los Tarahumaras y los Yaquis pertenecen a la familia

lingüística Yuto-nahua mientras que los Pames a la Oto-mangue (INALI, 2010). Esto nos habla de una amplia diversidad de los grupos étnicos en nuestro país.

A continuación analizamos a cada grupo étnico de acuerdo a su región geográfica.

6.3.1. Región Sur-Este

Se determinó el número de repetidos CTG en un total de 170 individuos de grupos nativos americanos de la zona sur de la República Mexicana: 90 Mayas de Yucatán, 46 Totonacas de Veracruz y 34 Popolucas de Veracruz. En la figura 17, se observa que los alelos más comunes en los tres grupos fueron el de 13 repetidos (51.93%) seguido del de 11 y 5 repetidos (23.08% y 10.72% respectivamente). A pesar de las similitudes encontradas, la población popoluca presenta una muy baja frecuencia del alelo de 5 repetidos CTG.

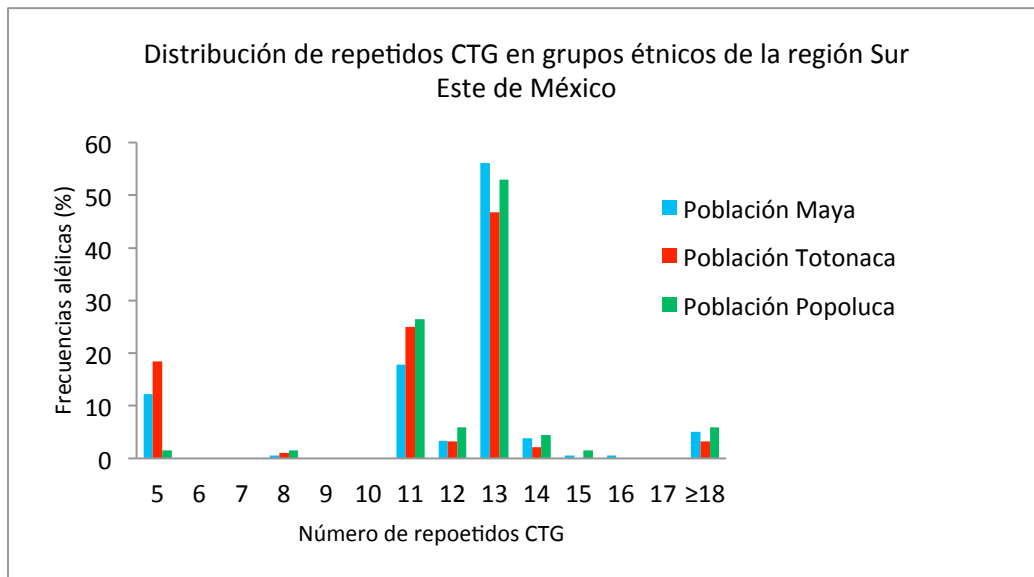


Figura 17: Distribución de repetidos CTG en grupos étnicos del Sur Este de México.

Por otra parte la frecuencia para alelos largos normales (iguales o mayores a 18 repetidos CTG) fue de 4.71%, en donde los alelos largos normales se encontraron con mayor frecuencia en la población popoluca con una frecuencia de

5.88%, lo que refleja un alto número de estos alelos en los grupos étnicos de esta región del país.

Es importante resaltar la presencia de un individuo con premutación correspondiente al grupo étnico Maya, con un alelo de 41 repetidos CTG (Fig. 18). Lo que sugiere probables casos de DM1 en la población analizada.

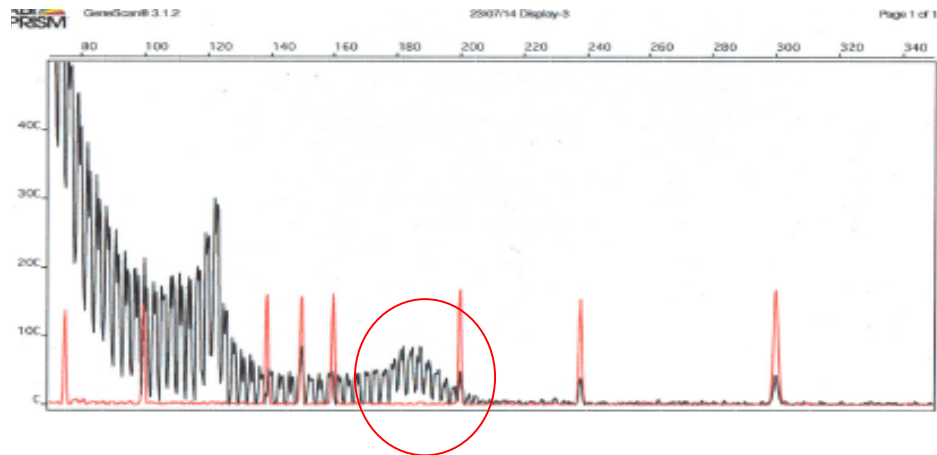


Figura 18: TP-PCR de individuo con premutación. Se observa un patrón electroforético característico de una premutación, de un alelo con 46 repetidos CTG. La muestra analizada corresponde al grupo étnico Maya.

6.3.2. Determinación de los repetidos CTG en los grupos étnicos de la región Norte de México

Se determinó el número de repetidos CTG en un total de 191 individuos de grupos nativos americanos de la zona Norte de la República Mexicana: 85 individuos del grupo étnico Pame del estado de San Luis Potosí, 74 individuos del grupo étnico Tarahumara del estado de Chihuahua y 32 individuos del grupo étnico Yaqui del estado de Sonora. En la figura 19 se observa que los alelos más comunes fueron el de 11 repetidos (45.82%) seguido del de 13 y 5 repetidos (33.39% y 5.63% respectivamente). Los alelos más frecuentes en las poblaciones nativo-mexicanas del norte del país son similares a los observados en otros grupos étnicos, sin embargo el alelo de 11 repetidos presenta la mayor frecuencia

en comparación a cada grupo, similar a lo que se observa en la población general mestizo-mexicana de Torreón. Es de resaltar que las frecuencias alélicas entre la población Pame y la población Tarahumara son muy semejantes, sin embargo la población Yaqui presenta una alta frecuencia de los alelos de 11 repetidos (56.25%), a diferencia de un bajo porcentaje de alelos de 13 repetidos (17.18%).

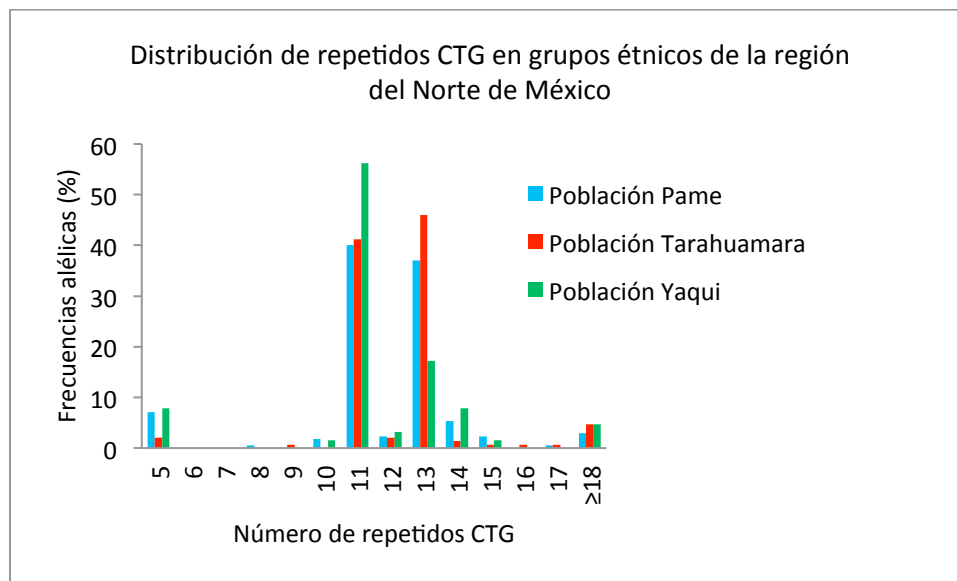


Figura 19: Distribución de repetidos CTG en grupos étnicos del Norte de México.

En cuanto la frecuencia de alelos largos normales, se encontró 4.12%, siendo la población Tarahumara la que posee una mayor frecuencia de estos alelos con un 4.73%, seguida de la población Yaqui (4.67%) y por último la población Pame (2.94%).

6.3.3. Determinación de los repetidos CTG en los grupos étnicos de la región centro de México.

Se determinó el número de repetidos CTG en un total de 109 individuos de grupos nativo americanos de la zona Centro de la República Mexicana: 78 individuos del grupo étnico Nahuatl del Distrito Federal, 31 individuos del grupo étnico Nahuatl del estado de Morelos (Fig 20). El alelo más común fue el de 13

repetidos (44.54%) seguido del de 11 y 14 repetidos (33.90% y 4.35% respectivamente), siendo este último muy frecuente en la población Nahua de Morelos.

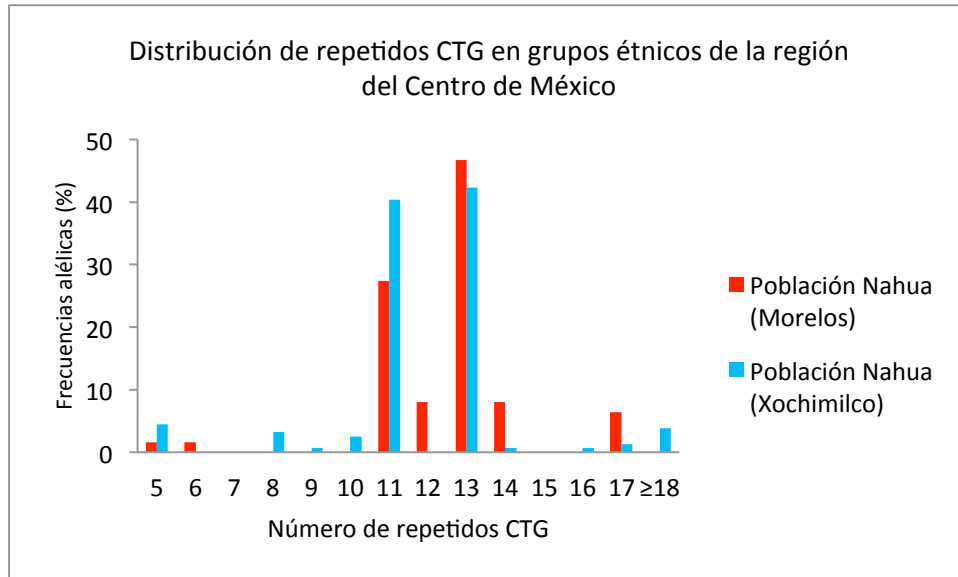


Figura 20: Distribución de repetidos CTG en grupos étnicos del Centro de México.

Con respecto a la frecuencia de alelos largos normales, se encontró un 1.92%, siendo la población Nahua de Xochimilco la que contó con la presencia de estos alelos en un 3.84%, mientras que en la población Nahua de Morelos no se encontró ningún alelo largo.

A pesar de que en la zona centro los grupos étnicos mostraron alelos largos en menor frecuencia, cabe resaltar que se encontró la presencia de un alelo premutado con 41 repetidos CTG el cual corresponde al grupo étnico Nahua de Xochimilco.

6.3.4. Determinación de los repetidos CTG en los grupos étnicos de la región Sur de México

Por último, se determinó el número de repetidos CTG en un total de 91 individuos de grupos nativo americanos de la zona Sur de la República Mexicana (Oaxaca): 46 individuos del grupo étnico Zapoteco de Oaxaca y 45 individuos del grupo étnico Mixe de Oaxaca (Fig 21).

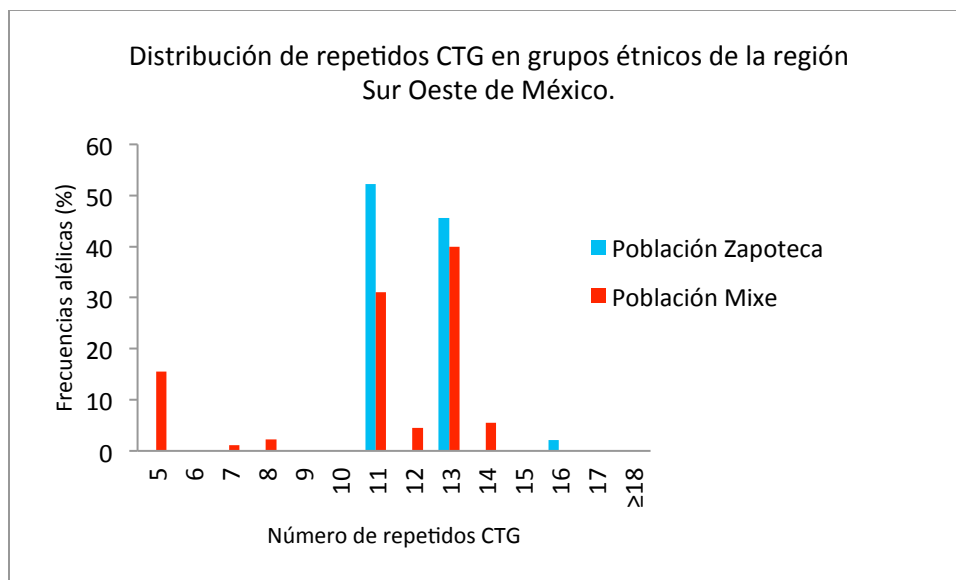


Figura 21: Distribución de repetidos CTG en grupos étnicos del Sur Oeste de México.

El comportamiento de estas poblaciones es similar pero menos polimórfico que otros grupos étnicos. Se observa que el alelo más común fue el de 13 repetidos (42.82%) seguido del de 11 y 5 repetidos (41.64% y 7.77% respectivamente).

Con respecto a los alelos largos normales, no se encontró ningún alelo largo en estos grupos analizados.

En resumen, contemplando a todos los grupos étnicos en conjunto, se analizaron un total de 561 sujetos de 10 grupos nativo americanos de México. Los grupos nativo americanos, se encuentran distribuidos en diferentes zonas de

la República Mexicana. Se determinaron las frecuencias alélicas para cada una de las poblaciones como se mostró anteriormente y se encontraron 27 alelos diferentes que se encuentran en el rango de 5 a 46 repetidos CTG. El alelo más común es el de 13 repetidos (43.31%) seguido por alelos de 11 y 5 repetidos (34.78 y 7.36% respectivamente). Los grupos étnicos presentan un comportamiento similar, sin embargo se presentan características específicas para cada grupo pertenecientes a diferentes regiones del país (Figura 22).

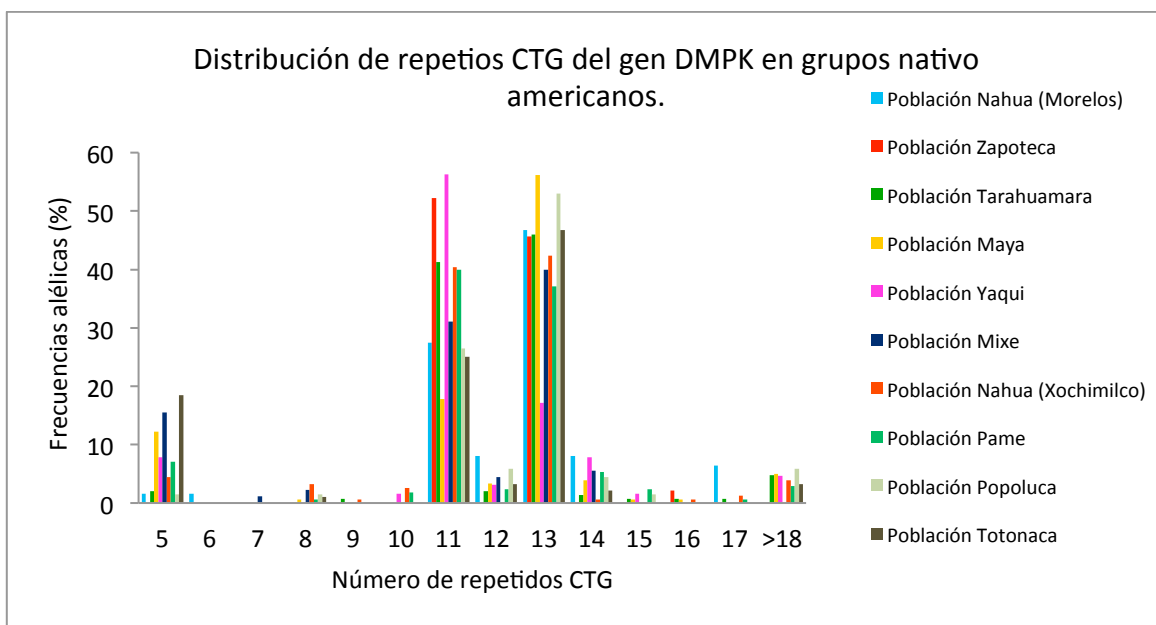


Figura 22: Distribución de repetidos CTG en grupos nativo americanos. Se muestran las frecuencias alélicas de cada grupo nativo americano; el alelo más frecuente es el 13 repetidos seguido de 11 y 5 repetidos (43.07%, 35.78% y 7.07% respectivamente).

Con respecto a la presencia de alelos largos normales, la frecuencia es de 3.03%, la cual se encuentra por debajo de lo encontrado en la población mestizo-Mexicana, sin embargo muchos alelos se encuentran en regiones limítrofes entre un alelo normal y una pre-mutación, encontrando 2 casos con pre-mutación para la DM1.

6.4. Comparación de la Distribución alélica de los grupos étnicos y la población Mestizo Mexicana

Al comparar las frecuencias alélicas de grupos étnicos con la distribución alélica encontrada en la población mestizo mexicana y la población europea, se observa que la población mestizo mexicana presentan una distribución alélica intermedia entre la población nativo-americana y las poblaciones Europeas (Magaña et al. 2011), es evidente que la población mestizo mexicana presenta una mayor similitud a lo encontrado en grupos nativo americanos (Fig 23). Esta particular distribución podría sugerir que la carga genética ancestral nativo americana presenta una gran influencia para nuestras poblaciones actuales mestizo-Mexicanas.

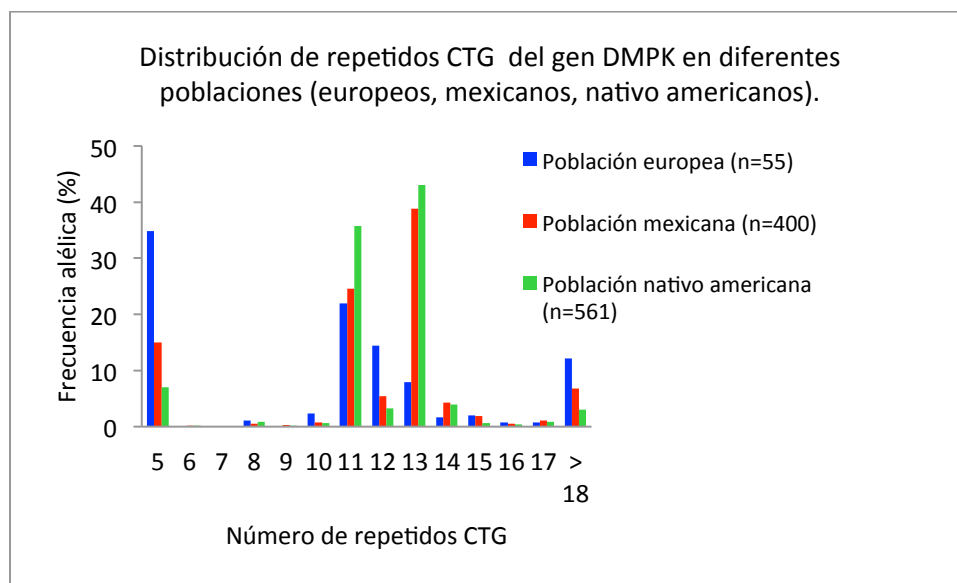


Figura23: Comparación de la distribución de repetidos CTG en población mestizo mexicana, europea y grupos nativo americanos.

Conforme al comportamiento genético de cada grupo poblacional y tomando en cuenta la distribución de repetidos CTG del gen DMPK, se realizó un análisis de componentes principales para observar la relación de estos grupos. En la Figura

24 se observa que las poblaciones mestizas presentan un comportamiento similar, siendo la población del DF una población más lejana con respecto a su comportamiento genético. Tanto los grupos del norte, sur este y centro presentan comportamientos muy diversos pero cada grupo se encuentra emparentado entre sí. Sin embargo los grupos del sur presentaron un comportamiento suigenaris ya que se encuentran lejanos entre sí, pudiendo no estar tan emparentados, y como se mencionó anteriormente los zapotecos pertenecen a la familia lingüística otomangue y los mixes a la familia mixe zoque lo cual también puede indicar la lejanía entre estas poblaciones.

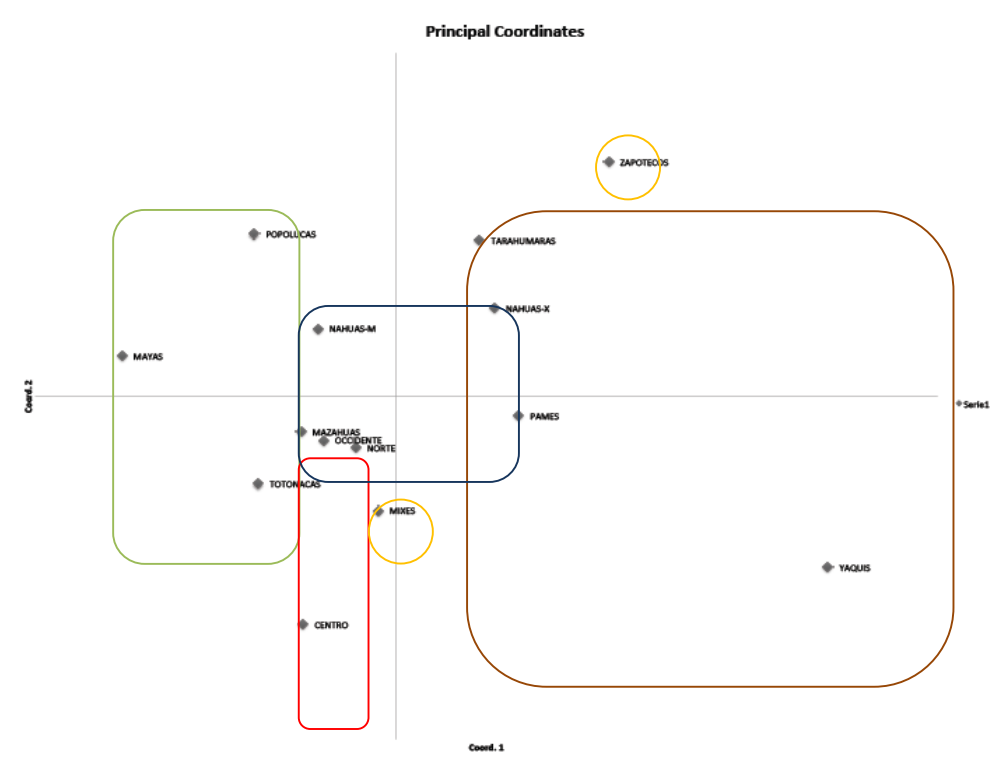


Figura 24. Análisis de componentes principales. Se observa de manera general el comportamiento de los repetidos CTG en diversas poblaciones de nuestro país y su relación entre ellas. En color café podemos observar las poblaciones étnicas del norte (Pame, Tarahumara y Yaqui), en color verde podemos observar las poblaciones del sur-este (Maya, Popoluca y Totonaca), en color rojo podemos observar a la población Mestiza (Torreón, Morelia y D.F), en color azul a las poblaciones del centro (Nahuas de Xochimilco y Nahuas de Morelos) y por último en color amarillo a las poblaciones del sur (Zapoteca y Mixe).

6.5. Parámetros poblacionales para los grupos analizados

Se realizó un análisis del Equilibrio de la Ley de Hardy y Weinberg (EHW) para cada marcador por medio de la prueba de chi cuadrada y por la estimación de la prueba de Weir y Cockerham.

El análisis por medio del programa POPGen 32 para la inferencia del EHW por la prueba de chi cuadrada determinó que el marcador microsatélite CTG del gen DMPK se encontró en equilibrio con la ley de EHW en las poblaciones del Centro (DF), Occidente (Morelia), Maya, Totonaca, Popoluca, Zapoteca, Nahua (Xochimilco), Pame, Tarahumara y Yaqui; mientras que las poblaciones del Norte (Torreón), Mixe y Nahua (Morelos) no siguieron el equilibrio de EHW (Tabla 16). Después de este análisis como se muestra en la Tabla 16 se decidió analizar cada marcador por medio del programa GENÉTIX para la estimación de la EHW a partir de la prueba de Weir y Cockerham, ya que este análisis se ha establecido para disminuir los errores tipo I y tipo II que podrían provocar algún sesgo en esta determinación. La prueba de Weir y Cockerham confirmó los datos obtenidos en el desequilibrio con EHW. De cada población se definió la heterocigosidad y el Índice de Nei, el cual nos determina el grado polimórfico del marcador analizado. Podemos observar que el valor de diversidad genética encontrado nos indica un alto grado de polimorfismo para este locus; y prácticamente todas las poblaciones se encontraron en equilibrio de HW, lo cual nos habla de que este microsatélite cumple con las características para ser un buen marcador genético: elevado polimorfismo y alto grado de heterocigosidad. Por otra parte dos poblaciones no se encontraron en equilibrio de HW (Mixes y Nahuas de Morelos) como se mencionó anteriormente, y esto puede atribuirse al tamaño de la muestra analizada para el caso de Mixes y Nahuas (Mixes $n=45$ y Nahuas de Morelos $n=31$); mientras que para la población de Torreón podría atribuirse características o estructura de la población en específico como migración.

Tabla 6. Parámetros genético-poblacionales del microsatélite CTG en el gen DMPK

Población	HWE	He	Diversidad genética
D.F.	0.96	0.76	1.69
Torreón	0.23	0.74	1.68
Morelia	0.95	0.73	1.61
Mayas	0.98	0.52	0.78
Totonacas	0.90	0.68	1.37
Popolucas	0.91	0.62	1.28
Zapotecas	0.98	0.52	0.78
Mixes	0.55	0.71	1.45
Nahuas Xochimilco	0.98	0.65	1.35
Nahuas Morelos	0.32	0.68	1.43
Pames	0.99	0.69	1.48
Tarahumaras	0.89	0.61	1.22
Yaquis	0.99	0.63	1.41

6.6. Análisis de los alelos largos normales en la población mexicana

La presencia de alelos largos no es tan común en las poblaciones sanas, pero la alta frecuencia de estos alelos se ha relacionado con la presencia de la enfermedad, como se describió en la sección de Introducción (ver sección 1.5).

Por consiguiente al tener las frecuencias alélicas se decidió hacer un comparativo de la presencia de éstos en las poblaciones nativo-americanas. Como se observa en la figura 24, los grupos nativo americanos del Norte y del Sur Este muestran alelos largos normales con una frecuencia que va de 3.26% a 5.88%. Mientras los grupos nativo americanos del centro y el Sur Oeste muestran una baja frecuencia de estos alelos (Fig 24). En la tabla 5 se observan las frecuencias de alelos largos normales encontrados para la población general así como en los grupos nativo americanos analizados.



Figura 24: Distribución de alelos largos normales en diferentes grupos nativo americano.

Tabla 5: Frecuencias de alelos largos normales.

Población	Alelos >18 CTG (%)
México (Magaña et al. 2011)	6.37
D.F.	6.97
Torreón	4.85
Morelia	10.29
Región Sur Este	
Mayas	5.01
Totonacas	3.26
Popolucas	5.88
Región Sur	
Zapotecas	0
Mixes	0
Región Centro	
Nahuas Xochimilco	3.84
Nahuas Morelos	0
Región Norte	
Pames	2.94
Tarahumaras	4.73
Yaquis	4.69

Tabla 5: Se puede observar las frecuencias de alelos largos normales en las poblaciones analizadas según su distribución geográfica.

Como se puede observar que prácticamente en todos los diversos grupos mestizo-Mexicanos y en los grupos étnicos nativo-americanos estudiados existe la presencia de alelos largos normales, sin embargo la presencia de éstos es aún mayor en las poblaciones mestizo Mexicanas, cabe señalar que su alta frecuencia también es evidente en los grupos étnicos del sur-este y del norte del país, presentando una baja frecuencia en los grupos del suroeste.

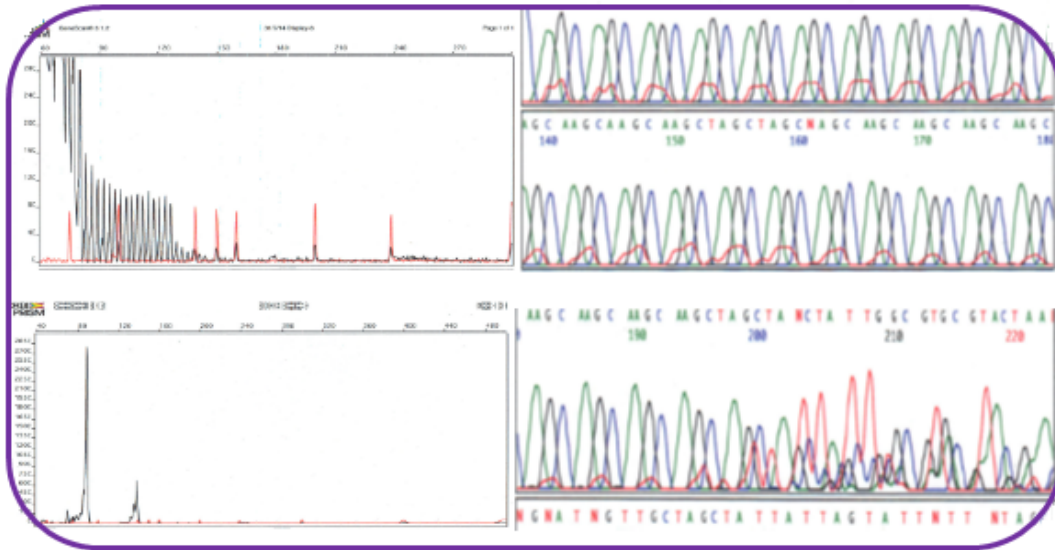
6.7. Efecto de la composición de los repetidos CTG de los alelos largos normales

De acuerdo a la alta frecuencia de alelos largos normales tanto en población mestizo-Mexicana como en los diversos grupos étnicos, se decidió analizar la constitución de estos para determinar si son marcadores puros o imperfectos, y que esto pudiera contribuir en mecanismos implicados en una expansión anormal.

Se realizó la secuenciación de alelos normales y alelos largos normales, para evaluar el efecto de la composición de los repetidos CTG en estos alelos. Se analizaron 12 alelos normales en un rango de 11 repetidos hasta 27 repetidos CTG. A diferencia de otras patologías causadas por expansiones de tripletes repetidos, los alelos largos normales analizados no mostraron interrupciones dentro del tracto de repetidos, efecto similar se observó en los alelos normales en la población Mexicana (Fig 25).

Como control analizamos la secuencia de 2 alelos correspondientes a premutación en familiares de pacientes con DM1(46 y 40 repetidos respectivamente), de la misma manera se analizó la secuencia de 2 mutaciones pequeñas (73 y 78 repetidos respectivamente), en estos casos tampoco se determinó la presencia de alguna interrupción.

A)



B)

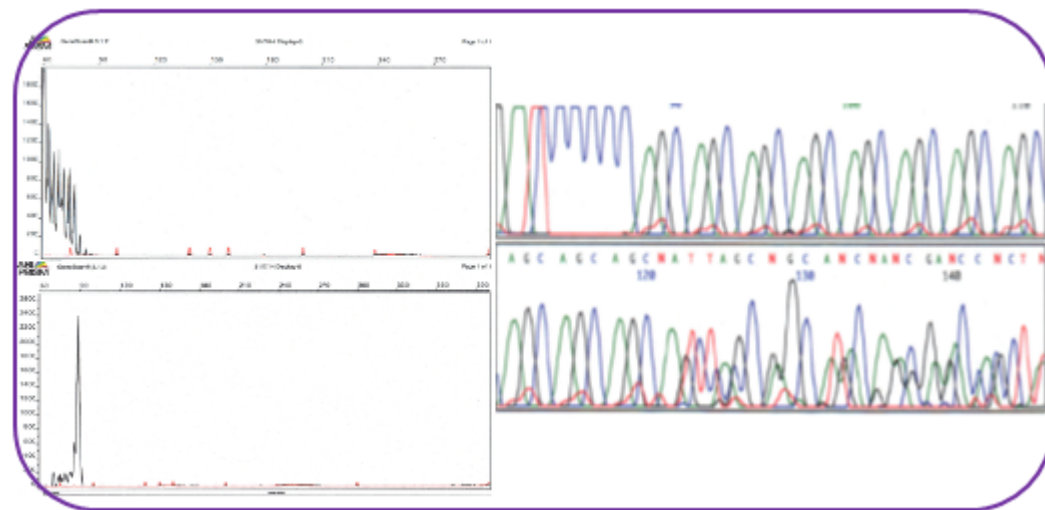


Figura 25: Secuencias del tracto de repetidos de alelos del gen DMPK. En la figura A1 se aprecia un patrón electroforético de TP-PCR, en la figura A2 se observa un patrón electroforético de una PCR y en la figura A3 la secuencia de un alelo largo normal con 27 repetidos CTG (el cual no muestra interrupciones). En la figura B1 se aprecia un patrón electroforético de TP-PCR, en la figura B2 se observa un patrón electroforético de PCR y en la figura B3 la secuencia de alelo normal con 11 repetidos CTG (que tampoco muestra ninguna interrupción).

7. Discusión

La DM1 es la distrofia muscular más frecuente en adultos a nivel mundial con una incidencia de 1/8000 individuos. Es una patología multi-sistémica que tiene importantes implicaciones en los pacientes ya que es una enfermedad degenerativa que puede originar un alto grado de discapacidad y en últimas instancias llevar a la muerte a los pacientes. La patología es causada por una expansión anormal de tripletes repetidos (CTG) en la región 3'UTR del gen *DMPK*. Hasta la fecha es una enfermedad que no se encuentra completamente caracterizada con respecto a su patogénesis molecular y mecanismos implicados en el daño celular, de la misma manera al ser una mutación dinámica, tampoco se ha logrado entender los mecanismos de expansión entre una generación y otra. Con respecto a su frecuencia, las enfermedades producidas por expansiones de tripletes repetidos y en especial la DM1, presentan una alta variabilidad entre poblaciones y zonas geográficas. Por ejemplo, existe una baja prevalencia en poblaciones de origen africano (Goldman et al. 1994) o poblaciones taiwanesas (Pan H et al. 2001), mientras que en poblaciones caucásicas y asiáticas principalmente japonesas y coreanas presentan una alta prevalencia de DM1 (Kwon et al. 2010; Davies et al. 1992). Estas variaciones se han atribuido a posibles diferencias étnicas y poblacionales, sin embargo se ha determinado que probablemente otras modificaciones genéticas in "cis" o en "trans" a la mutación podrían estar implicadas en los mecanismos de inestabilidad entre un progenitor normal y un descendiente que presente una premutación, o entre un progenitor con premutación y un descendiente con una mutación con penetrancia completa y finalmente subsecuentes generaciones de pacientes presentando altos rangos de inestabilidad.

Sin embargo al ser una patología genética poco conocida, la falta de un diagnóstico certero ha complicado los análisis en diferentes poblaciones ya que esta enfermedad generalmente se encuentra sub-diagnosticada, esto refleja la poca información de casos de esta patología en poblaciones del sur-oeste

asiático, África y Latinoamérica. A la fecha, no se cuentan con reportes en poblaciones latino-americanas y específicamente en nuestro país.

7.1. La DM1 en nuestro país y su carga genética

Recientemente, estudios realizados por Magaña y colaboradores, sugieren que la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país puede ser semejante a lo reportado en poblaciones caucásicas o japonesas (poblaciones con mayor prevalencia de la enfermedad); esto con base en la alta frecuencia encontrada de alelos largos normales ya que como se mencionó anteriormente los alelos con más de 18 repetidos CTG, pueden significar un depósito para futuras expansiones. Con respecto a este punto se sabe que en patologías como Ataxia Espinocerebelosa tipo 1, 2, 3 y 6 (SCAs), Atrofia Dentato-Rubro-Pálido-Luisiana (DRPLA) y la Enfermedad de Huntington (Squitieri et al. 1994; Takano et al. 1998; Laffita et al. 2014), una alta frecuencia de alelos largos con un número de repetidos cercano al umbral de repetidos correspondiente a la mutación puede estar asociada con un aumento en el número de casos de dichas patologías. En el caso de la DM1 los alelos por encima de 50 repetidos CTG son considerados patológicos, sin embargo la presencia de alelos que van de 35 a 49 repetidos se asocian con un umbral correspondiente a la premutación. Por otra parte los alelos normales de este gen se presentan en un rango de 5 a 34 repetidos CTG, siendo el alelo de 5 repetidos el más frecuente para la mayoría de las poblaciones. En poblaciones con baja prevalencia de la DM1 como la Afro-negroide, Afro-americana y Taiwanwesa la frecuencia de estos alelos largos normales es menor al 1%, mientras que en poblaciones como Japonesa, Yugoslava y Europea se presenta una frecuencia alta por encima del 5 o 6 %.(Pan H et al. 2001; Acton et al. 2007; Goldman et al. 1994; Hsiao et al. 2003 y Culjkovic et al. 2002; Davies et al. 1992) lo que se asocia con una alta prevalencia de la DM1 en estas poblaciones.

Esta evidencia ha llevado a postular (postulado de Tishkoff) que la presencia de alelos largos normales se encuentran directamente asociados con la alta prevalencia de este tipo de patologías. (Tishkoff et al. 1998).

Por lo que estos datos sugieren que la población mexicana puede tener una prevalencia alta de DM1, lo cual se ha reforzado con la descripción de alrededor de más de 200 casos con diagnóstico de la enfermedad en los tres últimos años en el INR (Márquez, 2013), el cual es considerado como un centro de referencia para enfermedades discapacitantes en nuestro país.

Aunado a esto en el estudio realizado por Magaña y colaboradores (Magaña et al. 2011), se observó que la frecuencia de los alelos normales presenta un comportamiento muy diferente a lo reportado en otras poblaciones. En donde el alelo más común para la población mexicana fue el 13 repetidos CTG con una frecuencia de 38.8% seguido del de 11 repetidos CTG con una frecuencia de 24.6%, estos alelos tienen frecuencias mayores a las encontradas en otras poblaciones, en donde el alelo de 5 repetidos es el más común para poblaciones Taiwanesa, Yugoslava, Afroamericana, Chilena, entre otras (Acton et al. 2007; Goldman et al. 1994; Hsiao et al. 2003; Tishkoff et al. 1998); mientras que el alelo de 12 repetidos CTG es el predominante en la población Coreana (Deka et al. 1996; Tishkoff et al. 1998). Lo cual nos lleva a la sospecha de que dicho comportamiento se debe a nuestro peculiar background genético debido al mestizaje de nuestra población y con una alta contribución de la población Nativo Americana.

Con respecto a este punto, sabemos que la población mexicana es una población joven que se ha constituido en los últimos 500 años, por lo que un fenómeno mutacional sería descartado, ya que el número de generaciones es muy pequeño para determinar cambios significativos en la distribución de la población. Ahora bien, la población contemporánea de México se encuentra conformada por mestizos, la cual es la mezcla de diferentes grupos étnicos con diferentes características génicas, constituida principalmente por grupos Nativos conocidos como Amerindios, migrantes europeos (principalmente españoles) quienes arribaron posterior a la conquista en el siglo XVI y grupos Africanos

(principalmente de África del Oeste) que se establecieron en nuestro país entre el siglo XVI al XVIII como consecuencia de la esclavitud (Aguirre, 1981; Stavenhagen and Carrasco, 1997). Este mestizaje es relativamente reciente (1516), razón por la cual no se ha logrado una homogeneidad genética producto de la panmixia (probabilidad de que cada uno de los hombres y mujeres de una población tienen la misma capacidad de apareamiento con el sexo opuesto), lo cual es independiente de su genotipo, lo que nos indica que la falta de homogeneidad se debe al flujo génico. Estudios recientes indican que los grupos mestizo-mexicanos presentan un 65% de descendencia Amerindia, un 30% de Europea y un 5% Africana (Martinez-Marignac, 2007). Sin embargo, estos porcentajes varían en las distintas regiones geográficas, ya que en algunos sitios el porcentaje de ascendencia Europeo es mucho mayor como en el norte del país, mientras que en las regiones del Golfo de México la presencia de genes Africanos representa un gran porcentaje de la carga genética (Silva-Zolezziet al. 2009; Rubí-Castellanos et al. 2009). Por otra parte, algunas regiones del sureste presentan mayor carga Amerindia en comparación de la Caucásica. De la misma forma, debemos considerar que la población Mexicana ha tenido otras migraciones menos importantes, sin embargo genéticamente tienen una influencia real, entre ellas se encuentra la migración Caucásica proveniente de Francia, Alemania e Italia así como las migraciones Asiáticas, principalmente de grupos judíos y libaneses. Estas migraciones han impedido que la población logre un equilibrio génico, pues han sido de aparición relativamente reciente, además de que han generado sesgos en el flujo génico, es decir que el DNA mitocondrial (mtDNA) sea de origen Amerindio, mientras que los marcadores estudiados en el cromosoma Y sean de origen Europeo, aunque en algunos casos también puede ser de origen Africano. Esta herencia acuña a lo que llamamos "*Mestizos*". El Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) define el término *Mestizo* como una persona que ha nacido en México y cuyo primer apellido se deriva de los colonizadores Españoles y que tiene una familia de ancestros Mexicanos de por lo menos tres generaciones (Sánchez, 1996).

Diversos estudios poblacionales a través de diferentes marcadores genéticos han comprobado que nuestra población se encuentra sub-estructurada. El análisis de estructura genética para la población mexicana mostró que ésta población mestiza podría ser dividida en tres subpoblaciones diferentes (Noris et al. 2012; Silva-Zolezzi et al. 2009). Esto concuerda con informes anteriores que tienen establecido que la población mestiza mexicana muestra una estratificación genética integrada por una ascendencia trihíbrida, que a su vez muestra diferentes proporciones de cada ascendencia en todo el país (Fig 26) (Noris et al. 2012).

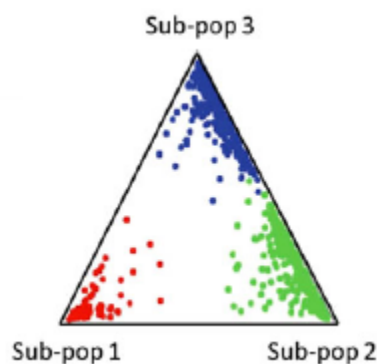


Figura 26: Diagrama usado para representar a los individuos de una población se ordenan en varias subpoblaciones. El triángulo equilátero, muestra a través de un análisis de 15 marcadores autosómicos la representación de tres subpoblaciones, cada esquina del triángulo representa una población parental (Noris et al. 2012).

Por lo que nuestro background genético puede explicar la singular distribución alélica del gen *DMPK* en nuestra población. Esta evidencia nos llevó a pensar que el comportamiento *sui generis* de nuestra población (Magaña et al. 2011) está dado por la gran influencia de nuestra ancestría nativa americana. Para constatar esta hipótesis se decidió analizar un grupo de individuos sanos de tres diferentes regiones del país para determinar si el comportamiento en nuestra población es homogéneo con respecto a la distribución alélica de los repetidos CTG del gen *DMPK*. Posteriormente, para evaluar la existencia de la influencia nativa-americana en la población mestiza, se determinó y analizó el número de repetidos CTG del gen *DMPK* en diversos grupos Nativos Americanos, ya que son grupos ancestrales de la población actual mexicana.

7.2. Comportamiento genético del triplete CTG en la población mestizo-mexicana

Se determinó en número de repetidos CTG de individuos de población general de la ciudad de Torreón (norte), la ciudad de México (centro) y la ciudad de Morelia (sur-oeste). Se observó un comportamiento alélico similar en las tres regiones del país, con una distribución alélica bimodal con picos en 5 y en 13 y 11 repetidos. Esto indica que el *background* genético en la población mestizo-mexicana, al menos del locus *DMPK* puede reflejar el comportamiento general en nuestro país. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias entre estas poblaciones, por ejemplo la población del D.F. presenta una frecuencia mayor para el alelo de 5 repetidos (18.02%) con respecto a las poblaciones de Torreón (8.84%), Morelia (7.35%) y Población General (15%); esta diferencia puede deberse a que el D.F. es la zona urbana más grande del país, así como el principal centro político, académico, económico, financiero y cultural, lo cual estimula la inmigración intra-nacional con lo que se tiene diferente comportamiento genético en la zona centro.

En cuanto a los alelos largos normales, las tres poblaciones presentaron una frecuencia relativamente alta de los mismos. Estos datos sugieren un comportamiento similar en las regiones analizadas. Por lo que se podría hablar de una alta frecuencia de la DM1 en todo nuestro país, esto es de considerarse ya que anteriormente en la literatura las poblaciones con mayor frecuencia eran las caucásicas y asiáticas, sin embargo pareciera que las poblaciones latinas podrían tener también un alto número de casos. En este aspecto el alto incremento de pacientes diagnosticados con DM1 en nuestra población (Márquez, 2013), nos hace sospechar que la frecuencia de alelos largos normales si se asocia con un incremento en la prevalencia de la enfermedad en determinada zona geográfica, esto concuerda con diversos reportes anteriormente reportados en la literatura (Tishkoff et al. 1998; Deka et al. 1994; Hsiao et al. 2003; Acton et al. 2007).

Por otro lado, en cuanto a los alelos analizados en los familiares de pacientes con DM1, al realizar la comparación con lo reportado anteriormente por Magaña y colaboradores en población general mestizo mexicana se aprecia que la distribución alélica no varía considerablemente. Se debe destacar que se encontró una frecuencia de alelos largos normales de 5% que se considera alta a pesar de que varios de estos individuos se encuentren relacionados entre sí y a pesar de que en familiares e individuos en riesgo ya se excluyeron los alelos mutados, esto refuerza la idea de que en nuestra población puede encontrarse una alta frecuencia de la enfermedad comparada con muchas poblaciones a nivel mundial (Fig 15).

7.3.Repetidos CTG en diversos grupos étnicos y su efecto en la población general

Conforme a lo esperado, claramente la frecuencia de los alelos de 11 y 13 repetidos es muy alta en prácticamente todos los grupos étnicos, mientras que el alelo de 5 repetidos presenta una baja frecuencia, lo cual comprueba que el comportamiento de la población mestizo mexicana se encuentra dado por una alta influencia de la población nativo americana. En el total de individuos analizados se encontraron 27 alelos diferentes que en el rango de 5 a 46 repetidos CTG. El alelo más común es el de 13 repetidos (43.31%) seguido por alelos de 11 y 5 repetidos (34.78 y 7.36% respectivamente). Como se puede observar, a pesar de ser grupos más cerrados se identificó un alto número de alelos, casi comparable a lo observado en las poblaciones mestizas, sin embargo, a pesar de encontrar este número tan extenso de alelos, la distribución se concentra principalmente en 2 alelos (13 y 11 repetidos) lo que señala un grupo más endógeno y cerrado.

En general, en los grupos étnicos analizados el alelo de 11 repetidos se encuentra en una frecuencia que va del 17.77% al 56.25% y el alelo de 13 repetidos se encuentra con una frecuencia que va de 17.18% al 56.11%, mientras que la frecuencia de estos dos alelos en conjunto va de 71.11% al 97.82%; es decir que

la frecuencia de estos dos alelos específicos es mucho mayor en comparación con la frecuencia de los demás alelos. En concordancia la población Mestizo Mexicana muestra una alta frecuencia para los alelos de 11 y 13 repetidos (Magaña et al. 2011). Este hallazgo es peculiar, ya que la frecuencia de estos dos alelos (13 y 11) es preponderante en las poblaciones de origen étnico nativo-americano a diferencia de lo observado en prácticamente todas las poblaciones del planeta anteriormente analizadas, por lo tanto este polimorfismo podría ser usado como un marcador forense y de estudios de grupos étnicos para poblaciones nativo-americanas.

Entre los grupos étnicos se encuentran algunas diferencias, por ejemplo las poblaciones Zapoteca, Yaqui y Pame, presentan una mayor frecuencia para el alelo de 11 repetidos, mientras que en las demás poblaciones el alelo más frecuente es el de 13 repetidos; sin embargo el comportamiento genético de los grupos no cambia significativamente. Otro punto a resaltar es que en la población Zapoteca no se encontró el alelo de 5 repetidos CTG, lo cual confirma que a pesar de ser el alelo más frecuente en las poblaciones estudiadas a lo largo del mundo, es un alelo prácticamente ausente en la población nativo americana (Magaña et al. 2011). Interesantemente el alelo de 14 repetidos mostró una frecuencia más alta en la población Nahua de Morelos a diferencia de lo descrito en los otros grupos étnicos.

En general, el comportamiento genético entre los grupos étnicos es relativamente similar, presentando a los alelos de 13 y 11 repetidos como los más frecuentes, además se presenta el alelo de 5 repetidos en muy baja frecuencia, esto al compararlo con la población mestizo Mexicana, confirma que la alta frecuencia de los alelos 13 y 11 en nuestra población se debe a una alta influencia de nuestros grupos nativo-americanos.

Como se mencionó entre los diversos grupos étnicos a pesar de presentar frecuencias similares de los alelos más frecuentes, se pueden observar diferencias en la distribución alélica y genotípica entre cada grupo étnico. Conforme al análisis de componentes principales se observó que las poblaciones Maya, Totonaca y

Popoluca se encuentran relativamente cercanas entre sí, esto de cierta manera es lógico ya que geográficamente se encuentran relacionadas, pero al identificar por familias lingüísticas, no se observa una relación. Para las poblaciones del norte como la Pame, Tarahumara y Yaqui se encuentran relativamente cercanas y al identificarlas por familias lingüísticas se observas que la población Yaqui y Tarahumara pertenecen a la misma familia (yuto- Nahua) sin embargo la población Pame no comparte la misma familia lingüística; mientras las poblaciones Nahua de Xochimilco y Nahua de Morelos que se encuentran muy cercanas entre sí. En contraparte las poblaciones Mixe y Zapoteca parecen tener un componente genético completamente diferente, lo cual puede ser por tener características genéticas poblacionales distintas o por un sesgo en la muestra analizada (limitado número de individuos analizados), sin embargo este análisis se realizó solo identificando la variabilidad de microsatélite CTG en el gen *DMPK*, por lo que sería interesante realizar un estudio que conjunte otros aspectos genéticos, históricos, culturales y ampliar el número de marcadores genéticos analizados, como se ha realizado en otros estudios (Moreno-Estrada et al. 2014).

7.4. Análisis de los alelos largos normales y su importancia

En cuanto a los alelos largos normales; los grupos nativo americanos del Norte y del Sur Este muestran alelos largos normales con una alta frecuencia que va de 3.26% a 5.88%. Mientras los grupos nativo americanos del centro y el Sur muestran una baja frecuencia de estos alelos (0% y 1.92% respectivamente).

A pesar de ser tamaños de muestras pequeños en algunas poblaciones, es de gran relevancia que se identificó un alto número de alelos largos normales, además se encontraron casos de premutación, lo que refuerza nuestra hipótesis y nos sugiere que podrían encontrarse casos de DM1 en estos grupos Nativo Americanos, lo cual sería un importante hallazgo.

En la tabla 5 se observan las frecuencias de alelos largos normales encontrados para la población general así como en los grupos nativo americanos analizados. Por lo que considerando lo postulado por Tishkoff, que propone que la presencia de alelos expandidos son originados a partir de alelos intermedios o alelos largos normales (Tishkoff et al. 1998; Goldman et al. 1994), lo cual ha sido corroborado a través de diversos estudios que confirman que las poblaciones que presentan una alta prevalencia de DM1 correlacionan con una mayor presencia de alelos intermedios o alelos largos normales, como en poblaciones Caucásicas o Japonesas, en contraparte con poblaciones africanas, afroamericanas y taiwanesas que presentan una menor frecuencia de alelos mayores a 18 repetidos lo que concuerda con la baja prevalencia de DM1 reportada en estas poblaciones (Tishkoff et al. 1998; Goldman et al. 1994; Magaña et al. 2011; Magaña et al. 2012).

Esta propuesta en donde la frecuencia de alelos largos normales correlaciona con la prevalencia de la enfermedad; también se ha observado en otras patologías producidas por expansiones de repetidos, como Corea de Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo 2 y 3, entre otras (Squitieri et al. 1994; Takano et al. 1998; Laffita et al. 2014), por lo que el conocimiento de la presencia de alelos largos normales en una población nos puede dar un panorama de que tan frecuente es esta patología.

Todos estos hallazgos apuntan a que existe una alta frecuencia de alelos largos normales en grupos étnicos, así como la identificación de individuos con premutación, lo que indicaría que en gran medida la ancestría nativo-americana contribuye con la alta frecuencia de casos de DM1 en nuestra población y no solo se presentan por una carga genéticamente europea asociada a la enfermedad. Estos datos confirmarían el postulado de Tishkoff en nuestra población.

7.5.El efecto de la composición del tracto de repetidos, un primer análisis

A pesar de preveer que en población mexicana podrían existir cientos de casos de DM1, aún se desconoce por completo los mecanismos de inestabilidad, es decir, ¿por qué se producen estas expansiones? Múltiples factores se encuentran implicados en la inestabilidad de trinucleotidos repetidos, los cuales se dividen generalmente en dos categorías; en primer lugar los factores en *trans* que a menudos están involucrados en la replicación y reparación del ADN, tales como FEN1, Msh2, Msh3 y Msh6. Deficiencia de estos factores en *trans* dan como resultado inestabilidad genómica (Manley et al. 1999;Gordenin 1997; van den Broek, 2002; Mirkin, 2005). La otra categoría que son los factores in *cis* reflejan propiedades locales de los loci tales como la proximidad de las islas CpG (Brock et al. 1992), la orientación del origen de replicación adyacente(Cleary and Pearson 2003) y el número de copias y la composición del tracto de repetidos (Pearson et al. 2005). Por lo anterior se decidió analizar la estructura o el componente genómico del tracto de repetidos CTG de este gen, ya que en otras patologías como Ataxia Espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) que es causada por una expansión de repetidos CAG, un análisis de secuencia de alelos normales reveló una composición de repetidos con 1 y hasta 3 interrupciones CAT en el 98% de los cromosomas analizados; en contraste los alelos de SCA1 expandidos se caracterizan por carecer de interrupciones (Zuhlke et al. 2002). Para el caso de Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 que es debida a una expansión de repetidos CAG, los alelos normales presentan 1 o más interrupciones CAA, mientras que alelos expandidos no presentan interrupciones en el tracto de repetidos (Choudhry, 2001). Cabe mencionar que también se encontró para el Síndrome de X Frágil el cual es debido a la expansión de repetidos CGG, un estudio demostró la prevención de insuficiencia ovárica prematura en pacientes con alelos intermedios que presentaban interrupciones AGG dentro del tracto de repetidos (Bodega et al. 2006).Estas interrupciones se consideran que proveen estabilidad contra el deslizamiento de la polimerasa y por lo tanto la expansión de repetidos. Estos

datos concuerdan, cuando en los casos limítrofes al umbral de penetrancia completa, se pierde una interrupción que comprende el tracto de repetidos, y se presenta una inminente expansión a rangos de mutación.

Por lo tanto en este trabajo se realizó la secuenciación de alelos del gen *DMPK* para conocer la constitución mismos en el tracto de repetidos. Sin embargo como se muestra en la figura 25 no se encontró ninguna interrupción en la secuencia de los alelos analizados, lo que nos sugiere que la variación en la estructura de los repetidos en *DMPK* no influye en los mecanismos de estabilidad en gen, por lo que se podría pensar que están presentes otros elementos que pueden influir en la estabilidad como patrones de metilación, nucleosomas, secuencias que se encuentran flanqueando los repetidos, entre otros (Mulvihill et al. 2005).

Es importante resaltar el gran esfuerzo que se ha realizado y se sigue haciendo por entender los mecanismos moleculares que llevan a la inestabilidad, desde la descripción de la expansión de microsatélites como causa de mutaciones patogénicas. Todos los hallazgos deben ser tomados en cuenta para entender el significado biológico de la inestabilidad y comprender mejor este tipo de enfermedades.

Sin embargo, no debemos olvidar que no se trata de un solo mecanismo el causante de la inestabilidad sino que se trata de un conjunto de varios de ellos que forman un complejo dispositivo genético que predispone a expansiones o deleciones de repetidos de microsatélites y que hacen que los individuo presenten un comportamiento variable entre sí, ante la presencia de secuencias genéticas similares.

8. Conclusiones

- Se encontró una distribución alélica homogénea en la población general mestizo Mexicana en las diversas regiones analizadas y en todas se encontraron frecuentemente alelos largos normales lo que nos sugiere una alta prevalencia de DM1 en México.
- La particular distribución alélica en la población mexicana puede atribuirse en parte a nuestra ancestría nativo americana.
- Los alelos de mayor frecuencia (11 y 13 repetidos CTG) podrían ser usados como marcadores poblacionales, debido a su amplia distribución en grupos nativo-americanos a diferencia de las otras poblaciones a lo largo del planeta.
- Se encontró una alta frecuencia de alelos largos normales en grupos étnicos de México, además se encontraron dos individuos con premutación. El primero con un alelo de 46 repetidos perteneciente al grupo étnico Maya y el segundo con un alelo de 41 repetidos perteneciente al grupo étnico Nahuatl de Xochimilco. Lo que sugiere que la presencia de la DM1 no es exclusiva de grupos caucásicos y que podría estar presente en grupos de origen nativo-americano.
- Prácticamente todas las poblaciones para este marcador se encontraron en equilibrio con la ley de HW, lo que sugiere que no existe un efecto poblacional que incida sobre su distribución.
- Al parecer las interrupciones en DM1 no juegan un papel en la inestabilidad de los alelos como se conoce en otras patologías producidas por tripletes repetidos.

9. Perspectivas

- Incrementar y homogenizar el número de muestras para las poblaciones analizadas.
- Realizar un análisis con marcadores que nos permitan conocer la carga genética tanto Nativo Americana como europea en los pacientes con DM1.
- Realizar la secuenciación de un número mayor de alelos con mutaciones analizadas por segregación de individuos.
- Dilucidar otros mecanismos que puedan estar involucrados en inestabilidad de DM1 y abordarlos.

10. Bibliografía

- Aguirre B.G. "La población Negra de México." Secretaría de la Reforma Agraria. Estudio Etnohistórico México. Centro de Estudios de agrarismo en México .1981.
- Acton R.T. et al. "DMPK associated myotonic dystrophy and CTG repeats in Alabama African Americans." *ClinGenet* 2007. 72:448-453.
- Bird T.D. "Myotonic dystrophy type I". Gene clinics: clinical genetic information resource [data base on line]. University of Washington, Seattle 2013. Disponible en HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/brookshelf/br.fcgi?book=gene&part=myotonic-d>
- Bodega et al. "Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 expansions in premature ovarian failure manifestation." *Am J Hum Genet* 2006. 78: 125-129.
- Brook J.D. et al. "Molecular basis of myotonicdystrophy : Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3 end of a transcript encoding a protein kinase family member ". *Cell* 1992. 68:799-808.
- Brown T.A. "Genomes 3". Science Publishing. New York, 2007.
- Castel L.A. et al. "Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy". *NatRev* 2010. 11:165-170.
- Charlet B. N. et al. "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." *Mol Cell* 2002. 10(1): 45-53.
- Choudhry S. "CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms." *Hum Mol Genet* 2001. 21:2337-2446.
- Cleary J. D. and Pearson. "The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence." *Cytogenet Genome Res* 2003. 100(1-4): 25-55.
- Culjkovic B. "CTG repeat polymorphism in DMPK gene in healthy Yugoslav population." *ActaNeurolScand* 2002. 105:55-58.
- Cummings C. J. and Zoghbi H. Y. "Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology". *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000.1:281-328.
- D'Angelo M.G. "Cognitiveimpalment in neuromuscular disorders". *Muscle Nerve* 2006. 34:16-33."
- Davies J. et al. "Comparison of myotonic dystrophy associated CTG repeat in the European and Japanese populations." *J Med Genet* 1992. 29:766-769.
- De Braekeleer M. Hereditary disorders in Saguenay-Lac-St-Jean (Quebec, Canada).*Hum. Hered* 1991. 41: 141-146, 1991.

- Deka R. et al. "Distribution and evolution of CTG repeat at the myotonic protein kinase gene of human populations." *Genome Res* 1996. 2:142-54.
- Edwards A. et al. "DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats." *Am J Hum Genet* , 1991. 49(4): 746-756.
- Ellegren H. "Microsatellites: simple sequences with complex evolution". *Nat Rev Genet.* 2004 .5(6):435-45.
- Freudenreich C. H. et al. "Expansion and length-dependent fragility of CTG repeats in yeast." *Science* 1998 279(5352): 853-856.
- García Barreno P. "Horizontes culturales: Las Fronteras de la Ciencia". Espasa. España, 2001.
- Gemayel R. et al. "Beyond Junk-Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences". *Genes (Basel)*, 2012. 3(3): 461-80.
- Goldman A. et al. "Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats." *J Med Genet* 1994. 31:37-40.
- Gordenin D.A. "Repeat expansion-all in a flap?." *Nat Genet* 1997. 16:116-118.
- Gregory R. "The evolution of the genome". Elsevier Academic Press. USA, 2005. 585.
- Guízar-Vázquez. "Genética Clínica: diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias". *El Manual Moderno*. México, 2001.
- Hancock J.M. and Santibáñez M. "Trinucleotide Expansion Diseases in the Context of Micro- and Minisatellite Evolution" *EMBOJ* 1998. 17:5521-5524.
- Harper P.S. et al. "Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem". *Am J Hum Genet* 1992. 51: 10-6.
- Hartl D. and Jones E. "Genetics: Principles and Analysis". Jones and Bartlett Publishers. USA, 2009.
- Hsiao K.M. et al. "Epidemiology and genetic studies of myotonic dystrophy type 1 in Taiwan." *Neuroepidemiology* 2003. 22:283-289.
- INALI (Instituto Nacional de Lenguas Indígenas) "Programa de revitalización, fortalecimiento y desarrollo de las lenguas indígenas nacionales, PINALI." *Diario Oficial de México*, 2010.
- International Human Genome Sequencing Consortium "A physical map of the human genome". *Nature*, 2001. 409 (6822):934-41.
- International Human Genome Sequencing Consortium. "Finishing the euchromatic sequence of the human genome". *Nature*, 2004. 431(7011):931-45.
- Jiang et al. "Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons." *Hum Mol Genet* 2004.

13(24):3079-88.

Jones and Bartlett. "Genetics of populations". Jones and Bartlett Publishers.USA, 2011.

Kimura T. et al. "Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1." Human Molecular Genetics 2005. 14(15): 2189-2200.

Know MJ. "Haplotype analysis of the myotonic dystrophy type 1 (DM1) locus in the Korean population." Ann Clin Lab Sci 2010. 2:156-62.

Krzyzosiak W. J. et al. "Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target." Nucleic Acids Res 2012. 40(1): 11-26.

Laffita-Mesa J. M. et al. "Large normal alleles and SCA2 prevalence: lessons from a nationwide study and analysis of the literature." ClinGenet 2014. 86:96-8.

Lee J. E. and T. A. Cooper. "Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy." BiochemSoc Trans 2009. 37(6): 1281-1286.

Lins A.M. et al. "Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system". J Forensic Sci, 1998. 43(6): 1168-1180.

Magaña J. J. P. Cortes-Reynosa et al. "Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population." MolBiolRep 2011. 38(2): 1341-1346.

Magaña J. J. et al. Perspectives on Gene therapy in Myotonic Dystrophy Type 1. "J Neurosci Res 2011. 89(3): 275-285.

Magaña J. J. et al. "Pathogenesis of myotonic dystrophy type 1." Gaceta Medica De Mexico 2009. 145(4): 331-337.

Magaña J.J. "Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). From the Genetics to Molecular Mechanisms. Muscular Dystrophy". Rijeka, Croatia. D.M. Hedge 2012. 47-72.

Mankodi A. et al. "Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat." Science 2000. 289(5485): 1769-1773.

Manley et al. "Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice." NatGenet 1999. 23(4): 471-473.

Márquez Quiroz L. "Expansión de los repetidos CTG del gen DMPK en familias mexicanas con Distrofia Miotónica tipo 1 (DM1)." Dirigidapor Dr. en C. Jonathan Magaña. Tesis de maestría. CINVESTAV, México D.F. Departamento de Genética y Biología Molecular, 2013.

Martínez-Marignac V. "Admixture in México City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors." Hum Genet 2007. 120:807-819.

McMurray C. T. "Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development." Nat Rev

Genet 2010. 11(11): 786-799.

Mirkin S.M. "DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders". Nucleic Acids 2006. 16:351-358.

Mirkin S.M. "Expandable DNA repeats and human disease". Nature, 2007. 447:932-940.

Moreno-Estrada et al. "Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits." Science, 2014. 344(6189):1280-5.

Mulvihill et al. "Effect of CAT or AGG interruptions and CpG methylation on nucleosome assembly upon trinucleotide repeats on spinocerebellar ataxia, type 1 and fragile X syndrome." J BiolChem 2005. 280(6): 4498-4503.

Musova et al. "Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene". Am. J. Med. Genet. 2009. 1365-1374.

Noris G. et al. "Mexican mestizo population sub-structure: effect on genetic and forensic statistical parameters." MolBiol Rep 2012. 12: 39-56.

Orengo J. P. et al. "Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy." ProcNatlAcadSci U S A 2008. 105(7): 2646-2651.

Pan H. et al. "Haplotype analysis of the myotonic dystrophy type 1 (DM1) locus in Taiwan: implications for low prevalence and founder mutations of Taiwanese myotonic dystrophy type 1." Eur J Hum Genet 2001. 8:638-41.

Pearson, et al. "Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations" Nature Reviews Genetics, 2005. 6 (10):729-42.

Polak U. et al. "Expanded complexity of unstable repeat diseases." Biofactors 2013. 39(2): 164-175.

Richard G. F. et al. "Double-strand break repair can lead to high frequencies of deletions within short CAG/CTG trinucleotide repeats." Mol Gen Genet 1999. 261(4-5): 871-882.

Rubí-Castellanos R. et al. "Pre-Hispanic Mesoamerican demography approximates the present day ancestry of Mestizos throughout the territory of Mexico." Am J PhysAnthropol, 2009. 139 (3): 284-294.

Sánchez Serrano et al. "Mestizaje e historia de la población en México." Martín Municio A. García Barreno editores. Madrid 1996. 173-193.

Savkur R. S. "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy". Nat Genet 2001. 29, 40-7.

Savouret C. et al. "CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice." EMBO J 2003. 22(9): 2264-2273.

Schlötterer C. "Evolutionary dynamics of microsatellite DNA". ChromosomaFocus, 2000. 109:365-371.

- Silva-Zolezzi et al. "Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico." *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106 (21):8611-6.
- Seznec H. et al. "Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities." *Human Molecular Genetics* 2001. 10(23): 2717-2726.
- Sharma P.C. et al. "Mining microsatellites in eukaryotic genomes". *Trends Biotechnol*, 2007. 25(11):490-498.
- Squitieri F. et al. "DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reason for geographic variations of prevalence ." *Hum Mol Genet* 1994. 2:2103-2114.
- Stavenhagen R. and Carrasco T. "La diversidad étnica y cultural. El patrimonio Nacional de México." Consejo Nacional para la Cultura y la Artes. 1997. 249-280.
- Strachan T. and Read A.P. "Human Molecular Genetics". Garland Publishing. New York, 2004.
- Takano H. et al. "Close associations between prevalences of dominantly inherited. Spinocerebellar ataxias with CAG repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations." *Am J Hum Genet* 1998. 63:1060-1066.
- Tishkoff et al." A Global Haplotype Analysis of the Myotonic Dystrophy Locus: Implications for the Evolution of Modern Humans and for the Origin of Myotonic Dystrophy Mutations". *Am J Hum Genet* 1998. 62(6):1389-402.
- Udd B. and R. Krahe. "The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges." *Lancet Neurol* 2012. 11(10): 891-905.
- Van den Broeck W.J. "Somatic expansion behavior of the (CTG)_n repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins". *Hum Mol Genet* 2002. 11:191-198.
- Venter J.C. et al. "The sequence of the human genome." *Science*, 2001. 292(5523): 1838.
- Wang G. S. et al. "Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy." *J Clin Invest* 2007. 117(10): 2802-2811.
- Wells R.D. "Genetic Instabilities and Neurological Diseases". Elsevier. UK, 2006.
- Wells R.D. et al. "Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases". *NucleicAcidsResearch*, 2005. 33(12):3785-3798.
- www. cdi.gob.mx (Comisión Nacional para el desarrollo de los pueblos indígenas)
- Yang Z, et al. "Replication inhibitors modulate instability of an expanded trinucleotide repeat at the myotonic dystrophy type 1 disease locus in human cells." *Am J Hum Genet* 2003 73(5): 1092-1105.

Zuhlke C. et al "Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): Phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles." *Eur J Hum Genet* 2002. 3:204-209.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a _____ de _____ de 20__

A Quién Corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el proyecto de investigación ‘GENÓMICA DE LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1): **IDENTIFICACIÓN DE GENES CON POTENCIAL TERAPEÚTICO PARA LA DM1 MEDIANTE MICROARREGLOS DE DNA Y ANÁLISIS PROTEÓMICO**’ con número de protocolo 28/09 a cargo del Dr. EN C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE, que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación.

He sido informado que el estudio consiste en la implementación de un mejor método diagnóstico de la Distrofia Miotónica Tipo 1, analizando las alteraciones de los factores hereditarios que producen esta enfermedad. Esto se realiza tomando una muestra de sangre de la vena del brazo para obtener una muestra de mi material hereditario (DNA), existiendo una mínima posibilidad de que se forme un moretón. Tengo el entendimiento que de este estudio se obtendrá como beneficio el desarrollo de mejores formas de diagnosticar la enfermedad y para conocerla mejor, así como para establecer de manera más adecuada el riesgo de transmisión a la descendencia y distinguir entre esta enfermedad y otras enfermedades hereditarias del músculo.

Es de mi conocimiento que este estudio no tiene ningún costo para mí. También se me explicó que es posible que se guarde una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, ya que posteriormente se podría estudiar otros factores que en este momento es imposible analizar y que la información obtenida será confidencial. Así mismo, se me ha explicado que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación y que estoy en libertad de negarme a participar en el estudio, sin que esto modifique la calidad de atención médica que reciba en el Instituto.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR: _____

NOMBRE DEL TESITGO: _____

FIRMA DEL TESTIGO: _____

MÉDICO SOLICITANTE:

FIRMA: _____

RESPONSABLE DEL PROYECTO: **Dr. en C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE**

FIRMA: _____