



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN ETAPAS INICIALES DE
LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1)**

Tesis que presenta

M. EN C. LUZ DEL CARMEN MÁRQUEZ QUIROZ

para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis:

**DR. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE
DR. BULMARO CISNEROS VEGA**

Ciudad de México

Marzo, 2018



Durante la realización de este trabajo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (expediente 257640)

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 y bajo la Asesoría del Dr. Oscar Hernández Hernández



Así como en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN., Unidad Distrito Federal) bajo la dirección del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y bajo la asesoría del Dr. Luis Kameyama Kawabe, Dr. José Efraín Garrido Guerrero, Dr. Jaime García Mena.



Este trabajo fue financiado por los proyectos registrados como PICSA12-162 de la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal y CB-2015-01-258043 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Agradecimientos

Al Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre por su compromiso y entusiasmo en la dirección de este proyecto, mi respeto y admiración por siempre.

A los Dres. Bulmaro Cisneros Vega, Luis Kameyama Kawabe, José Efraín Garrido Guerrero, Jaime García Mena y Oscar Hernández Hernández por sus consejos, apoyo y asesoría para la realización de ésta tesis.

Al equipo de trabajo del Instituto Nacional de Rehabilitación: Investigadores, Médicos, Químicos, Biólogos, Personal administrativo y Estudiantes por su vocación y trabajo en equipo.

A mi familia: mi esposo Cuauhtli, mi hermana Maripaz, mi mamá Luci, mi mamá Lucero y mi abuelo Ramón porque su amor es el motor de mi vida. Los amo.

Un agradecimiento especial a todos los pacientes y sus familias por su colaboración para la realización de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESÚMEN.	9
ABSTRACT.	10
1. INTRODUCCIÓN.	11
1.1 Enfermedades por expansión de microsatélites	11
1.2 Inestabilidad de los Microsatélites.	14
1.2.1 Participación de la maquinaria de reparación MMR en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos.....	15
1.2.2 MUTS β está involucrada en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos.	16
1.2.3 MUTS β promueve la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos mediante la interacción con la DNA polimerasa β en la replicación.....	18
1.2.4 Participación de MUTL α y MUTL γ en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos.....	20
1.2.5 Alteraciones en la recombinación.....	22
1.2.6 Otros mecanismos involucrados.....	23
1.3 Distrofia Miotónica Tipo 1.....	24
1.3.1 Genética de la DM1.....	25
1.3.2 Fenómeno de Anticipación.	26
1.3.3 El papel de los alelos largos en individuos sanos.....	27
1.4 Características clínicas de la Distrofia Miotónica	27
1.4.1 Distrofia Miotónica Congénita.....	28
1.4.2 Distrofia Miotónica Infantil.....	29
1.4.3 Distrofia Miotónica Clásica.....	30

1.4.4 Distrofia Miotónica Tardía o Asintomática.....	31
1.4.5 . Prognosis y marcadores clínicos de Severidad	31
1.4.6 Disfagia como un signo asociado a morbi-mortalidad.	33
1.5 Patogénesis Molecular de la DM1.	35
1.5.1 Pérdida de función de las proteínas MBNL	35
1.5.2 Ganancia de función de CELF1.....	38
1.5.3 Alteraciones en el Splicing Alternativo.....	40
1.5.4 Traducción RAN	42
1.5.5. Desregulación de factores de transcripción.....	44
1.5.6 Desregulación de MicroRNA.....	45
1.6 Búsqueda de Biomarcadores para DM1.	50
1.6.1 Posibles biomarcadores	50
1.6.2 Marcadores bioquímicos de daño muscular	51
1.6.3 miRNAs: Posibles biomarcadores celulares para DM1	52
2. JUSTIFICACIÓN	54
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	55
4. OBJETIVOS.....	57
4.1 Objetivo general.....	57
4.2 Objetivos particulares.....	57
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
5.1 Diagrama de Flujo.....	58
5.2 Sujetos de estudio	59

5.2.1 Estudio Genético-Poblacional en individuos sanos de la población Mexicana	59
5.2.2 Pacientes y sujetos en riesgo para DM1.....	60
5.2.2.1 Pacientes con DM1 (Casos índice y familiares sintomáticos).....	61
5.2.2.2 Familiares Asintomáticos en riesgo	62
5.3 Purificación y cuantificación de DNA	62
5.4 Identificación del número de repetidos CTG en el gen <i>DMPK</i> a través de Electroforesis Capilar.....	63
5.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	63
5.4.2 TP-PCR (Triplet Repeat Primed PCR).....	65
5.6 Determinación del número de repetidos CTG del gen <i>DMPK</i> a través de <i>Small Pool-PCR</i> (SP-PCR)	67
5.7 Evaluación Neuromuscular	71
5.7.1 Escala MIRS (<i>Muscular Impairment Rating Scale</i>).....	71
5.7.2 Dinamómetro de mano.	72
5.7.3 Evaluación electromiográfica de 8 grupos musculares.....	73
5.7.4 Evaluación de la deglución.	73
5.7.5 Análisis de <i>miRNAs</i> como biomarcadores en plasma	74
5.8 Análisis estadístico.....	75
5.9 Consideraciones éticas.....	76
6. RESULTADOS.....	78
6.1 Distribución alélica del número de repetidos CTG en poblaciones mestizo-mexicana y nativo-americana.	78

6.2	Identificación de pacientes con DM1	82
6.2.1	Identificación del número de repetidos CTG en el gen <i>DMPK</i> mediante PCR, TP-PCR a y electroforesis capilar	83
6.3	Selección de individuos en etapas tempranas de la enfermedad (asintomáticos).	86
6.4	Determinación de repetidos CTG mayores a 130 repetidos	88
6.5	Marcadores clínicos iniciales de la patología en musculo esquelético.....	91
6.6	Marcadores clínicos iniciales de la patología en musculo liso	94
6.7	Identificación de biomarcadores moleculares	99
7.	DISCUSIÓN.....	103
8.	CONCLUSIONES.....	118
9.	PERSPECTIVAS.....	119
ANEXO 1	120
ANEXO 2	121
ANEXO 3	122
BIBLIOGRAFÍA	123

RESÚMEN.

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es la distrofia más común en adultos. La enfermedad es causada por alelos que sobrepasan un umbral de aproximadamente 50 repetidos y que pueden llegar hasta 4000 CTGs. La naturaleza inestable de la expansión causa un amplio espectro genotípico y fenotípico. Estudios a nivel mundial sugieren que uno o un limitado número de eventos mutacionales originaron la enfermedad. Sin embargo, la distribución de alelos CTG y la incidencia varía entre diferentes grupos étnicos. Debido a la gran diversidad étnica de la población mexicana, la primera fase del presente estudio fue analizar el impacto de los diferentes linajes sobre la distribución alélica de los repetidos CTG en la población contemporánea Mestizo-mexicana y determinar la posible prevalencia en nuestro país. Se ha descrito que la alta frecuencia de alelos largos normales ($CTG \geq 18$) posiblemente se correlaciona con la incidencia de la enfermedad en diversas poblaciones. Por lo tanto, aunque la prevalencia de la DM1 en población Mexicana es desconocida, la relativa alta frecuencia de alelos largos normales encontrada en Mestizos podría predecir una probable alta incidencia de la enfermedad. De acuerdo con estos resultados, realizamos un extenso análisis molecular en aproximadamente 80 familias Mexicanas con DM1. Los repetidos CTG de 630 individuos fueron caracterizados, encontrando 340 individuos portadores de la mutación, incluyendo un grupo de 16 individuos asintomáticos, que constituyen un grupo importante para describir las etapas iniciales de la enfermedad.

Por otro lado, la edad de inicio y la progresión de la enfermedad es altamente variable, por lo que es una necesidad inmediata la identificación de biomarcadores sensibles/específicos que puedan ayudar al diagnóstico temprano y a mejorar el monitoreo de la progresión de la enfermedad. Debido a que se podrían detectar síntomas iniciales de la DM1 y a que se ha demostrado la expresión de los microRNAs (miRNAs) circulantes en varias enfermedades neuromusculares, podrían ser biomarcadores útiles en la DM1. De forma interesante, encontramos descargas miotónicas neuromusculares atípicas y disfunción orofaríngea en presintomáticos portadores de DM1 con menor severidad que en pacientes con DM1 clásica. Se encontraron diferencias significativas entre los portadores presintomáticos y los controles sanos para la mayoría de las variables de FEES. El reconocimiento de los datos clínicos iniciales de la DM1 ofrece nuevos hallazgos fisiopatológicos de la enfermedad y describe un importante pre-diagnóstico o etapa temprana que promueve el diseño de ensayos clínicos tempranos para prevenir la disfunción de la deglución. Además, identificamos algunos miRNAs que discriminan entre los pacientes de DM1 clásica y de inicio temprano, destacando su utilidad potencial para la vigilancia de la progresión y/o severidad de la enfermedad. Sorprendentemente, demostramos que la señal de dos miRNAs validados (hsa-miR-1 y hsa-miR-132) posee el valor diagnóstico para discriminar entre controles sanos y pacientes. Y la señal de los miRNAs validados (hsa-miR-1 and hsa-miR-140) el valor diagnóstico para discriminar entre portadores asintomáticos y pacientes con DM1 clásicos.

En resumen, los hallazgos clínicos en músculo y en miRNAs se podrían considerar biomarcadores accesibles del estado de la enfermedad y la progresión, y ayudar a identificar nuevos procesos celulares involucrados en DM1.

ABSTRACT.

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common form of muscular dystrophy in adults, it is caused by an unstable CTG repeat expansion in the 3'UTR of *DMPK* gene. Alleles exceeding a threshold of approximately 50 repeats and reaching up to a number of 4000 CTGs result in disease. The unstable nature of CTG expansion causes wide genotypic and phenotypic presentations. Worldwide genetic studies suggest a single or limited number of mutational events originating the disease. However, distribution of CTG alleles and disease incidence varies among ethnicities. Due to the great ethnic diversity of the Mexican population, the first phase of the present study was aimed at analyzing the impact of different lineages in shaping the CTG-repeat allelic distribution in the contemporary Mexican-Mestizo population and determined a possible prevalence in our country. It has been found that high frequency of large normal alleles (CTG \geq 18) positively correlates with the disease's incidence in diverse populations. Therefore, although prevalence of DM1 in the Mexican population remains unknown, the relatively high frequency of large normal alleles found in Mestizos might predict high incidence of the disease. In agreement with these results, we performed an extensive molecular analysis in approximately 80 DM1 Mexican families. The CTG repeats of the 630 identified individuals were characterized, it were found 340 DM1 mutation carriers, including a group of 16 asymptomatic individuals, which are an important group for known the initial stages of the disease.

On the other hand, disease onset and progression is highly variable between patients, thus identification of specific/sensitive biomarkers that can aid in early diagnosis and improve the monitoring of disease progression is an immediate need. Because altered initial symptoms of DM1 could be identified and the expression of circulating microRNAs (miRNAs) has been shown in various neuromuscular diseases, they could be useful biomarkers for DM1. Interestingly, we found a clinical atypical neuromuscular myotonic discharges and oropharyngeal dysfunction in pre-symptomatic DM1 carriers with low severity than DM1 classic patients. Significant differences were found between pre-symptomatic carriers and controls for most FEES variables. The recognition of early features of DM1 offers novel physiopathological insights of the disease, and describing an important pre-diagnostic or early stage that promotes the design of early clinical trials to prevent swallowing dysfunction. In addition, we identified some miRNAs that discriminate between early onset and Classical DM1 patients, highlighting their potential utility to surveillance disease progression/severity. Strikingly, we demonstrated that a signature of two validated miRNAs (hsa-miR-1 and hsa-miR-133) possesses the diagnostic value to discriminate between healthy controls and patients. And that a signature of two validated miRNAs (hsa-miR-1 and hsa-miR-140) possesses the diagnostic value to discriminate between asymptomatic carriers and DM1 patients.

In summary, muscle clinical findings and circulating miRNAs might provide accessible biomarkers for disease stage and progression and help to identify novel cellular processes involved in DM1.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Enfermedades por expansión de microsatélites

En muchos organismos una gran proporción del genoma está formada por secuencias repetidas de DNA, con lo que respecta al genoma humano más de dos terceras partes del genoma está compuesta por varios tipos de regiones repetidas (de Koning, Gu et al. 2011). De manera interesante el 3% del genoma se compone por elementos repetidos en tándem, conocidos como microsatélites o STRs (*por sus siglas en inglés Short Tandem Repeats*), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del genoma y generalmente son altamente polimórficos (Schmidt and Pearson 2016). Estos marcadores se caracterizan por presentar elementos repetidos que van desde mono-nucleótidos hasta hexa-nucleótidos, siendo los di- y tri-nucleótidos los más comunes en el humano (Schmidt and Pearson 2016). El tamaño de los repetidos puede cambiar durante la evolución, por lo que en la mayoría de los casos los organismos han evolucionado desarrollando una serie de mecanismos para prevenir cambios rápidos en el genoma. Interesantemente, los repetidos tri-nucleótido sufren expansiones con mayor frecuencia en comparación con repetidos de otra longitud, estas expansiones cuando se expanden puede llegar a ser muy inestables. Cuando el número de repetidos supera el umbral normal puede comportarse como una mutación capaz de originar alteraciones funcionales y por ende la presencia de diversos procesos patológicos. A la fecha, la presencia de expansiones anormales de repetidos se ha asociado a más de 30 enfermedades neurológicas y neuromusculares (**Tabla 1**), entre los que sobresalen la expansión de repetidos CAG en enfermedad de Huntington, las expansiones CGG en síndrome de X-frágil o la expansión de repetidos CTG en la Distrofia Miotónica Tipo 1 (DM1) (Mirkin 2007, McMurray 2010, Guo, Chen et al. 2017).

Tabla 1. Enfermedades neurológicas y neuromusculares causas por expansión de microsatélites. Modificada de Zhao y colaboradores (Zhao and Usdin 2015).

Tipo de repetido	Enfermedad	Gen	Localización del repetido	Número de repetidos normales	Rango de repetidos patogénicos
CAG	Atrofia dentro rubro-palidoluisiana	<i>ATN1</i>	Exón	7-35	49-93
	Enfermedad de Huntington	<i>HTT</i>	Exón	9-35	36-121
	Atrofia muscular espino-bulbar	<i>AR</i>	Exón	9-34	38-62
	Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA 1)	<i>ATXN1</i>	Exón	6-42	39-83
	Ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA 2)	<i>ATXN2</i>	Exón	14-31	32-200
	Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA 3)	<i>ATXN3</i>	Exón	12-44	52-86
	Ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA 6)	<i>CACNA1A</i>	Exón	4-18	21-33
	Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA 7)	<i>ATXN7</i>	Exón	4-35	37-306
	Ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA 12)	<i>PPP2R2B</i>	5'UTR	7-28	55-78
	Ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA 17)	<i>TBP</i>	Exón	25-42	44-66
CTG	Distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD)	<i>TCF4</i>	Intrón	10-37	>50
	Enfermedad de Huntington like 2 (HDL2)	<i>JPH3</i>	3'UTR	6-28	40-59

	Distrofia Miotónica 1 (DM1)	<i>DMPK</i>	3'UTR	5-38	>50
	Ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA8)	<i>ATXN8</i>	3'UTR	15-37	>74
CGG	FRA7A	<i>ZNF713</i>	Intrón	5-22	68, 72, ~450
	Insuficiencia ovárica primaria asociada a X frágil (FXPOI)	<i>FMR1</i>	5'UTR	<55	55-200
	Síndrome de tremor ataxia asociado a X-frágil (FXTAS)	<i>FMR1</i>	5'UTR	<55	55-200
	Síndrome de X frágil	<i>FMR1</i>	5'UTR	<55	>200
GCC	Síndrome de discapacidad intelectual XE frágil (FRAXE MR)	<i>AFF/FMR2</i>	5'UTR	6-25	>200
GAA	Ataxia de Friedreich (FRDA)	<i>FXN</i>	Intrón	8-33	>90
CCTG	Distrofia Miotónica tipo 2 (DM2)	<i>ZFN/CNBP</i>	Intrón	<30	75-11000
ATTCT	Ataxia espinocerebelosa tipo 10	<i>ATXN10</i>	Intrón	9-32	800-4500
G ₂ C ₂ TG	Ataxia espinocerebelosa 36 (SCA36)	<i>NOP56</i>	Intrón	3-8	1500-2500
G ₄ CC	Esclerosis lateral amiotrófica/Demencia frontotemporal (ALS/FTD)	<i>C9orf72</i>	Intrón	2-22	700-1600
C ₄ GC ₄ GCG	Epilepsia mioclónica progresiva (EPM1)	<i>CSTB</i>	promotor	2-3	30-78

Los repetidos tri-nucleótidos pueden localizarse en regiones codificantes o no codificantes. En el caso de las regiones codificantes, por ejemplo, la expansión de repetidos CAG resulta en un proteína con trectos ricos de

poliglutamina o polialanina, lo que origina proteínas anormales tóxicas para la células y que puede modificar o eliminar su función normal (Di Prospero and Fischbeck 2005). En el caso de las regiones no codificantes, la expansión de trinucleótidos puede causar silenciamiento del gen o productos tóxicos a nivel de RNA. Estos productos pueden acumularse en el núcleo como foci aberrantes y secuestrar proteínas múltiples nucleares (Jain and Vale 2017). Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre la expansión de trinucleótidos, se ha propuesto que todos los repetidos expandibles tienen características estructurales inusuales (Wells, Dere et al. 2005), incluyendo estructuras tallo-asa o cuadrúplex. Estas conformaciones inusuales del DNA pueden influir en las vías metabólicas normales, como son, la replicación y la reparación. De hecho varios estudios han implicado factores metabólicos en la inestabilidad de trinucleótidos, incluyendo la DNA polimerasa y las proteínas reparadoras de mal apareamiento (*mismatch repair, MMR*) (Li 2008, Guo, Chen et al. 2017).

1.2 Inestabilidad de los Microsatélites.

Hace más de 20 años se describió por primera vez la expansión de repetidos inestables, principalmente trinucleótidos, como un nuevo mecanismo de mutación, causante de enfermedades genéticas (La Spada, Wilson et al. 1991). Aunque a lo largo de la historia se han realizado muchos esfuerzos por entender los mecanismos que llevan a la inestabilidad de repetidos aún no se conocen con detalle las vías moleculares involucradas. La expansión anormal puede ocurrir durante diferentes estadios del desarrollo humano, en distintos tipos celulares y llegar a comportarse de forma diferente dependiendo si el alelo expandido es transmitido por el padre o por la madre (McMurray 2010). Sabemos que las involucradas en la inestabilidad son la replicación y la recombinación acopladas a la reparación. A continuación se menciona los principales mecanismos relacionados.

1.2.1 Participación de la maquinaria de reparación MMR en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos.

MMR es un mecanismo de mantenimiento crucial en el genoma cuya principal función es corregir tanto los errores de apareamiento base-base, como los errores inserción-delección generados durante la replicación (Kunkel and Erie 2005, Li 2008). En eucariotes MMR está dirigido a un sitio de corte para la síntesis de una nueva cadena, asegurando una fiel replicación. Se han identificado proteínas clave en el sistema MMR, dentro de las que se encuentran: MutS α (heterodímero MSH2-MSH6), MutS β (heterodímero MSH2-MSH3), MutL α (heterodímero MLH1-PMS2), exonucleasa 1 (EXO1), proteína de unión a DNA de cadena sencilla RPA, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), DNA polimerasa δ (pol δ), factor de replicación C (RFC), y DNA ligasa I (Li 2008).

El procedimiento de reparación MMR puede dividirse en 3 etapas: a) reconocimiento del mal apareamiento; b) escisión; y c) resíntesis (Guo, Chen et al. 2017) (**Figura 1**). La primera etapa involucra el reconocimiento de la región mal apareada por MutS α o MutS β , ensamblaje del complejo de iniciación que contiene MutS α (o MutS β), MutL α y PCNA; y localización de la señal de discriminación de la cadena (por ejemplo, el corte de una sola cadena) que esta al menos a 100 pb de la maquinaria en proceso. Durante la fase de escisión, EXO1 actúa como exonucleasa y remueve la cadena naciente de DNA en el corte distal, esta reacción requiere de MutS α (o MutS β), MutL α y PCNA (Kadyrov, Dzantiev et al. 2006, Guo, Chen et al. 2017). RPA estimula la escisión de DNA por EXO1 y protege el DNA de cadena sencilla de ser cortado por endonucleasas (Zhang, Yuan et al. 2005, Guo, Zhang et al. 2006). Durante la fase de resíntesis la DNA polimerasa δ rellena el espacio que quedó en el DNA de cadena sencilla por la escisión de DNA en una reacción que requiere de

RFC, PCNA y RPA, seguida por el catalizador de unión DNA ligasa I. Por lo tanto MMR es bien conocida por su papel en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Sin embargo, esta vía de mantenimiento del genoma ha sido implicada en promover la inestabilidad de los repetidos de trinucleótidos (Schmidt and Pearson 2016, Guo, Chen et al. 2017).

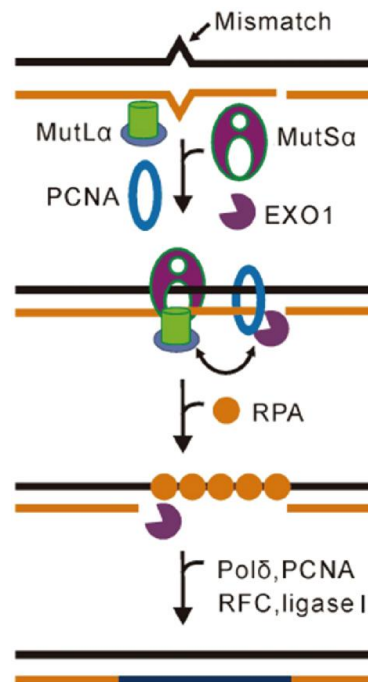


Figura 1. MMR en eucariontes. La reparación MMR inicia con el reconocimiento del mal apareamiento por MutSα o MutSβ (no mostrado), esto desencadena la interacción entre MutSα, MutLα, PCNA y RPA, llevando al reclutamiento de EXO1 a la cercanía del sitio de corte. EXO1 realiza la escisión del corte al sitio de mal apareamiento para generar DNA de cadena sencilla, que es llenado por la DNA polimerasa δ en presencia de PCNA. RFC y RPA, seguido de la unión catalizada por la ligasa I (Guo, Chen et al. 2017).

1.2.2 MUTSβ está involucrada en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos.

Las proteínas de reconocimiento de mal apareamiento MutSα (MSH2-MSH6) y MutSβ (MSH2-MSH3) tienen en común la subunidad MSH2. Normalmente la relación de MutSα y MutSβ en células humanas es 10:1. Debido

a que MSH6 y MSH3 se unen a MSH2 para formar MutS α y MutS β , respectivamente, las concentraciones de MutS α y MutS β en las células depende de los niveles de expresión de MSH6 y MSH3. De manera interesante, al alterar la relación MutS α : MutS β de 10:1 a 1:100, mediante la sobreexpresión de MSH3, se produce un fenotipo mutante, sugiriendo que MutS β a altas concentraciones es mutagénico (Marra, Iacchino et al. 1998). Se ha sugerido que una de las razones es que la sobreexpresión de MSH3 causa la depleción de MutS α en las células, por lo que, no existe mecanismo que regule el mal apareamiento base-base durante la replicación del DNA.

Posteriormente, se descubrió que MutS β tenía el papel de promover la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos. En un ratón transgénico con enfermedad de Huntington los repetidos CAG eran más estables en los ratones deficientes de MSH2 que en los *wild type* (Manley, Shirley et al. 1999). Estudios posteriores mostraron que este efecto se debe a MutS β (pero no a MutS α) debido a que la deficiencia de MSH3, pero no a la deficiencia de MSH6, bloquea la expansión de repetidos en ratones con enfermedad de Huntington y ratones con DM1 (Dragileva, Hendricks et al. 2009, Tome, Manley et al. 2013). Se obtuvieron resultados similares en líneas celulares de enfermedad de Huntington y de DM1 deficientes de MSH2 o MSH3 (Kantartzis, Williams et al. 2012). La participación de MutS β en la inestabilidad de repetidos trinucleótidos ha sido confirmada en diferentes modelos de estudio (Stevens, Lahue et al. 2013, Williams and Surtees 2015, Guo, Chen et al. 2017).

Aunque aún se desconoce cómo es que MutS β promueve la expansión de repetidos, se han propuesto algunas teorías. Al ser una proteína de reconocimiento, MutS β se une a las estructuras tallo-asa formadas por los repetidos, debido a la actividad de ATPasa de MutS β y los homólogos de MutL requieren los componentes corriente abajo de la maquinaria MMR para dar

estabilidad a los repetidos. Se ha propuesto que MutS β promueve la expansión a través de una vía no canónica mediante la inhibición de la remoción de la estructura tallo-asa, que altera la función normal de MutS β en MMR y secuestra la vía de reparación de la estructura tallo-asa, llevando a una expansión de repetidos de trinucleótidos (McMurray 2010, Lang, Coats et al. 2011, Tome, Manley et al. 2013, Guo, Chen et al. 2017). Sin embargo estas conclusiones han sido discutidas por otros estudios. A pesar de la unión específica de MutS β a las estructuras tallo-asa formadas por los repetidos CAG o CTG no se observó inhibición de la reparación cuando se agregaba MutS β a la reacción de reparación, indicando que MutS β no secuestra la reparación del tallo-asa (Tian, Hou et al. 2009). Por lo que se sugiere que MutS β promueve la expansión a través de otro mecanismo (Guo, Chen et al. 2017).

1.2.3 MUTS β promueve la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos mediante la interacción con la DNA polimerasa β en la replicación.

Como ya se ha mencionado, debido a las expansiones de DNA requieren de la síntesis de DNA, la expansión de repetidos de trinucleótidos ha sido asociada tanto a replicación como reparación de DNA. Por lo tanto, es posible que MutS β colabore con la DNA polimerasa para llevar a cabo la expansión. Una posibilidad es que los repetidos en estructura tallo-asa de la cadena recién sintetizada durante la replicación, o de la cadena cortada en la replicación, y que están unidos a MutS β para tener estabilidad, sean usados como iniciadores por una DNA polimerasa de baja fidelidad, llevando a la expansión de repetidos mediante una síntesis de DNA propensa a error.

Para identificar las DNA polimerasas involucradas en las expansiones de repetidos dependientes de MutS β , Chan y colaboradores desarrollaron un modelo de síntesis de DNA *in vitro* utilizando estructuras tallo-asa con repetidos

CAG o CTG (Chan, Guo et al. 2013). En el ensayo *in vitro* de las DNA polimerasas estudiadas, únicamente DNA pol β estimulaba la retención de los tallo-asa CAG o CTG. La polimerasa β es capaz de incorporar nucleótidos en el extremo 3' de la estructura tallo-asa y los productos posteriores se pueden usar efectivamente por la polimerasa δ para continuar la síntesis de DNA, llevando a la retención del tallo-asa y a la expansión de repetidos. Además se demostró que la MutS β recombinante interactúa físicamente con la polimerasa β para estimular el proceso de retención del tallo-asa de repetidos CAG o CTG. Guo y colaboradores también comprobaron esta interacción *in vivo* al observar colocación de MutS β y polimerasa β con los repetidos durante la replicación (Guo, Gu et al. 2016). Estos datos explican porque la polimerasa β se ha implicado en la expansión de repetidos en diversos modelos (Gannon, Frizzell et al. 2012, Lai, Budworth et al. 2016, Guo, Chen et al. 2017).

Con esta información Guo y colaboradores propusieron un modelo para ilustrar el mecanismo molecular mediante el cual MutS β promueve la expansión de repetidos CAG o CTG durante la replicación y/o reparación (**Figura 2**). Los repetidos CAG o CTG forman una estructura tallo-asa por deslizamiento del extremo 3'. Esta estructura puede ser removida por el efecto de exonucleasa 3'→5' de las DNA polimerasas δ o ϵ , que asegura que el número de repetidos permanezca en el número original. Sin embargo, una vez que las células expresan altos niveles de MutS β , la proteína se une preferentemente a la estructura tallo-asa. Esta unión recluta a la polimerasa β al complejo a través de interacciones físicas entre las 2 proteínas. Posteriormente la polimerasa β usa el tallo-asa como iniciador para agregar varios nucleótidos al extremo 3' del tallo-asa, lo que estabiliza a la estructura tallo-asa en la cadena naciente de DNA. Después la DNA polimerasa δ es reclutada al sitio para la síntesis de alta fidelidad y alta procesividad mediante un intercambio de polimerasas (proceso que aún ha sido bien caracterizado (Figura 2) (Guo, Chen et al. 2017).

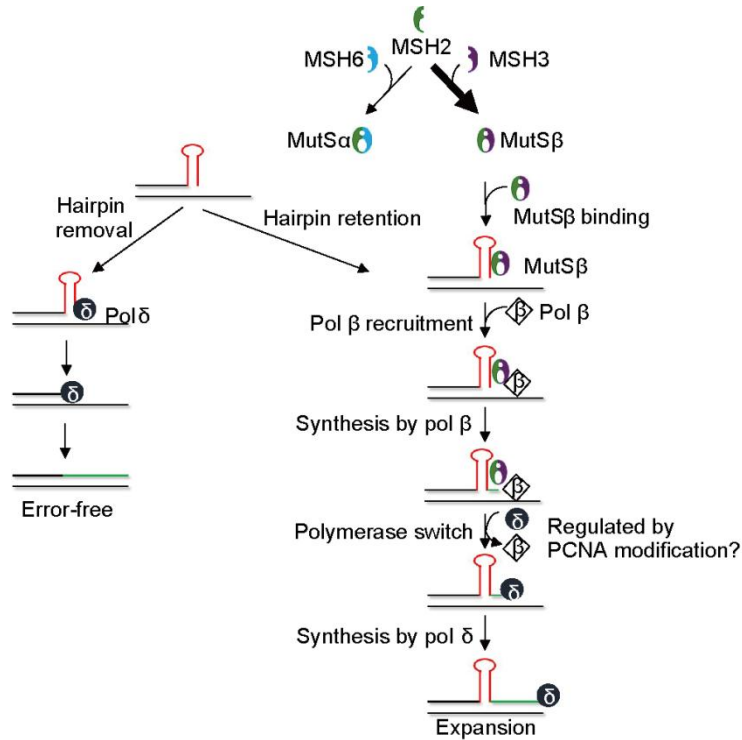


Figura 2. MutS β promueve la expansión de repetidos de trinucleótidos. Durante la síntesis de DNA, las secuencias de repetidos forman estructuras tallo-asa debido al deslizamiento de la cadena. Estos tallos-asa pueden ser removidos por la pimerasa δ (izquierda). Sin embargo, en presencia de niveles altos de MSH3, MSH3 compete con MSH6 por MSH2, llevando a niveles altos de MutS β (derecha). La unión de MutS β al tallo-asa recluta a la polimerasa β al complejo, donde la polimerasa β una el tallo-asa como iniciador para agregar varios nucleótidos al extremo 3' del tallo asa para arreglar esta estructura en la cadena nascente. El tallo-asa contiene productos que pueden ser utilizados por la DNA polimerasa δ de alta fidelidad y alta procesividad (Guo, Chen et al. 2017)

1.2.4 Participación de MUTL α y MUTL γ en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos.

En humanos se han identificado, por lo menos, 4 genes homólogos de MutL: *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* y *PMS2*. La proteína MLH1 forma heterodímeros con PMS2, PMS1 y MLH3 para formar MutL α , MutL β y MutL γ , respectivamente (Li 2008). MutL α es necesaria para la reparación de mal-apareamientos generados durante la replicación y MutL γ juega un papel durante la meiosis, para MutL β aún no se ha identificado un papel específico. De forma interesante, estudios en

modelos animales han implicado a MutL α y MutL γ en la inestabilidad de repetidos de trinucleótidos. Gomes-Pereira y colaboradores descubrieron que PMS2 promovía la expansión de repetidos en un ratón transgénico con DM1, ya que la tasa de expansión somática se reducía un 50% en el ratón *knock out* para PMS2 (Gomes-Pereira, Fortune et al. 2004), lo que sugiere que MutL α también participa en la expansión de repetidos CAG/CTG.

Sin embargo la forma en que MutL α y MutL γ están involucrados en la inestabilidad de repetidos aún no se ha definido completamente. Se ha descrito que MutL α posee actividad de endonucleasa, por lo que es capaz de cortar la cadena nascente de DNA de forma dependiente de MutS α /MutS β , PCNA y RFC. Otro estudio demostró que MutS β reconoce pequeños heterodúplex con inserciones/deleciones en los repetidos y esto activa la función de endonucleasa de MutL α que realiza incisiones en cualquiera de las cadenas. Esto puede llevar a expansión o contracción de repetidos dependiendo cuál de las cadenas es cortada (Guo, Chen et al. 2017).

Es así como la maquinaria MMR normalmente lleva a expansiones o contracciones en las secuencias de repetidos. Además se debe considerar que estos mecanismos de replicación y reparación de DNA se llevan a cabo en un contexto de cromatina. Por lo tanto, la modificación de las histonas y el remodelamiento de la cromatina deben jugar un papel importante en la inestabilidad de repetidos. De hecho hay algunos estudios que han encontrado relación entre cambios epigenéticos y enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Huntington. Los cambios epigenéticos asociados con inestabilidad de repetidos incluyen acetiltransferasas de histonas, DNA metiltransferasa y el factor de transcripción CTCT (Nageshwaran and Festenstein 2015). También se ha propuesto que los inhibidores de la metilación del DNA y de las desacetilasas de histonas tienen un potencial terapéutico en

varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Huntington y ataxias espinocerebelosas (Jakovcevski and Akbarian 2012). Además basado en el hecho de que H2K36me3 es responsable del reclutamiento de MuiS α por MMR (Li, Mao et al. 2013), se ha postulado que otros modificadores de histonas podrían estar involucrados en el reclutamiento de MutS β y otros componentes de la inestabilidad de repetidos (Guo, Chen et al. 2017).

1.2.5 Alteraciones en la 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 del 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 tractos de los 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). No obstante, 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 tractos de repetición (Pearson et al. 2005).

1.2.6 Otros mecanismos involucrados

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

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).

1.3 Distrofia Miotónica Tipo 1.

Dentro de las enfermedades producidas por expansiones anormales de repetidos (conocidas como mutaciones dinámicas), la DM1 se considera como la distrofia muscular más común en adultos a nivel mundial. La DM1 es una enfermedad multisistémica autosómica dominante que se caracteriza principalmente por sus alteraciones neuromusculares como la miotonía y la debilidad muscular progresiva de inicio distal, defectos en la conducción cardíaca, catarata iridiscente posterior y alteraciones endócrinas (Meola and Cardani 2015). En 1909 Steinert y colaboradores describieron por primera vez el fenotipo clásico de la distrofia miotónica la cual fue llamada enfermedad de Steinert (OMIM 160900). Fue hasta el año 2000 cuando el Consorcio Internacional de Distrofia Miotónica recomendó el uso de una nueva nomenclatura y denominó a la enfermedad de Steinert como Distrofia Miotónica tipo 1, ya que se identificaron entidades clínicas semejantes como la distrofia miotónica tipo 2, la cual cursa con un inicio proximal (T. Ashizawa 2000). El gen causante de la distrofia miotónica descrita por Steinert fue descubierto en 1992 y

se encontró que está causada por una expansión inestable del trinucleótido CTG en la región 3' no traducida (*UTR, por sus siglas en inglés*) del gen *DMPK* (OMIM 605377), que codifica para una miosin-cinasa que se expresa principalmente en músculo esquelético (Brook, McCurrach et al. 1992, Fu, Pizzuti et al. 1992, Mahadevan, Tsilfidis et al. 1992).

1.3.1 Genética de la DM1.

Esta distrofia muscular es causada una por la expansión anormal del trinucleótido CTG en el extremo 3'UTR del gen *DMPK* (Dystrophia Myotonica-Protein Kinase) **Figura 3**, localizado en la región cromosómica 19q13.3. El gen está formado por 15 exones y su *splicing* alternativo conduce a la formación de 6 isoformas de la proteína DMPK, con pesos moleculares que van desde los 69 a los 80 kD (Brook, McCurrach et al. 1992, Ashizawa and Sarkar 2011, Planells, Molano et al. 2011). El número de repetidos CTG en el gen *DMPK* en individuos sanos va de 5 a 34, éste número de repetidos generalmente se hereda de forma estable y posee una baja tasa de mutación, además de ser altamente polimórfico (Meola 2013). Los alelos con premutación son aquellos entre 35 y 49 repetidos, estos individuos no presentan manifestaciones clínicas pero pueden tener descendencia con un mayor número de repetidos en un rango de mutación, debido a que poseen una susceptibilidad aumentada para mutar en una transmisión subsecuente, (McMurray 2010). A partir de 50 repetidos se presentan las alteraciones fenotípicas. Desde hace unos años se ha descrito una clara correlación entre el número de repetidos CTG y la edad de presentación de la enfermedad, así como la gravedad de las características clínicas (Gennarelli, Novelli et al. 1996), aunque la presentación de los síntomas es muy variable. La presencia de alelos con un tamaño alrededor de 1000 repetidos CTG y hasta 4000 repetidos se ha asociado con la presentación de la patología en edades tempranas o aún antes del nacimiento.



Figura 3. Localización de los repetidos CTG en el gen *DMPK* (modificada de (Chau and Kalsotra 2015)).

1.3.2 Fenómeno de Anticipación.

La anticipación se define como la predisposición de los repetidos de trinucleótido 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 presentación (McMurray 2010), lo que pueden llevar incluso a formas congénitas de la enfermedad. Las expansiones pueden ocurrir en línea germinal llevando al fenómeno de anticipación a través del paso por múltiples generaciones y también pueden ocurrir de forma somática durante los diferentes estadios del desarrollo humano con cierta preferencia en diferentes tejidos, edades, géneros y tipo de población. Además el grado de expansión somática puede variar entre el mismo tejido (Pearson, Nichol Edamura et al. 2005). Los alelos con premutación tienden a expandirse a mutaciones completas, más frecuentemente durante la transmisión paterna que la materna. Mientras que casi todos los casos de Distrofia Miotónica Congénita fueron originados de madres afectadas, lo que se traduce en una expansión materna de alelos con mayor número de repetidos, sugiriendo un límite de expansión en meiosis paterna que no está presente en meiosis materna (Rimoin and Emery 2007).

1.3.3 *El papel de los alelos largos en individuos sanos.*

Dentro del rango de repetidos en cromosomas de individuos normales es interesante mencionar que se ha descrito que los alelos largos normales con más de 18 repeticiones CTG (18 a 34 repetidos CTG) a pesar de no ser causa de la enfermedad, parecen tener implicaciones a nivel patológico con el paso de mucho tiempo, ya que se consideran como susceptibles a un mayor incremento del tracto de tri-nucleótidos, lo cual origina una 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).

1.4 Características clínicas de la Distrofia Miotónica

La DM1 es la distrofia muscular más frecuente en adultos con una prevalencia estimada de 1 en 8,000 individuos. Los pacientes con DM1 se

pueden clasificar en 4 categorías principales: 1) congénita, 2) de inicio infantil, 3) de inicio en etapa adulta y 4) de inicio tardío/asintomáticos (Meola and Cardani 2015). La DM1 cursa con un fenotipo multisistémico que puede involucrar alteraciones neuromusculoesqueléticas, oftalmológicas, cardíacas, respiratorias, endocrinológicas y cognitivas entre otras, **Figura 4**. A continuación se describen las principales características clínicas presentes en dicha patología.

1.4.1 Distrofia Miotónica Congénita.

La DM1 congénita (CDM) es considerada como la forma más severa de la patología, presenta un fenotipo característico con manifestaciones específicas y por lo tanto no debe ser considerada como un tipo severo o temprano de DM1 clásica (Meola and Cardani 2015). CDM frecuentemente se presenta antes del nacimiento como polihidramnios y disminución de movimientos fetales, lo que puede originar la muerte del feto. Después del nacimiento las principales manifestaciones son debilidad severa generalizada, hipotonía y compromiso respiratorio. La boca en carpa o de “V” invertida se encuentra presente en los niños afectados e indica debilidad facial severa. La mortalidad por falla respiratoria es alta. Los niños que sobreviven a la etapa neonatal presentan una mejoría gradual de la función motora, casi todos los niños con CDM son capaces de caminar. El desarrollo motor y cognitivo está retrasado y todos los pacientes presentan dificultades de aprendizaje y requieren de escuela especial. Al nacimiento pueden presentar atrofia cerebral y dilatación ventricular (Spranger, Spranger et al. 1997). La miopatía progresiva y otras características presentes en la forma clásica pueden presentarse, sin embargo inician hasta la adultez y son lentamente progresivas (Joseph, Richards et al. 1997). De forma característica la miotonía no se encuentra presente en el período neonatal, ni puede detectarse en la electromiografía (EMG). Estos pacientes frecuentemente desarrollan complicaciones cardiorespiratorias entre la tercera y cuarta décadas de la vida (Meola and Cardani 2015).

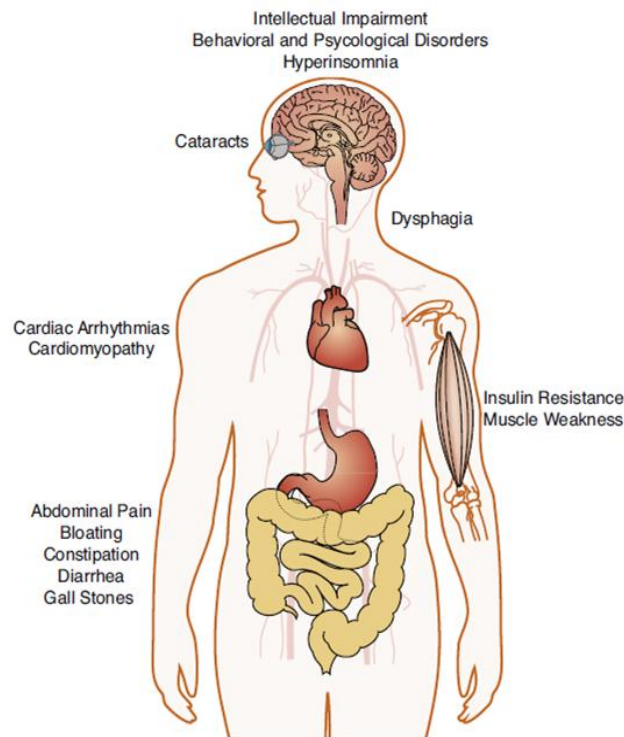


Figura 4. La DM1 es una enfermedad multisistémica que afecta principalmente músculo esquelético, corazón, sistema nervioso central, ojo y aparato digestivo (modificado de (Yum, Wang et al. 2017).

1.4.2 Distrofia Miotónica Infantil.

El diagnóstico de la DM1 de inicio infantil frecuentemente se pasa por alto en niños o adolescentes debido a los síntomas inespecíficos de una distrofia muscular y a la aparente historia familiar negativa. Al igual que las formas congénitas, estos pacientes tienen alteraciones cognitivas y dificultad de aprendizaje, además de que las características degenerativas frecuentemente aparecen en la etapa adulta (Steyaert, de Die-Smulders et al. 2000). Cada vez existe mayor evidencia de que pueden presentar alteraciones de la conducción en etapas tempranas por lo que se recomienda realizar electrocardiograma y estudios de electrofisiología de forma rutinaria (Meola and Cardani 2015).

1.4.3 Distrofia Miotónica Clásica.

En la DM1 clásica considerada como la fase más común de ésta patología, se caracteriza por un inicio en la etapa adulta, debilidad muscular distal que lleva a una dificultad para realizar actividades que requieren movimiento finos de las manos, también presentan debilidad en las extremidades inferiores con afectaciones iniciales a nivel distal. A nivel de facial también presentan debilidad y atrofia muscular que se manifiesta como ptosis palpebral y da lugar a la facies miopática característica. Los músculos flexores del cuello, los dedos y la muñeca también están comúnmente involucrados. Una característica cardinal de esta etapa es la presencia de miotonía con fenómeno de calentamiento que principalmente se observa en las manos pero que también puede afectar músculos de la lengua o músculos faciales causando problemas para hablar, masticar y deglutir. Las alteraciones cardíacas son comunes y se pueden presentar como alteraciones de la conducción, arritmias y bloqueos que contribuyen significativamente a la morbilidad y mortalidad de la enfermedad (Chebel, Ben Hamda et al. 2005). En algunas familias se ha observado miocardiopatía dilatada. A nivel oftalmológico la mayoría de los pacientes presenta catarata subcapsular posterior y algunos pacientes se ha presentado catarata en etapas tempranas sin la presencia de cualquier otro síntoma (Garrott, Walland et al. 2004). A nivel de sistema nervioso central (SNC) se han reportado alteraciones cognitivas e involucro en los estudios de neuroimagen (Bugiardini, Meola et al. 2014). Es común que los pacientes presenten episodios de apnea nocturna e hipersomnolencia durante el día. A nivel gastrointestinal se puede presentar síndrome de colon irritable, cálculos vesiculares sintomáticos y elevaciones de gamma-glutamilttransferasa. Finalmente a nivel endócrino en varones se puede presentar atrofia testicular, hipotestosteronismo y en las mujeres hay un aumento en la hormona folículo estimulante (FSH) y en menor medida de hormona luteinizante (LH), aunado a esto existe un riesgo aumentado

para desarrollar resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Meola and Cardani 2015).

1.4.4 Distrofia Miotónica Tardía o Asintomática.

En cuanto a la DM1 de inicio tardío o asintomática hay poca información disponible. Se ha reportado la miotonía, la debilidad y la hipersomnolencia se presentan raramente. El inicio de la patología se puede presentar en una tercera edad, mostrando como síntomas iniciales la presencia de catarata o síndrome metabólico. Antes de que el estudio genético estuviera disponible hubo casos en donde se asignaba incorrectamente a los portadores, incluso utilizando EMG y examen oftalmológico (Barnes, Hilton-Jones et al. 1994). Por lo que en la actualidad resulta indispensable estudiar a fondo este grupo de pacientes que pueden aportar información sobre la evolución de la enfermedad y las características clínicas presentes en etapas incipientes. Las características principales se resumen en la **Tabla 2**.

1.4.5 . Prognosis y marcadores clínicos de Severidad

Como se describió anteriormente, el aumento en el número de repetidos CTG se ha asociado con mayor gravedad de la patología y la presentación de los diversos fenotipos (**Tabla 2**) (Meola and Cardani 2015). Sin embargo esta correlación no es perfecta, la DM1 es una enfermedad genética considerada como clínicamente variable. Diversos estudios han analizado la presentación de la patología con respecto al número de repetidos CTG, y si bien en la mayoría de los casos el aumento de repetidos coincide con formas de presentación más severa, la correlación lineal con la presentación sintomatológica ha sido muy baja, debido a la alta variabilidad clínica (Kumar, Agarwal et al. 2013).

Tabla 2. Resumen de los diferentes fenotipo presentes en DM1, características clínicas y número de repetidos CTG (modificado de (Meola and Cardani 2015)).

Fenotipo	Características clínicas	Número de repetidos	Edad de inicio
Congénito	Hipotonía, falla respiratoria, dificultad de aprendizaje	>1000	Al nacimiento
Inicio infantil	Debilidad facial, miotonía, coeficiente intelectual bajo, defectos de conducción	50-1000	1-10 años
Inicio en edad adulta "DM1 clásica"	Debilidad, miotonía, cataratas, defectos de la conducción, resistencia a la insulina, falla respiratoria	50-1000	10-30 años
Inicio tardío / asintomático	Miotonía leve, cataratas	50-100	20-70 años
Premutación	Ninguna	38-49	NA

Esto significa que a pesar de que los pacientes con DM1 cuentan con el mismo número de repetidos CTG, las características clínicas difieren entre cada paciente. Estos análisis han sido corregidos mediante la determinación del alelo progenitor, con lo cual la correlación mejora, pero sigue sin ser ideal (Morales, Couto et al. 2012). Esto puede ser causado por la presencia del mosaicismo somático lo que origina variabilidad entre cada paciente o la presencia de genes modificadores que estén involucrados en la aparición de diferentes signos o síntomas. Éste fenómeno provoca que aún con la determinación exacta del número de repetidos CTG no se pueda tener una estimación de la severidad de la patología. Por lo que es ideal realizar la búsqueda de características clínicas que progresen conforme progresa la enfermedad. Para ello es indispensable

analizar los datos clínicos iniciales de la patología, desde etapas pre-sintomáticas para determinar una fase prodromal, y por medio de estudios longitudinales se pueda evaluar la progresión de los mismos para poder dar un seguimiento de la historia natural de la patología. Ante este escenario en diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de parkinson o diversas enfermedades poliglutamínicas, se ha iniciado la determinación de signos prodromales de la enfermedad y su seguimiento para su utilización como marcadores clínicos de severidad de la patología (Storey 2013, Wu, Wang et al. 2013, Velazquez-Perez, Rodriguez-Labrada et al. 2014).

1.4.6 Disfagia como un signo asociado a morbi-mortalidad.

En la búsqueda por encontrar alteraciones características de la patología, se han analizado alteraciones musculares, sin embargo son limitados los estudios de análisis en músculo liso o cardiaco. A nivel de músculo liso, la disfagia se define como la dificultad para pasar alimentos o líquidos de la boca al estómago de manera segura y puede llevar a complicaciones respiratorias y problemas de nutrición (Pilz, Baijens et al. 2014, LaDonna, Koopman et al. 2016). La disfagia constituye una complicación frecuente en individuos con DM1, se ha reportado una prevalencia entre el 25 y 80% de los pacientes (St Guily, Perie et al. 1994, Ronnblom, Forsberg et al. 1996, Bellini, Biagi et al. 2006, Pilz, Baijens et al. 2014).

Los profesionales de la salud consideran a la disfagia un problema particularmente serio en la evolución de la DM1 debido al riesgo de muerte súbita, neumonías y problemas respiratorios que según lo reportado constituyen la principal causa de muerte, ya que representan entre un 31 a 43% de las causas de mortalidad (de Die-Smulders, Howeler et al. 1998, Mathieu, Allard et al. 1999, Turner and Hilton-Jones 2010, Pilz, Baijens et al. 2014). Los individuos

que desarrollan disfagia refieren tos durante la comida, pirosis, dolor precordial, o reflujo (Bellini, Biagi et al. 2006, LaDonna, Koopman et al. 2016).

El diagnóstico de disfagia es complicado y tardío debido a que los pacientes rara vez perciben y/o manifiestan dificultades durante la deglución. De hecho, muchos pacientes con DM1 no reportan datos de disfagia a pesar de tener evidencia sugestiva de alteraciones de deglución (Leonard, Kendall et al. 2001). Pacientes con penetración laríngea, aspiración o aspiración silente tienen 4, 10 y 13 veces más de posibilidades de desarrollar neumonía que los que no tienen trastornos deglutatorios.

Aunque existen diferentes métodos para evaluar la fuerza muscular a nivel de músculos orofaríngeos como la manometría, videofluoromanometría, y electromiografía; la evaluación de la deglución por endoscopía de fibra óptica (FEES por sus siglas en inglés) ha sido descrita recientemente como el método más recomendado para la evaluación de la disfagia debido a su seguridad y eficacia (Langmore, Schatz et al. 1988, Leder and Murray 2008, Pilz, Baijens et al. 2014).

Previamente se ha descrito que la disfagia está presente en etapas tempranas de la DM1, sin embargo, no hay reportes de su presencia previo a la aparición de alteraciones en músculo esquelético (Pilz, Baijens et al. 2014). En el presente trabajo evaluamos la presencia de alteraciones de la deglución en individuos asintomáticos con diagnóstico confirmado de DM1.

1.5 Patogénesis Molecular de la DM1.

A partir del descubrimiento del gen mutado para la DM1 se han propuesto varias hipótesis para explicar la patogénesis de esta enfermedad multisistémica. La expansión del trinucleótido CTG lleva a una ganancia de función del RNA que forma foci ribonucleares debido al secuestro de múltiples proteínas nucleares, lo que produce una disrupción en la actividad normal de las proteínas de unión a RNA pertenecientes a las familias MBNL y CELF (**Figura 5**). Los principales mecanismos involucrados en la patogénesis de DM1 son los cambios en el splicing alternativo, transcripción, traducción, localización y estabilidad del mRNA debido al secuestro de proteínas MBNL y a la sobre-regulación de CELF1. Sin embargo, recientemente se han descrito diversos factores que también participan en esta enfermedad compleja, como son: traducción asociada a repetidos, activación de una vía de señalización dependiente de PKC, poliadenilación aberrante y desregulación de lncRNAs y microRNAs (Chau and Kalsotra 2015).

1.5.1 Pérdida de función de las proteínas MBNL

Las proteínas MBNL son reguladores directos del splicing alternativo. Existen 3 tipos de parálogos MBNL en mamíferos, MBNL1 y MBNL2 que son expresadas en diversos tejidos incluyendo cerebro, corazón, músculo e hígado; mientras que MBNL3 se expresa primariamente en placenta (Kanadia, Johnstone et al. 2003, Kanadia, Urbinati et al. 2003). Experimentos realizados en mioblastos mutantes para DM1 demostraron que MBNL1 está disminuida en el nucleoplasma, posiblemente debido a que se encuentra ampliamente secuestrada en las inclusiones ribonucleares de *DMPK* (Miller, Urbinati et al. 2000). Además, independientemente de la expansión de repetidos, los ratones *knock-outs* para *Mbnl1* reproducen muchas de las características de la

enfermedad, incluyendo miotonía, miopatía, catarata y desregulación del splicing alternativo (Kanadia, Johnstone et al. 2003, Du, Cline et al. 2010). MBNL2 y MBNL3 también colocalizan con los repetidos CUG en los foci, resultando en una pérdida de función de los tres tipos de proteínas (Fardaei, Rogers et al. 2002). También se ha observado que en modelos animales de DM1 en donde se observa el secuestro de MBNL1, la sobreexpresión de esta proteína puede rescatar el fenotipo (de Haro, Al-Ramahi et al. 2006). MBNL1 también juega un papel importante en la proliferación y diferenciación eritroide (Cheng, Shi et al. 2014) y en la supresión de células madre pluripotenciales embrionarias (Han, Irimia et al. 2013, Chau and Kalsotra 2015).

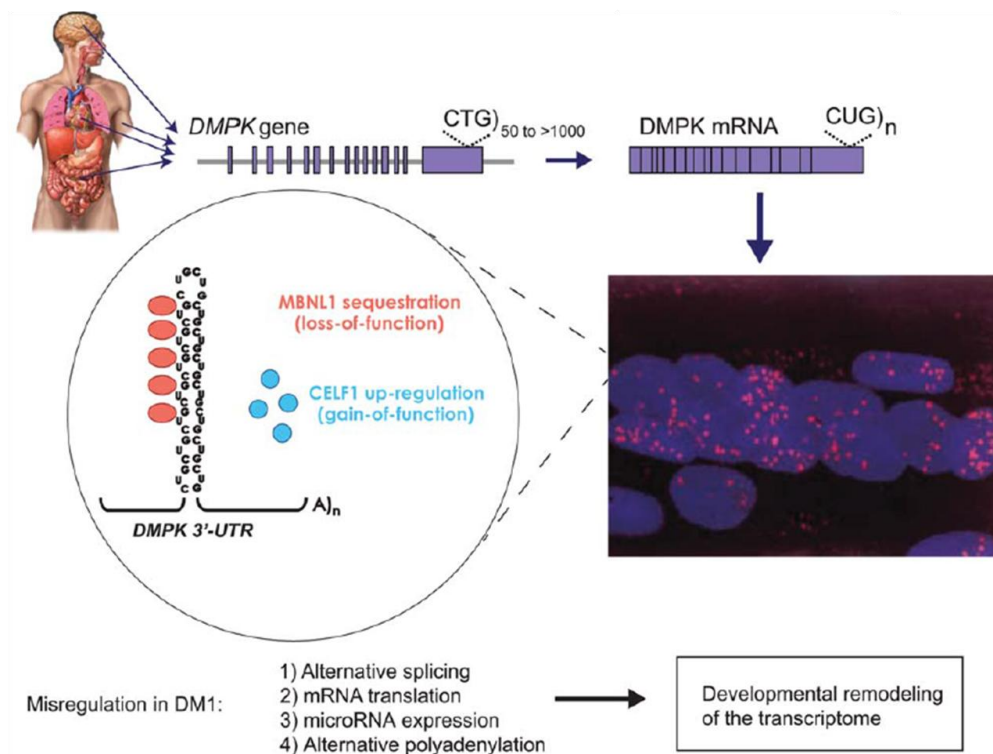


Figura 5. Esquema de la mutación responsable de DM1 y los modelos de patogénesis. La expansión de repetidos CUG en el extremo 3' causa la formación de foci ribonucleares que secuestran MBNL1 y desregulan CELF1. La desregulación de las proteínas de unión a RNA afecta los eventos post-transcripcionales y de traducción (modificado de (Chau and Kalsotra 2015)).

En mamíferos las proteínas MBNL contienen 4 dominios de dedos de zinc en tándem, cada uno compuesto por 3 cisteínas y un residuo de histidina que coordina la unión de los átomos de zinc al RNA de cadena sencilla en forma secuencia-específica (Pascual, Vicente et al. 2006). Inicialmente un estudio mostró que MBNL1 se unía fuertemente a los repetidos CUG, CCUG y CAG (Kino, Mori et al. 2004). Posteriormente estudio bioquímicos y de cristalografía mostraron que MBNL1 reconoce preferentemente motivos YGCY (donde Y sustituye a C o U) ricos en pirimidina (Goers, Purcell et al. 2010).

En humanos *MBNL1* posee doce exones, seis de los cuales sufren *splicing* alternativo, resultando en siete variantes conocidas de MBNL1 (Fardaei, Rogers et al. 2002). Kanadia y colaboradores demostraron que las diferentes isoformas de MBNL1 presentan diferente afinidad a los repetidos CUG del RNA expandido (Kanadia, Urbinati et al. 2003). La inclusión del exón 3 aumenta la afinidad de MBNL1 por los repetidos CUG, mientras que la inclusión del exón 7 potencia tanto la dimerización de MBNL1 como su unión a los repetidos de RNA. Además, el exón 7 es necesario para la localización nuclear de MBNL1 ya que forma parte de una señal de localización nuclear (NLS) (Kino, Washizu et al. 2015). De forma interesante, MBNL1 reprime su propio *splicing* de una forma dosis-dependiente, de tal manera que una disminución en la actividad de MBNL1 resulta en un incremento de la inclusión del exón 7 que lleva a su retención dentro del núcleo. Por otro lado las proteínas MBNL1 también tienen una expresión significativa en citoplasma y pueden regular la estabilidad y localización del mRNA (Osborne, Lin et al. 2009, Masuda, Andersen et al. 2012, Wang, Cody et al. 2012).

También se ha encontrado que MBNL1 y MBNL2 co-regulan ciertos genes blancos, sugiriendo que su función de *splicing* puede ser intercambiable. La presencia de síntomas en DM1 puede variar dependiendo el contexto del

tejido y en la medida en que los niveles de MBNL1 y MBNL2 estén alterados (Lee, Li et al. 2013). Por ejemplo, en el cerebro del ratón *knockout* para MBNL1 se encontraron pocas alteraciones de *splicing* comparadas con los cientos de alteraciones encontradas en músculo esquelético (Suenaga, Lee et al. 2012). Por el contrario la pérdida de MBNL2 en el cerebro dispara la desregulación de cientos de eventos de *splicing* asociados a DM1, resaltando la participación tejido-específica de las isoformas de MBNL y sus efectos en la DM1. Estos hallazgos fueron consistentes con la observación de que MBNL2 tiene una mayor expresión en cerebro que MBNL1 (Kanadia, Urbinati et al. 2003, Chau and Kalsotra 2015).

1.5.2 Ganancia de función de CELF1

CELF1, también llamada proteína de unión a CUG (*CUGBP1*, por sus siglas en inglés), fue descubierta dentro de las proteínas de las células HeLa que se unían a repetidos CUG (Timchenko, Miller et al. 1996). Posteriormente se demostró que CELF1 se une preferentemente a las estructuras tallo-asa de CUG y que su afinidad por el transcrito de *DMPK* no depende del tamaño de los repetidos CUG (Michalowski, Miller et al. 1999). Posteriormente, se demostró que la localización de CELF1 en un modelo para DM1 y en células normales es idéntica, lo que indica que a diferencia de las proteínas MBNL, las proteínas CELF no son secuestradas por la expansión de CUG en el RNA. La sobrerregulación de CELF1 en DM1 ocurre por dos mecanismos independientes: la estabilización de la CELF1 mediante su hiperfosforilación por PKC (Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007) y la disminución de los niveles de miR-23a/b (Kalsotra, Singh et al. 2014), que normalmente suprime la traducción de la proteína CELF1 en tejido cardíaco (Kalsotra, Wang et al. 2010, Chau and Kalsotra 2015).

El aumento en los niveles de CELF1 también contribuye a la patogénesis de la DM1. Su sobreexpresión en músculo estriado provoca defectos en la histología y fisiología que semejan el fenotipo observado en DM1. En corazón y músculo esquelético de ratones con sobreexpresión de CELF1 se observan las alteraciones de *splicing* presentes en pacientes con DM1 (Ho, Bundman et al. 2005). Por otro lado la sobreexpresión de CELF1 en corazón provocó cardiomiopatía dilatada y alteraciones en la conducción, similares a las observadas en el fenotipo cardiaco de DM1 (Koshelev, Sarma et al. 2010). Además, la sobreexpresión específica en músculo esquelético mostró miofibras con núcleos centrales, atrofia de miofibras y alteraciones en el desempeño muscular (Ward, Rimer et al. 2010). Debido a que la pérdida muscular no se observó en los ratones *knockout* para *Mbnl1*, se piensa que la pérdida muscular observada en pacientes con DM1 es consecuencia de una sobrerregulación de CELF1 (Chau and Kalsotra 2015).

Las proteínas CELF comparten dominios en común, incluyendo tres motivos de reconocimiento de RNA (RRMs por sus siglas en inglés) y una región de unión única llamada “dominio divergente”, que separa RRM2 y RRM3 (Ladd, Charlet et al. 2001). Existen seis parálogos de CELF y la mayoría son ampliamente expresados, presentando la mayor expresión en cerebro y músculo esquelético. CELF participa en múltiples eventos de procesamiento de RNA, incluyendo *splicing* alternativo, edición, deadenilación y traducción (Dasgupta and Ladd 2012, Chau and Kalsotra 2015).

LA afinidad de CELF1 por ciertos mRNAs puede ser modulada mediante la vía de fosforilación de AKT o ciclinaD3-CDK4/6 (Salisbury, Sakai et al. 2008). AKT fosforila CELF1 en los mioblastos en proliferación, lo que aumenta la afinidad de CELF1 por el mRNA de ciclinaD1. Durante la diferenciación normal de los mioblastos, ciclinaD3-cdk4/6 fosforila CELF1, que lleva a un incremento

en la interacción de CELF1 con los mRNAs de *p21* y *C/EBPβ*. Los mioblastos de los pacientes con DM1 tienen un incremento en la interacción entre CELF1 y AKT, así como una reducción de los niveles de ciclinaD3-CDK4/6 durante la diferenciación. CELF1 también desestabiliza los mRNAs mediante la unión a los elementos ricos en GU en su extremo 3'UTR (Lee, Lee et al. 2010, Chau and Kalsotra 2015).

1.5.3 Alteraciones en el *Splicing* Alternativo

El *splicing* alternativo permite que múltiples transcritos con funciones potencialmente diferentes se produzcan a partir de un solo gen. Más del 90% de los genes humanos son procesados de esta forma y la mayoría están regulados dinámicamente por el tipo celular o durante una etapa específica del desarrollo. Estas isoformas diferentes pueden impactar considerablemente en las funciones celulares, de tal forma que la regulación del *splicing* alternativo determina la participación de vías fisiológicas específicas (Kalsotra and Cooper 2011). El *splicing* es controlado por las proteínas de unión a RNA (RBP, por sus siglas en inglés) que se unen a los elementos presentes en los pre-mRNAs para ensamblar el spliceosoma. Se han descrito aproximadamente 50 RBPs en mamíferos, muchas de éstas actúan en un tejido o célula específicos. Además, cientos de eventos de *splicing* son sensibles a cambios en los niveles de un solo factor de *splicing* (Kalsotra and Cooper 2011).

Las alteraciones en el *splicing* son un dato cardinal en la patogenia de la DM1. Estos eventos son regulados durante el desarrollo normal y en DM1 llevan a un cambio de las isoformas funcionales en etapa adulta por isoformas embrionarias no funcionales. Es importante notar que estos defectos en *splicing* no son consecuencia de mutaciones en *cis* en los exones o en los sitios de *splicing* que flanquean a los exones, sino que son consecuencia de la actividad

alterada de los factores en *trans* MBNL y CELF, que regulan la transición normal del *splicing* alternativo durante el desarrollo.

Durante la etapa postnatal la pérdida en la actividad de CELF y la ganancia de MBNL son parte del desarrollo normal que facilita el cambio de isoformas embrionarias a isoformas adultas en diversos genes. La actividad de MBNL1 aumenta en el músculo esquelético debido a que cambia su localización, volviéndose más nuclear, mientras que en músculo cardiaco los niveles de proteína aumentan 4 veces durante el desarrollo postnatal (Lin, Miller et al. 2006, Kalsotra, Xiao et al. 2008). En contraste con MBNL1, las proteínas CELF son reguladas a la baja durante el desarrollo postnatal. Esta regulación es mediada por los microRNA que reprimen su traducción (Kalsotra, Wang et al. 2010).

CELF y MBNL regulan el *splicing* durante el desarrollo de forma independiente, de forma sinérgica y de forma antagonista. Estos cambios ocurren como parte de una transición normal de adaptación celular a las necesidades de un órgano maduro. De forma interesante, los motivos de unión a CELF y MBNL tienen un efecto de posición en el *splicing*, de tal forma que la unión corriente arriba del intrón se correlaciona con el salto del exón, mientras que la unión corriente abajo el intrón correlaciona con un aumento en la inclusión del exón (Chau and Kalsotra 2015).

Las alteraciones en la regulación del *splicing* alternativo pueden explicar las manifestaciones multisistémicas presentes en esta enfermedad, ya que se han descrito al menos una docena de genes afectados por este mecanismo que participan tanto en el funcionamiento de músculo esquelético, como de músculo cardiaco y sistema nervioso central, entre otros. Dentro de los genes mejor caracterizados se encuentran: *TNNT2* (Troponina T cardiaca), *IR* (*Insulin receptor*), *MTMR1* (*Myotubularin-related protein 1*), *TNNT3* (Troponina T de músculo esquelético), *RyR* (*Ryanodine receptor*), *SERCA2* (*Sarco-endoplasmic*

reticulum calcium ATPase 2), *CLCN-1* (*Chloride Channel*), *NMDAR1* (*N-metyl-D-aspartate receptor 1*) y *APP* (*Amyloid protein precursor*) (Charlet, Savkur et al. 2002, Kimura, Nakamori et al. 2005, Magana, Leyva-Garcia et al. 2009).

Un ejemplo clave de la desregulación del *splicing* alternativo ocurre en el mRNA de *CLCN1*. La mionía se define como una hiperexcitabilidad del músculo después de una contracción voluntaria, seguida de potenciales de acción repetitivos, rigidez y retraso en la relajación muscular. Este dato cardinal en la DM1 ocurre debido a la alteración de *splicing* del gen que codifica para un canal de cloruro específico de músculo (*CLCN1*), y una reducción en la conductancia de los iones cloruro en el sarcolema (Mankodi, Takahashi et al. 2002). En los pacientes con DM1 el *splicing* aberrante en el transcrito de *CLCN1* incluye al intrón 2 o al exón 7a, los cuales contienen un codón de alto prematuro. Estas isoformas resultan en una reducción severa de la función de la proteína *CLCN1* (**Figura 6**). El *splicing* es regulado tanto por MBNL1 como por CELF1. Por una parte la sobreexpresión de CELF1 en un cultivo celular es suficiente para incrementar la inclusión del intrón 2, mientras que el ratón *knockout* para *Mbn1* presentó mionía y *splicing* aberrante debido al incremento en la inclusión del exón 7a (Lueck, Lungu et al. 2007, Lueck, Mankodi et al. 2007).

1.5.4 Traducción RAN

Este término se utiliza para la traducción no-ATG asociada a repetidos (RAN por sus siglas en inglés), el fenómeno fue descrito por primera vez por Zu y colaboradores en el contexto de ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA8) (Zu, Gibbens et al. 2011), una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de repetidos CTG-CAG en el gen *ATXN8*. Las células que fueron transfectadas con el minigen *ATXN8* que contenía la expansión de repetidos CAG pero sin el codón de inicio canónico ATG inesperadamente produjeron proteínas homopoliméricas de poliglutamina, polialanina y poliserina, en los 3

marcos de lectura (Zu, Gibbens et al. 2011). Estos péptidos homopoliméricos formaron agregados tanto en núcleo como en citoplasma. Debido a que el gen *DMPK* se transcribe de forma bidireccional, la expansión de CUG también realiza traducción RAN (**Figura 6**) que lleva a la producción de una proteína de poliglutamina en pacientes y ratones con DM1 (Nakamori, Pearson et al. 2011, Zu, Gibbens et al. 2011). La eficiencia de la traducción RAN aumenta de forma directamente proporcional al tamaño de los repetidos, y ocurre predominantemente cuando en el RNA se forman estructuras tallo-asa (Cleary and Ranum 2013). Por otro lado, se ha observado que las células con proteínas producidas por traducción RAN presentan un incremento en la tinción de annexina-V, lo que sugiere que estos productos RAN pueden inducir apoptosis (Chau and Kalsotra 2015). Saber cómo y si las proteínas RAN afectan directamente la patogénesis de DM1 mejorará aún más nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que actualmente se centran en la toxicidad del ARN.

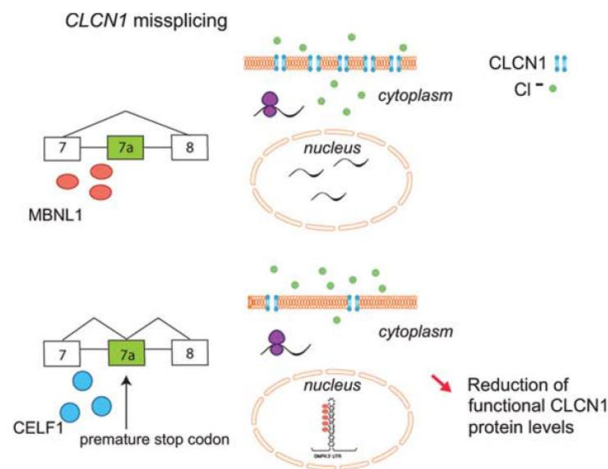


Figura 6. Ejemplo de las alteraciones del *splicing* y sus consecuencias funcionales. La desregulación en el *splicing* de CLN1 lleva a la presencia de un codón de alto prematuro debido a la retención del intrón 2 (no mostrado) y/o del exón 7a. Esto causa una disminución funcional de la proteína CLN1, que se manifiesta como miotonía en los pacientes con DM1.

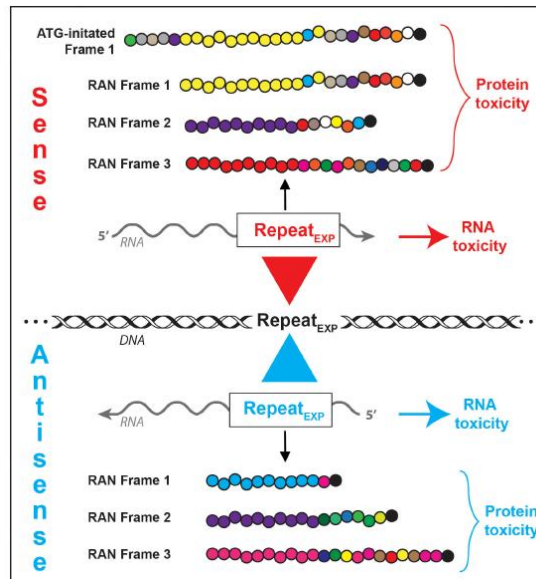


Figura 7. Traducción RAN. El diagrama muestra productos de proteína y RNA potencialmente tóxicos expresados a partir de una mutación de expansión de repetidos, mediante una combinación de transcripción bidireccional y no-ATG asociada a repetidos (modificado de (Cleary and Ranum 2014)).

1.5.5. Desregulación de factores de transcripción

Además del secuestro de proteínas asociadas a splicing alternativo por parte del RNA tóxico, se ha demostrado el secuestro de otras proteínas nucleares que participan como factores de transcripción como MEF2 o SP1 (Meola and Cardani 2015). En reportes previos en un modelo celular de miocitos se demostró que el secuestro de SP1 contribuye a la presencia de miotonía en combinación con la alteración de *splicing* de *CLCN1* (Nakamori, Sobczak et al. 2013).

Por otro lado, a pesar de no ser secuestrado directamente por el RNAm mutante, se ha demostrado que “MyoD” conocido por ser un factor de transcripción clave para la diferenciación muscular presenta niveles proteicos

ampliamente disminuidos (Amack, Reagan et al. 2002). Debido a que los niveles del transcrito de MyoD, la longitud del transcrito y su localización no están afectados en las células con DM1, la reducción de MyoD probablemente se deba a cambios en la eficiencia de traducción o a la estabilidad de la proteína.

Finalmente, el factor de transcripción cardíaco NKX2-5 regula la expresión de genes que son importantes para la adecuada conducción cardíaca. NKX2-5 está sobre-expresado en el corazón y músculo esquelético de los pacientes con DM1 (Yadava, Frenzel-McCardell et al. 2008). La expresión de NKX2-5 correlaciona con la severidad en la patología muscular tanto en pacientes con DM1 como en modelo murino (Gladman, Yadava et al. 2015). La sobre-expresión en cultivos de células C2C12 inhibe la diferenciación miogénica, mientras que en ratón disminuye la fuerza muscular, altera la histopatología muscular y hay un deterioro en la regeneración. Los genes blanco de Nkx2-5, como *Nppb* y *Ankrd1*, se encuentran significativamente regulados a la alta en el ratón transgénico. Además, la haploinsuficiencia de Nkx2-5 tiene un efecto cardioprotector en el ratón que expresa el RNA tóxico, lo que sugiere que NKX2-5 es un modificador de la toxicidad del RNA. Sin embargo, aún no se ha determinado si la regulación incorrecta de los factores de transcripción MEF2, MyoD y NKX2-5 es un evento primario en respuesta a la expresión del ARN expandido y qué mecanismos afectan su expresión normal en DM1 (Chau and Kalsotra 2015).

1.5.6 Desregulación de MicroRNA

Más recientemente se ha postulado un posible papel funcional de los microRNAs en la patogénesis de la DM1. Como se mencionó anteriormente los RNAs que contienen los repetidos CUG mutados forman estructuras secundarias de doble cadena y éstas son susceptibles de ser procesadas por DICER1, dando lugar a cadenas de repetidos cortos (CUG)₇ que regulan a la

baja a sus RNAs complementarios a través de la activación de mecanismos de interferencia de RNA. Además es evidente que la compleja red de mecanismos sinérgicos intervienen en la desregulación del transcriptoma (Suenaga, Lee et al. 2012, Nakamori, Sobczak et al. 2013), lo cual es importante ya que de la misma manera se presenta la desregulación de la expresión de múltiples genes de miRNAs. Estudios recientes, como se puede observar en la **Tabla 3** han identificado diversos miRNAs desregulados en presencia de la patología.

Los cambios en la expresión de los microRNAs en un tejido específico juegan un papel importante en la fisiopatología de DM1. Recientemente se demostró que la acumulación nuclear del RNA con expansión en el corazón del ratón desencadena una disminución en la expresión de un grupo de microRNAs incluyendo *miR-1*, que normalmente se encuentra sobrerregulado durante el desarrollo postnatal (Kalsotra, Singh et al. 2014). En otro estudio se encontró que MBNL1 se une a *pre-miR-1*, que en condiciones normales bloquea la unión a LIN28, una proteína conocida por reprimir la biogénesis de *miR-1* (Rau, Freyermuth et al. 2011). Se ha propuesto que debido al secuestro de MBNL1, LIN28 podría unirse fácilmente e inhibir el procesamiento de *miR-1* en tejidos cardiacos con DM1. Sin embargo, debido a que *miR-1* no presentan cambios en el ratón *knock-out* para *Mbnl1* y debido a que los transcritos primarios de miRNAs están reducidos en paralelo, se ha postulado que su regulación a la baja en DM1 se debe a defectos de transcripción. De hecho, subconjuntos de estos miRNAs son objetivos directos de la familia MEF2 de factores de transcripción, que se encuentran disminuidos en el corazón de pacientes con DM1 y ratones (Kalsotra, Singh et al. 2014). En consecuencia, la disminución en la actividad de MEF2 en tejido cardiaco con DM1 altera la regulación de la vía MEF2-miRNA resultando en una reprogramación global del transcriptoma cardiaco (Chau and Kalsotra 2015).

Fritegotto y colaboradores reportaron muy recientemente la expresión de microRNAs en biopsias musculares de 12 pacientes comparadas contra 6 controles sanos (Fritegotto, Ferrati et al. 2017). Encontraron que en el músculo de pacientes DM1, los niveles de miR-1, miR-133a y miR133b se encuentran significativamente disminuidos, mientras que los de miR-206 están sobreexpresados. MiRNA-1 es miembro del grupo de "miRNAs degenerativos", que pueden ser mediadores críticos de muerte celular y que contribuyen a la pérdida de la miofibra apoptótica/necrótica. Los niveles de miRNA-1 y miRNA-133 en el músculo con DM1 pueden, por lo tanto, ser marcadores del músculo residual. Por otro lado, miRNA-206 pertenece al grupo de "miRNAs regenerativos" y sus niveles en el músculo se pueden utilizar para establecer potencial de regeneración. miR-206 se ha implicado en promover la regeneración de sinapsis neuromuscular y prevenir la atrofia muscular (Fritegotto, Ferrati et al. 2017). De tal forma que estas alteraciones en la expresión de mio-miRNAs en pacientes con DM1 refuerzan la importancia de la regulación a este nivel y su aplicación en el monitoreo de la progresión de la enfermedad y la efectividad en la respuesta a tratamiento de rehabilitación y nuevos fármacos. Estos estudios han llevado a analizar el papel de los miRNAs en la patología de DM1. En los últimos años se han analizado múltiples estudios en los que se han descrito alteraciones en la expresión de múltiples miRNAs tanto en modelos animales como en pacientes con DM1, dichos hallazgos se han descrito a partir de diversos tejidos analizados (Perbellini, Greco et al. 2011, Rau, Freyermuth et al. 2011, Perfetti, Greco et al. 2014, Koutsoulidou, Kyriakides et al. 2015, Fernandez-Costa, Llamusi et al. 2016, Perfetti, Greco et al. 2016, Fritegotto, Ferrati et al. 2017). En la **Tabla 3** se describen los principales hallazgos en pacientes, así como su diseño de estudio.

Tabla 3. Resumen de los diferentes miRNAs estudiados en individuos con DM1

miRNA	Referencia	Tejido analizado	Pacientes	Controles	Expresado a la alta o a la baja
<i>miR-1</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta
	Koutsoulidou A. et al. PLOS ONE, 2015.	Suero	23	23	Alta
	Fritegotto C. et al. Neurol Sci. 2017.	Músculo	12	6	Baja
	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Alta
	Rau F. et al. Nature structural & molecular biology, 2011	Cardiaco	8	11	Alta
<i>miR-133a</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta
	Koutsoulidou A. et al. PLOS ONE, 2015.	Suero	23	23	Alta
	Fritegotto C. et al. Neurol Sci. 2017.	Músculo	12	6	Baja
	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-133b</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta en pacientes femeninos
	Koutsoulidou A. et al. PLOS ONE, 2015.	Suero	23	23	Alta
	Fritegotto C. et al. Neurol Sci. 2017.	Músculo	12	6	Baja
	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Alta
<i>miR-206</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta
	Koutsoulidou A. et al. PLOS ONE, 2015.	Suero	23	23	Alta
	Fritegotto C. et al. Neurol Sci. 2017.	Músculo	12	6	Alta

	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Alta
<i>miR-335</i>	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Alta
<i>miR-193b</i>	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-191</i>	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-140-3p</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta
	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-454</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta
	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-574</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Alta
	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-885-5p</i>	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-886-3p</i>	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Alta
<i>miR-29b</i>	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Baja
<i>miR-29c</i>	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Baja
<i>miR-33</i>	Perbellini R. et al. Neuromuscular Disorders, 2011.	Músculo	15	14	Baja
<i>miR-27b</i>	Perfetti A. et al. Specific reports, 2016.	Plasma o suero	103	111	Baja
	Perfetti A. et al. Neuromuscular Disorders, 2014.	Plasma	36	36	Baja
<i>miR-103</i>	Fernández-Costa J. M. et al. PLOS ONE, 2016.	Suero	26	22	Sin cambios
<i>miR-107</i>	Fernández-Costa J. M. et al. PLOS ONE, 2016.	Suero	26	22	Sin cambios

<i>miR-21</i>	Fernández-Costa J. M. et al. PLOS ONE, 2016.	Suero	26	22	Sin cambios
<i>miR-29a</i>	Fernández-Costa J. M. et al. PLOS ONE, 2016.	Suero	26	22	Sin cambios
<i>miR-30c</i>	Fernández-Costa J. M. et al. PLOS ONE, 2016.	Suero	26	22	Sin cambios
<i>miR-652</i>	Fernández-Costa J. M. et al. PLOS ONE, 2016.	Suero	26	22	Sin cambios

1.6 Búsqueda de Biomarcadores para DM1.

1.6.1 Posibles biomarcadores

Desgraciadamente, la DM1 es una enfermedad incurable, aunque actualmente a través de los avances en la biología molecular se puede detectar la presencia de la mutación por diversas técnicas, lo cual beneficia al tratamiento de las complicaciones sintomatológicas de la enfermedad. Sin embargo, la variabilidad genética entre cada individuo hace imposible conocer el pronóstico de la patología con el simple hecho de cuantificar el número exacto de repetidos, esto aunado al alto grado de mosaicismo somático, lo que produce también alta variabilidad genética en un mismo individuo. Esto complica en gran medida poder conocer y predecir el comportamiento de la enfermedad, por lo que ha sido importante identificar posibles marcadores de progresión clínica, con lo que se pueda dar un seguimiento de la historia natural de la enfermedad y por consiguiente tener marcadores para analizar la progresión de los pacientes ante una intervención terapéutica. La FDA describe como biomarcador a una característica que es medida objetivamente y evaluada como un indicador de

procesos biológicos, procesos patológicos o como respuesta a una intervención terapéutica. Esto en una primera etapa ha llevado a la búsqueda de signos iniciales de la enfermedad que puedan modificarse ante el avance de la patología y posteriormente encontrar biomoléculas que pudieran ser usadas como marcadores específicos para la DM1, ya sea a nivel bioquímico, celular, proteico o en el área de las diversas OMICS, como la transcriptómica, epigenómica o metabolómica.

1.6.2 Marcadores bioquímicos de daño muscular

En la búsqueda de datos más objetivos y cuantificables se han incluido valoraciones paraclínicas como los análisis bioquímicos que ayudan a determinar presencia de inflamación y degeneración de fibras musculares que pudieran orientar hacia la patogénesis de la enfermedad, en este caso a una distrofia muscular.

Éstas pruebas pueden incluir desde proteína C reactiva, hasta enzimas como creatinina cinasa (CPK), lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa o aldolasa. Es bien sabido que estos indicadores bioquímicos pueden estar elevados cuando hay daño muscular, sin embargo no son específicos de distrofias musculares y menos aún de DM1, debido a que pueden estar elevados durante diferentes procesos que van desde haber realizado ejercicio, hasta traumatismos, quemaduras, embarazo, convulsiones recientes, miosis, dermatomiositis, polimiositis, infecciones en músculo, etc.

Además se ha reportado que incluso en individuos ya diagnosticados con DM1 con afectación muscular, las determinaciones enzimáticas pueden salir normales o ligeramente elevadas, por lo que no son un buen marcador de vigilancia y/o progresión de la enfermedad. Al parecer el daño crónico a nivel muscular puede ser la causa de no detectar cambios importantes como lo es en

una alteración muscular aguda, y aún cuando se muestran alteraciones no se ha podido correlacionar con severidad o fenotipos específicos de la DM1.

1.6.3 miRNAs: Posibles biomarcadores celulares para DM1

La identificación de biomarcadores es indispensable para monitorear enfermedades crónicas y progresivas; para que sea un buen marcador de ser un dato objetivo, cuantificable, que no sea invasivo y que realmente refleje la fisiopatología en evolución. Es por eso que en los últimos años se han propuesto a los microRNAs como posibles biomarcadores en distintas patologías incluyendo las distrofias musculares.

Se ha visto que los cambios en la expresión de los microRNAs podría ser un reflejo de lo que está ocurriendo en un tejido específico. A diferencia de otros marcadores celulares, los miRNAs son muy estables y pueden viajar desde su sitio de producción hasta torrente sanguíneo sin ser degradados, por lo que pueden ser analizados de manera no invasiva. Los mecanismos más frecuentes de migración son el uso de exosomas, la unión a diversas proteínas como argonauta y la unión a lipoproteínas de baja densidad (Koutsoulidou, Photiades et al. 2017). Muy recientemente Koutsoulidou y cols. identificaron que los miRNAs principalmente alterados en músculo , miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-206, se encuentran asociados a exosomas y que estos pueden ser biomarcadores moleculares útiles en el monitoreo del proceso de pérdida muscular en pacientes con DM1 (Koutsoulidou, Photiades et al. 2017).

En este sentido resulta indispensable determinar que grupo de miRNAs son los más informativos en las diferentes etapas de la DM1. Perfetti y colaboradores analizaron la expresión de miRNAs en plasma de 36 individuos con DM1 y 36 controles, encontrando que *miR-133a*, *miR-454*, *miR-574*, *miR-193b*, *miR-191* y *miR-886-3p* se encontraban sobre-expresados, mientras que

miR-27b se encontraba regulado a la baja (Perfetti, Greco et al. 2014). Más recientemente Koutsoulidou y cols. encontraron sobre-expresados en suero *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, y *miR-206* (Koutsoulidou, Kyriakides et al. 2015).

Posteriormente en un estudio más amplio en donde se puso especial atención a los detalles para el manejo de las muestras y la selección de los pacientes y controles, Perfetti y cols. corroboraron los cambios en miRNAs previamente estudiados, con lo que acotaron como posibles biomarcadores a un grupo de ocho miRNAs que resultaron alterados en plasma, dentro de los que se encuentran *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-206*, *miR-140-3p*, *miR-454* y *miR-574* regulados a la alta y *miR-27b* regulado a la baja (Perfetti, Greco et al. 2016). Más recientemente Fritegotto y colaboradores analizaron cambios en la expresión de cuatro miRNAs a nivel de fibra muscular y su correlación con características morfológicas histopatológicas, de tal forma que refuerzan la desregulación encontrada en *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b* y *miR-206*, siendo en esta ocasión *miR-206* el único regulado a la alta (Fritegotto, Ferrati et al. 2017). La búsqueda de biomarcadores no invasivos para el monitoreo de la progresión de la DM1, así como de la determinación del posible estadio de la enfermedad y la vigilancia de la respuesta a posibles tratamientos resulta de primordial importancia en el manejo y pronóstico de estos pacientes. Es relevante que su uso podría ser de gran importancia para analizar la progresión de la DM1, sin embargo son necesarios más estudios en diversas etapas de la patología, incluso en etapas tempranas con lo cual se pudiera comprobar el comportamiento y la utilidad de dichos biomarcadores.

2. JUSTIFICACIÓN

La DM1 es la distrofia muscular más frecuente en adultos a nivel mundial, es una enfermedad altamente discapacitante, por lo que es importante un seguimiento y tratamiento paliativo adecuado, ya que es considerada como una patología que hasta la fecha no presenta cura. Las enfermedades producidas por expansiones de tripletes repetidos y en especial la DM1, presentan una alta variabilidad tanto en incidencia como en prevalencia entre diversas poblaciones y zonas geográficas, sin embargo actualmente en poblaciones latino-americanas y específicamente en nuestro país no se tienen datos epidemiológicos que nos lleve a elucidar su frecuencia. A la fecha no conocemos la gravedad del problema en nuestra población, lo que origina que los pacientes no sean tratados adecuadamente. Además, al ser una enfermedad crónico-degenerativa la gravedad de la patología va incrementándose con el paso del tiempo. Desgraciadamente, los datos clínicos no son suficientes para determinar la prognosis de la enfermedad debido a la alta variabilidad clínica entre los pacientes. Por lo que es importante, desarrollar marcadores objetivos para analizar la historia natural de la enfermedad y que sean sensibles para valorar la evolución de la patología, lo cual es determinante para poder realizar estudios clínicos para el tratamiento de la enfermedad.

En la búsqueda de marcadores adecuados, es necesario determinar posibles biomarcadores clínicos o moleculares que se vean afectados desde las etapas iniciales de la enfermedad, por lo que el estudio en etapas pre-sintomáticas es indispensable para valorar los aspectos iniciales de la patología. El conocimiento y la detección temprana de las manifestaciones patológicas, permitirá prevenir y manejar las complicaciones propias de la DM1, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Así mismo, la detección de marcadores óptimos, serán clave para analizar el seguimiento de la patología con lo que es posible evaluar con mayor certidumbre procedimientos terapéuticos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente trabajo tiene como pregunta de investigación: ¿es posible determinar marcadores clínicos y moleculares en etapas iniciales de la DM1 que puedan ser utilizados como marcadores objetivos para el seguimiento de la enfermedad?

Para lograr responder la pregunta de investigación el proyecto se dividió en 2 fases fundamentales:

Fase 1: En esta primera etapa se planteó determinar si es factible en nuestra población identificar portadores de la mutación que aún no presentaran los signos clásicos de la patología (sujetos pre-sintomáticos). Como primer paso se realizaron estudios de genética poblacional para determinar si en México podría existir un alto número de pacientes, identificando la presencia de alelos largos normales en la población general mestizo-mexicana, dichos alelos se han utilizado como un marcador sugerente de prevalencia. El estudio poblacional nos permitió determinar la posibilidad de encontrar una cohorte grande de pacientes mexicanos con DM1, lo que nos llevó a identificar el origen de la mutación en nuestra población. Posteriormente, se analizaron una cohorte de pacientes índice con características clínicas para DM1 y se confirmó la presencia de repetidos CTG expandidos en el gen DMPK a través de diagnóstico molecular. De cada paciente se realizó un estudio familiar, genotificando a los individuos de riesgo a través de análisis molecular (familiares de primer y segundo grado) con la finalidad de reclutar el mayor número de pacientes y buscar individuos portadores de la mutación que aún no presentaran las características clínicas para DM1. Para el grupo de probables portadores sin características clínicas se confirmó que reunieran las características que por definición son considerados como portadores asintomáticos.

Fase 2: Como segunda fase del proyecto, se evaluaron clínica y molecularmente a cada portador. Para este punto se analizó un grupo de individuos sanos pareados en edad y género con nuestro grupo de portadores presintomáticos, de manera paralela se analizó un grupo de pacientes con DM1 clásica como patrón de referencia clínica. Debido a que las principales características de la DM1 se presentan a nivel muscular, se realizó un análisis a nivel de músculo esquelético para determinar alteraciones neurofisiológicas, a su vez se analizaron alteraciones de músculo liso mediante la determinación de deficiencias orofaríngeas a través de fibroendoscopia, con la finalidad de encontrar marcadores clínicos asociados a la presencia de la enfermedad. Finalmente, se analizó si existían alteraciones en la regulación de miRNAs a nivel plasmático de algunos miRNAs de relevancia funcional a nivel de músculo esquelético y se confirmó si había una expresión diferencial comparando los tres grupos de estudio, para la búsqueda de un marcador molecular para daño en DM1. Lo que nos permitió comprender como se comporta la patología en etapas prodromales e identificar posibles biomarcadores moleculares en la evolución de la misma, que serán de gran relevancia como posibles indicadores de procesos biológicos, progresión de la enfermedad, evolución activa, estadio o como respuesta a una intervención terapéutica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar las primeras manifestaciones clínicas musculares en individuos en etapas tempranas de DM1 e identificar posibles biomarcadores en la evolución de la misma.

4.2 Objetivos particulares

- Analizar clínica y molecularmente una cohorte de pacientes a través de la identificación de casos familiares.
- Identificación de individuos en etapas tempranas de la enfermedad (asintomáticos).
- Caracterización molecular de los repetidos CTG el gen *DMPK* en los sujetos de estudio.
- Evaluación detallada a nivel de músculo esquelético y músculo liso para la determinación de marcadores clínicos iniciales de la patología
- Identificación de biomarcadores moleculares.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diagrama de Flujo



5.2 Sujetos de estudio

5.2.1 Estudio Genético-Poblacional en individuos sanos de la población Mexicana

En el abordaje inicial del protocolo se realizó la determinación de frecuencias alélicas en 2 grupos: A) 638 individuos mestizo-mexicanos no relacionados, con una edad media de 34.56 ± 14.68 años y distribución de género 52.98% masculinos y 47.02% femeninos. Este grupo incluyó muestras del norte de México (Coahuila $n=113$), del centro (Ciudad de México $n=257$ y Querétaro $n=202$) y del suroeste (Michoacán $n=66$). Cabe mencionar que se considera mestizo-mexicano a aquel individuo nacido en México con apellido derivado del español y con ancestros nacidos en México de 3 generaciones atrás; B) Población nativo-americana formada por 561 individuos no relacionados provenientes de 10 etnias diferentes, distribuidos de la siguiente forma: Yaquis ($n=32$); Tarahumaras ($n=74$); Pames ($n=85$); Nahuas-Xochimilco ($n=78$); Nahuas-Morelos ($n=31$); Mayas ($n=90$); Totonacas ($n=46$); Popolucas ($n=34$); Zapotecas ($n=46$), y Mixes ($n=45$), **Figura 8**. El grupo constituido por amerindios cumplieron ciertos requisitos como el haber nacido en la misma comunidad y hablar la misma lengua nativa que sus padres y abuelos. Es de importancia mencionar que todos los sujetos pertenecientes a grupos étnicos presentaron influencia nativo-americana (Ancestría amerindia) mostrando un $95 \pm 5.7\%$, constatado por análisis de microarreglos a través del arreglo SNP array 6.0 (Affymetrix Santa Clara, CA, USA) conforme a lo reportado por Contreras-Cubas C (Contreras-Cubas, Sanchez-Hernandez et al. 2016).

Todos los sujetos cumplieron con las normas éticas internacionales, firmaron carta de consentimiento informado, y forman parte de un proyecto aceptado por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación con número 28/09.

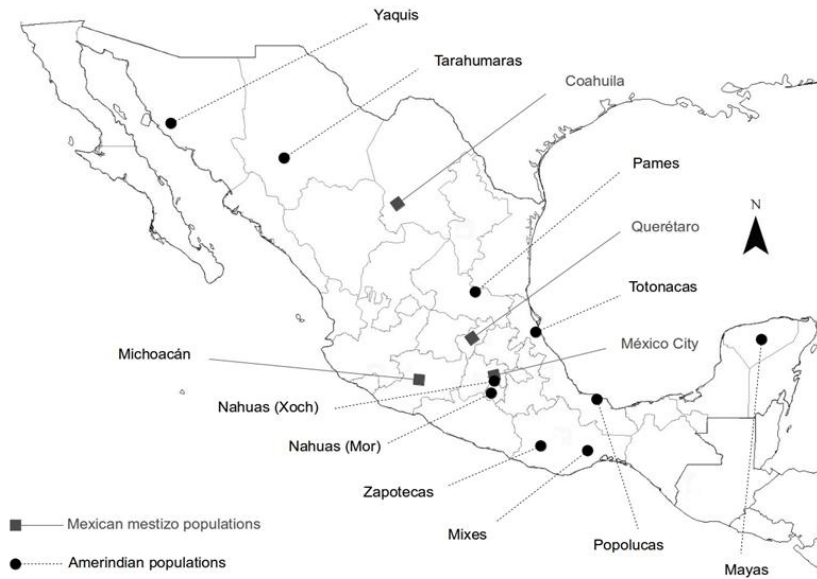


Figura 8. Distribución geográfica de las poblaciones mestiza y nativo-americana. Los cuadrados indican el origen de la población mestiza y los círculos los 10 grupos étnicos correspondientes a población nativo americana tanto del norte, centro y sur de la República Mexicana.

5.2.2 Pacientes y sujetos en riesgo para DM1

A partir de la captación de individuos de cualquier sexo y edad con probable diagnóstico de Distrofia Miotónica Tipo 1 en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) o referidos de otros institutos de salud y hospitales de alta especialidad de la zona centro del país. A cada individuo se le realizó una exploración física y una valoración clínica inicial que incluye la elaboración de una historia clínica completa que obligatoriamente debe incluir un árbol genealógico de al menos 3 generaciones (**Anexo 1**), así como estudios paraclínicos para la determinación de descargas miotónicas a través de la Clínica de Distrofias del INR. Posteriormente, en caso de presentar un patrón de herencia autosómico dominante, así como características clínicas compatibles para DM1 se realizó el estudio molecular confirmatorio para dicha patología. A

partir de la identificación de los casos índice, se reclutaron a los familiares de primer, segundo y tercer grado (individuos en riesgo) para determinar la presencia o ausencia de la expansión anormal de repetidos CTG en el gen *DMPK*. La captura de todos los sujetos de estudio se realizó de manera voluntaria y con previa firma de una Carta de Consentimiento Informado (**Anexo2**). El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del INR con número de registro 28/09.

Después de confirmado el diagnóstico, los pacientes recibieron asesoramiento genético por un médico genetista certificado y fueron sometidos a una valoración multidisciplinaria por especialistas expertos en Rehabilitación, Neurología, Oftalmología, Cardiología, Audiología, Foniatría y Otoneurología del INR. A continuación se describen los criterios de selección para pacientes y familiares de DM1.

5.2.2.1 Pacientes con DM1 (Casos índice y familiares sintomáticos)

Criterios de Inclusión: Todos aquellos individuos con fenotipo compatible con DM1, caracterizado por facies características, presencia de miotonía, debilidad y atrofia progresiva del músculo esquelético, así como por la determinación de descargas miotónicas a través de un sistema de electromiografía (*Nicolet Viking IV EMG Unit, Nicolet Biomedical, Madison USA*).

Criterios de exclusión: Todos aquellos pacientes con otro tipo de distrofias, por ejemplo miotonía congénita, miopatías congénitas, atrofia muscular espinal tipo 1 y 2, atrofia muscular espinal con problemas respiratorios (SMARD1), síndrome de Möebius o desórdenes cerebrales primarios como daño cerebral por anoxia.

Criterios de eliminación: Todos aquellos casos en los cuales no fue posible realizar el 100% de los procesos requeridos en la investigación.

5.2.2.2 Familiares Asintomáticos en riesgo

Criterios de Inclusión: Familiares de primer y segundo grado en riesgo de heredar la mutación identificados por árbol genealógico asintomáticos o con sintomatología dudosa compatible con 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: Todos aquellos casos en los cuales no fue posible realizar el 100% de los procesos requeridos en la investigación.

5.3 Purificación y cuantificación de DNA

A partir de cada individuo en estudio se obtuvieron 5 ml de sangre periférica en un tubo Vacutainer con EDTA como anticoagulante. La extracción de DNA se realizó a partir de los leucocitos a través del *kit* de purificación GENTRA PUREGENE (Qiagen, Duesseldorf, Germany), siguiendo el siguiente procedimiento:

Las muestras de sangre se centrifugaron a 400g por 10 minutos, se aisló la fase de los leucocitos (localizada entre los eritrocitos y el plasma) y se colocaron en un tubo de 1.5ml. Se adicionaron 750µl de solución lisis de células rojas RBC (*Red Blood Cells*) y se homogenizó en agitación intensa empleando un vórtex, posteriormente se centrifugó a 1,400g durante 30 segundos y se decantó el sobrenadante evitando eliminar el botón. A la pastilla se le adicionó nuevamente 750µl de solución lisis de células rojas RBC, se mezcló con ayuda de un vórtex aproximadamente 15 segundos y se centrifugó a 1,400g durante 30 segundos, se decantó el sobrenadante evitando eliminar el botón. La pastilla se resuspendió con 300-400µl de solución de lisis de células blancas CLS (*Cell*

Lysis Solution) a través de agitación intensa en vórtex por un tiempo aproximado de 15 segundos. Se colocó en baño María a 37°C por el tiempo necesario para homogenizar el producto y se adicionó 150µl de *Puregene Proteinase K* mezclando con ayuda de un vórtex. La mezcla fue centrifugada a 13,000g/5 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se le adicionó un volumen de 700µl de isopropanol a una temperatura de 4° C y agitó hasta formar un botón. Posteriormente se centrifugó a 13,000g durante 4 minutos, se decantó el isopropanol, quedándonos únicamente con el botón de DNA, se agregó 700µl de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000g durante 4 minutos, repitiendo este paso no lo menos de 2 veces. Se decantó y dejó secar el botón de DNA a temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas y se hidrató el DNA con 120 µl de agua inyectable. Una vez hidratado el DNA se llevó a cabo su cuantificación por el método espectrofotométrico empleando un 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 total de dsDNA, se tomó una alícuota para preparar una solución de DNA con una concentración final de 40 ng/µl.

5.4 Identificación del número de repetidos CTG en el gen *DMPK* a través de Electroforesis Capilar

5.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de los repetidos CTG del gen *DMPK* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando un par de oligonucleótidos que flanquean los repetidos CTG. 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), **Figura 9**.



Figura 9. Representación y secuencia de los primers utilizados en la determinación del número de repetidos CTG.

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 6 μ L con 15ng de DNA humano; 0.38 μ M de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada dNTP; 0.6 μ L de la solución amortiguadora de reacción 10x (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger), 2mM de MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger), 0.5 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger) y 31% de betaína (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Ger). La reacción de PCR constó de 36 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 94°C por 60s, la hibridización a 58°C por 60s y la polimerización a 72°C por 90s.

Posteriormente, una alícuota de la reacción de PCR se mezcló con formamida desionizada y una alícuota del marcador de peso molecular interno (ABI GeneScan-500 TAMRA) el cual es indispensable para la asignación del tamaño de los fragmentos debido a que realiza una curva patrón de pesos moleculares conocidos y dependiendo de la migración del fragmento analizado se le determina un peso específico y por consiguiente un número exacto de repeticiones. Enseguida, la mezcla se calentó a 95°C por 7 min y se transfirió inmediatamente a hielo por 5 min. Las muestras se analizaron por medio de electroforesis capilar en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando una temperatura constante (60°C), un voltaje de 15 kV y un tiempo de corrida de 24 min **Figura 10**). Para el análisis de los alelos y la genotipificación se empleó el programa GeneScan.

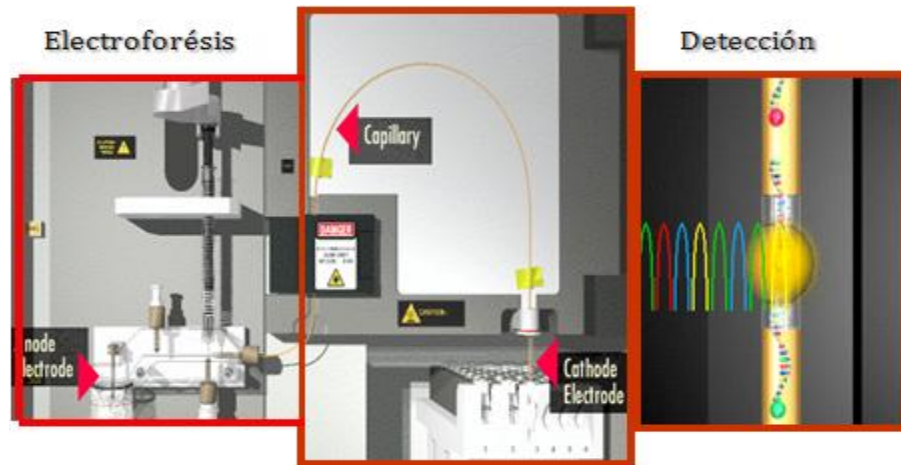


Figura 10. Asignación de peso molecular en la Electroforesis Capilar. Los fragmentos migran por peso y carga a través del capilar, al pasar por el láser se excita el fluoróforo y se detecta el tamaño del fragmento.

5.4.2 TP-PCR (*Triplet Repeat Primed PCR*)

Debido a la limitación en la determinación de alelos con expansiones por encima de 100 repetidos CTG a través de PCR, es necesario modificar esta técnica, mediante el uso de otros oligonucleótidos dirigidos a los repetidos CTG para poder evaluar la presencia o ausencia de expansiones anormales por encima de 100 repetidos CTG.

Se emplearon 3 oligonucleótidos para la PCR: El oligonucleótido sentido marcado fluorescentemente (previamente descrito como P1); P3R 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3' y un oligonucleótido quimérico P4CTG 5'-TACGCATCCGAGTTTGAGACGTGCTGCTGCTGCTGCT-3' conforme a lo reportado por Magaña y colaboradores (Magaña, Cortes-Reynosa et al. 2011). La especificidad en la amplificación es asegurada por el oligonucleótido de secuencia específica P1, mientras que el primer con la secuencia de repetidos amplifica a partir de múltiples sitios de unión dentro de la región de repetidos, en

tanto que el tercer primer reamplifica los segmentos previamente sintetizados de tal forma que aumenta la eficacia de la PCR (**Figura 11**).

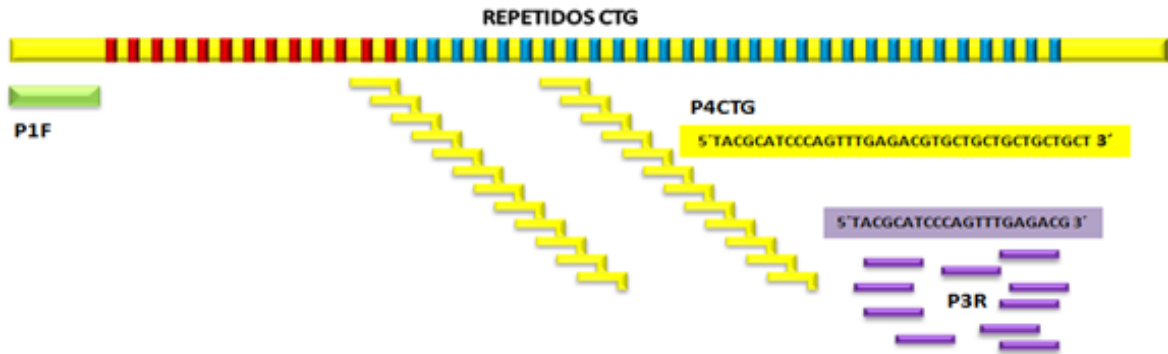


Figura 11. Representación de los sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados en la TP-PCR.

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 6 μ L con 50ng de DNA humano; 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 200 μ M de cada dNTP; 1 μ L de la solución amortiguadora de reacción 10x (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger), 2mM de MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger), 0.5 U de la enzima Taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Ger) y 31% de betaina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Ger). La reacción de PCR constó de 36 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 94°C por 60s, la hibridización 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.

5.6 Determinación del número de repetidos CTG del gen *DMPK* a través de *Small Pool-PCR* (SP-PCR)

En general la SP-PCR es una técnica de biología molecular basada en una serie de diluciones, a partir de un volumen de DNA genómico, para posteriormente realizar amplificación por PCR. A la determinación y detección de dichos productos de amplificación derivados de moléculas únicas se le conoce como *small-pool PCR* (Monckton, Wong et al. 1995, Gomes-Pereira, Bidichandani et al. 2004).

Las reacciones de digestión del DNA se realizaron a partir de 1mg de DNA mediante la enzima *Hind* III de acuerdo con las especificaciones del fabricante, utilizando una incubación inicial a de 37°C por 16 hrs y posteriormente la inactivación de la enzima a 65°C por 20, finalizando con una disminución de la temperatura a 4°C. Se realizaron diluciones seriadas a: 3ng/μL, 1ng/μL, 400pg/μL y 200pg/μL que fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos DM-C (5'-AACGGGGCTCGAAG GGCCT-3') y DM-BR (5'-CGTGGAGGATGGAACACGGAC-3') en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La reacción de PCR constó de 28 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 96°C por 45s, la hibridización a 68°C por 45s y la polimerización a 70°C por 180s, así como un ciclo final de 68°C por 60s y extensión a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa de 20x25cm al 1.5% en buffer TBE 0.5X (Tris-base, ácido bórico, EDTA) por 17 horas aproximadamente a 90 V en un cuarto frío a 4°C. Se utilizaron 5 μl de Bromuro de etidio a una concentración de 10mg/ml por cada 100 ml de gel y/o de buffer de electroforesis TBE 0.5X. Previo a la transferencia, el gel se sometió a una serie de lavados: primero se enjuagó con agua MilliQ, se cubrió completamente

con solución Despurinizante (1X 1.5 M de NaCl, 1 M de NaOH, pH de ~13.0) y se agitó suavemente por 10 minutos, nuevamente se enjuagó con agua MilliQ y se realizó un lavado con solución desnaturalizante por 30 minutos en agitación, se enjuagó nuevamente y se colocó solución neutralizante (1.5 M de NaCl, 1 M de Tris HCl, pH de 7.5; SSC 20X 30 M de NaCl y 0.3 M de Citrato de Sodio) por 30 minutos. Los fragmentos separados fueron transferidos a una membrana de nylon por el método de Southern blot (transferencia del DNA a un soporte sólido por capilaridad) durante 16 horas aproximadamente.

Se cortó la membrana de nylon del mismo tamaño del gel se humedeció con agua MilliQ y luego con solución neutralizante. Se montó el dispositivo de transferencia que consistió en un papel filtro Whatman humedecido con solución neutralizante, se colocó el gel bocabajo y posteriormente se colocaron la membrana húmeda, 2 hojas de papel filtro Whatman enjuagadas en solución neutralizante, una torre de papel grueso o toallas de papel y un vidrio para distribuir 500 a 1,000 gr de peso. Posteriormente el DNA es fijado a la membrana mediante la exposición a luz UV 1200 J/m² por ambos lados; utilizando un *crosslinker* CL-1000 ultravioleta UVP.

La hibridación con la sonda específica y la detección de la señal de quimioluminiscencia se realizó utilizando el protocolo de detección no radiactiva descrito por la Dra. Tomé y colaboradores (Tome, Nicole et al. 2014). Después de la fijación con luz UV se debe evitar que la membrana se seque. Se realizó un paso de prehibridación colocando la membrana en una botella de hibridación y agregando 200ml de buffer de hibridación (5xSSC, 0.1% N-laurosyl sarcosina, 0.02% SDS, 1% solución de bloqueo). Se incubó a 70°C por 30 minutos en rotación, al colocar la membrana evitar que queden burbujas de aire. Si quedan burbujas atrapadas, retirarlas rodando una pipeta de 10ml húmeda sobre la membrana.

Se desnaturalizó la sonda que contiene ácidos nucleicos cerrados (LNA por sus siglas en inglés) marcada en el extremo 5' con digoxigenina (5DigN/GC+AG+CAGC+AG+CAGC+AGCA) (concentración del stock 0.1nmol/μl) a 94°C por 5 minutos (2ul en 50ul de buffer de hibridación), después se enfrió la sonda LNA en hielo. Se agregaron los 52ul de la sonda LNA a 20ml de buffer de hibridación fresco (concentración final de la sonda: 10pmol/ml) y se reemplazó el buffer de hibridación usado para la prehibridación por el nuevo buffer con la sonda. Se incubó a 70°C por 3 horas en rotación. Después de la incubación se recuperó el buffer de hibridación con sonda en un tubo de 50ml y se congeló a -20°C. La sonda puede ser reutilizada al menos 3 veces, desnaturalizándose en agua hirviendo por 5 minutos y enfriándola en hielo.

Durante la posthibridación se incubó la membrana 2 veces a 200ml en buffer de baja astringencia (2X SSC y 0.1% SDS) a temperatura ambiente por 5 minutos en una bandeja con movimiento suave. El volumen del buffer debe ser suficiente para cubrir la membrana. Evitar que se seque cualquier porción de la membrana durante cualquier paso de la posthibridación.

Después se incubó la membrana tres veces por 15 minutos a temperatura ambiente en 200ml en buffer de mediana astringencia (0.5X SSC y 0.1% SDS) precalentado a 70°C en movimiento continuo. Se transfirió la membrana a una bandeja con 200ml de buffer de lavado (0.1M ácido maleico, 0.15M NaCl y 0.3% Tween 20, pH 7.5 con NaOH) y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos en movimiento. Se retiró el buffer y se colocó la membrana en una botella de hibridación con el DNA hacia el centro. Se diluyó la solución de bloqueo 10% (Agregar 10g de agente de bloqueo en 100ml de buffer de ácido maléico. Calentar en horno de microondas por 2 minutos para homogenizarlo, evitar que hierva antes de agitarlo. Y esterilizarlo) con buffer de ácido maléico (0.1M ácido maleico y 0.15M NaCl, pH: 7.5 con NaOH) para obtener una solución de bloqueo

1%. Se agregó 25ml de la dilución al 1% en la botella de hibridación y se incubó por 30 minutos en rotación a temperatura ambiente. Se transfirió la membrana a una bandeja con 200ml de buffer de lavado (0.1M ácido maleico, 0.15M NaCl y 0.3% Tween 20, pH 7.5 con NaOH) y se lavó dos veces por 15 minutos a temperatura ambiente. Se tiró el buffer y se equilibró la membrana en 100 ml de buffer de detección (0.1M Tris y 0.1M NaCl, pH 9.5 con NaOH) por 3 minutos a temperatura ambiente en la bandeja. Para la detección de quimioluminiscencia se colocó la membrana en una bolsa de plástico con el DNA hacia arriba. Se agregó 1ml (20 a 30 gotas) del sustrato *CDP-Star Ready to use* por cada 100cm² de la membrana. Se esparció de forma que quedará homogéneo sobre la membrana y se selló la bolsa evitando que quedaran burbujas. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se quitó el exceso de líquido y se colocó la membrana dentro de la bolsa de plástico en el cassette de autoradiografía con el DNA hacia arriba. Se reveló la autoradiografía después de 1-5 minutos de exposición (**Figura 12**).

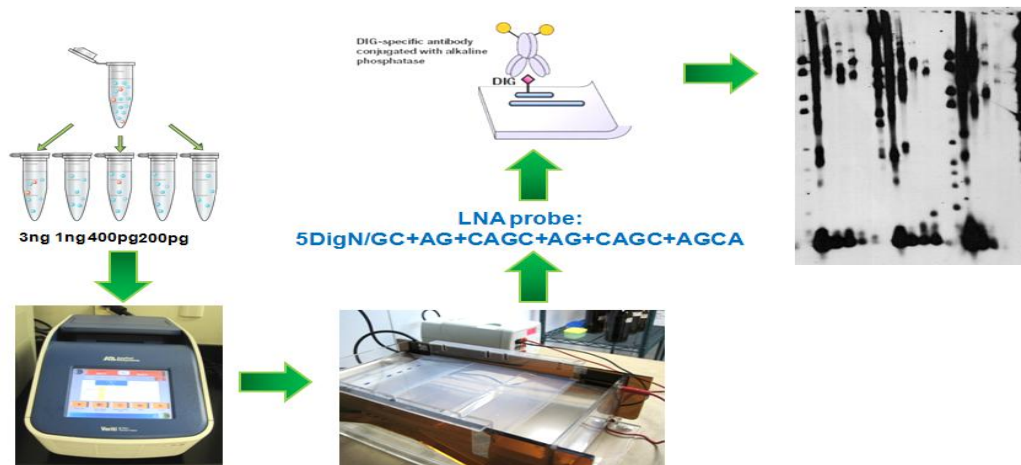


Figura 12. Representación esquemática de la técnica SP-PCR. Restricción de DNA genómico, diluciones seriadas, amplificación por PCR, electroforesis en gel de agarosa, transferencia a membrana de nylon (no mostrado), hibridación con sonda LNA, incubación con anticuerpo anti-digoxigenina y detección de señal de quimioluminiscencia en placa de autoradiografía.

5.7 Evaluación Neuromuscular

5.7.1 Escala MIRS (*Muscular Impairment Rating Scale*)

Posterior a la realización de historia clínica detallada se realizó evaluación clínica de fuerza utilizando la escala MIRS, especialmente diseñada para individuos con DM1 (Mathieu, Boivin et al. 2001). Ésta escala evalúa la fuerza de músculos de cara y cuello, así como de músculos flexores y extensores, proximales y distales de miembros superiores e inferiores, de tal forma que permite clasificarlos en 5 grados (**Tabla 4**).

Tabla 4. Clasificación MIRS utilizada en individuos con DM1.

Grado	Características clínicas encontradas
1	Sin afección muscular clínica
2	Signos mínimos. Miotonía, atrofia temporal o mandibular, debilidad facial, debilidad de los flexores del cuello, ptosis.
3	Debilidad distal. Sin debilidad proximal. Debilidad en extensores y flexores de dedos y muñeca.
4	Leve a moderada debilidad proximal. Debilidad en abductores de hombro, flexores y extensores de codo. Debilidad en flexores de cadera y extensores de rodilla.
5	Debilidad proximal severa. Debilidad en flexores de cadera y extensores de rodilla.

5.7.2 Dinamómetro de mano.

Para obtener una evaluación más objetiva de la fuerza muscular distal, específicamente de miembros superiores se utilizó un dinamómetro de mano hidráulico análogo. Los datos cuantitativos de fuerza en ambas manos fueron comparados contra los datos esperados de acuerdo a la edad, sexo y mano dominante de cada individuo (**Tabla 5**).

Tabla 5. Rango de fuerza esperado en dinamómetro de mano.

EDAD	MANO	HOMBRE		MUJER	
		MEDIA	SD	MEDIA	SD
18-19	D	108.0	24.6	71.6	12.3
	I	93.0	27.8	61.7	12.5
20-24	D	121.0	20.6	70.4	14.5
	I	104.5	21.8	61.0	13.1
25-29	D	120.8	23.0	74.5	13.9
	I	110.5	16.2	63.5	12.2
30-34	D	121.8	22.4	78.7	19.2
	I	110.4	21.7	68.0	17.7
35-39	D	119.7	24.0	74.1	10.8
	I	112.9	21.7	66.3	11.7
40-44	D	116.8	20.7	70.4	13.5
	I	112.8	18.7	62.3	13.8
45-49	D	109.9	23.0	62.2	16.1
	I	100.8	22.8	56.0	12.7
50-54	D	113.6	18.1	65.8	11.6
	I	101.9	17.0	57.3	10.7
55-59	D	101.1	26.7	57.3	12.5
	I	83.2	23.4	47.3	11.9
60-64	D	89.7	20.4	55.1	10.1
	I	76.8	20.3	45.7	10.1
65-69	D	91.1	20.6	49.6	9.7
	I	76.8	19.8	41.0	8.2
70-74	D	75.3	21.5	49.6	11.7
	I	64.8	18.1	41.5	10.2
75+	D	65.7	21.0	42.6	11.0
	I	55.0	17.0	37.6	8.9

D: mano derecha (o dominante ; I: Mano izquierda (o no dominante)

5.7.3 Evaluación electromiográfica de 8 grupos musculares.

Con la finalidad de evaluar la presencia de descargas miotónicas en fibras musculares de individuos con DM1, se realizaron estudios de electromiografía utilizando un equipo Nicolet Viasys Viking Select (*Nicolet Biomedical, Madison USA*). Los electrodos fueron colocados en 8 grupos musculares incluyendo: paravertebrales cervicales, trapecio, deltoides medio, bíceps, extensor común de los dedos, primer dorsal interóseo, vasto medial y tibial anterior. Los datos electromiográficos evaluados fueron amplitud, presencia de inestabilidad de membrana, presencia de descargas miotónicas clásica y hallazgos de otros tipos de ondas.

5.7.4 Evaluación de la deglución.

Se evaluaron once individuos asintomáticos portadores de mutación, doce individuos controles sanos pareados por edad y sexo y un grupo de 14 pacientes con DM1 fenotipo clásico. A todos los individuos se les aplicó el cuestionario *Dysphagia Handicap Index* (**ANEXO 3**) y posteriormente se realizó la evaluación directa de la deglución mediante la visualización directa de las estructuras de faringe y laringe utilizando la técnica FEES (*Fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing*). El cuestionario *Dysphagia Handicap Index*; consta de 25 preguntas relacionadas con el proceso de deglución y basadas en la semiología de signos y síntomas que acompañan a dicho trastorno, esto para estadificar el grado de discapacidad que genera la disfagia en los pacientes. Lo anterior en cuanto a discapacidad funcional, física y emocional, clasificada en normal, discapacidad leve, moderada y severa. Para la evaluación fibroendoscópica se utilizó un fibroendoscopio flexible marca Wolf, conectado a un sistema de video para grabar la secuencia de imágenes de la deglución. La exploración de la deglución con alimento se realizó con volúmenes crecientes (5, 10, 15 y 20 cc.) y en texturas *pudding*, néctar, líquida y en la consistencia sólida ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y 1 galleta completa), valorando el paso del alimento a la hipofaringe, derrame posterior, la

presencia de residuos alimentarios, deglución fraccionada, penetración y aspiración, tanto sintomática como silente, así como la capacidad del paciente para liberar los residuos de la vía respiratoria. Se monitorizó la saturación de oxígeno por medio de un pulsoximómetro (Rossmax medical, USA). La anatomía y función de estas estructuras se evaluaron antes y después de la deglución.

5.7.5 Análisis de miRNAs como biomarcadores en plasma

Se extrajo el RNA total de sangre periférica de 13 individuos presintomáticos, 13 individuos controles pareados por edad y sexo y 14 pacientes con DM1 clásica. La extracción de RNA se realizó a partir de 600 μ L de plasma usando *miRNeasy kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) conforme a las instrucciones del proveedor. El RNA fue eluído en 30 μ L de agua libre de RNAsa y su concentración fue determinada mediante el sistema NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

El análisis de expresión se realizó usando ensayos independientes TaqMan RT-qPCR assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El set de miRNAs fue seleccionado en base a su significancia estadística y su previa implicación como posibles biomarcadores en pacientes con DM1 clásica (Perfetti, Greco et al. 2016). Brevemente, a partir de 30ng de RNA total aislados de 400 μ L de plasma, se realizó una retrotranscripción en 7.5 μ L a través de un sistema StepOne-Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando específicos miRNA primers y ensayos TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). La pre-amplificación del cDNA fue realizada en las siguientes condiciones: 40 ciclos a 16°C por 2 min, a 42°C por 1 min, y a 50°C por 1 seg, seguido por un ciclo final de 80°C por 5 min para la inactivación enzimática. Posteriormente, se realizó una RT-PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el par de primers específico para cada miRNA humano (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-206, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-17p) y dos controles endógenos

seleccionados (snRNAU6 y has-miR-106a-5p) y un control exógeno (cel-miR 39).

Los valores de Ct (número de ciclo fraccional en el que se alcanzó el punto medio de la amplificación logarítmica) de todas las placas se determinó utilizando una referencia automática y un umbral de 0.2 en el software Data Assist (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los miRNAs incluidos en el análisis se filtraron con un valor máximo de Ct fijado a 38. Para definir los mejores miRNAs de referencia interna, se llevó a cabo un análisis de estabilidad de control (meanM), utilizando el algoritmo geNorm (<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>). snRNAU6 y has-miR-106a-5p se emplearon como controles endógenos para la normalización. Se calcularon los niveles de expresión relativa normalizada de miRNAs mediante el método del umbral promedio comparativo (Ct) ($2^{-\Delta Ct}$) (Livak and Schmittgen 2001, Schmittgen, Lee et al. 2008) que resta la media de los controles seleccionados de los otros valores en el miRNA. Un miRNA con un valor de $p < 0,05$, y un valor de p ajustado $< 0,05$, y veces de cambio > 2 se consideraron expresados diferencialmente. El análisis de agrupamiento usando la correlación de Pearson y el enlace promedio se identificó en diferentes subgrupos definidos por perfiles de expresión de miRNAs. Todos los análisis previos se realizaron con R-software (HTqPCR, limma, gplots) en la plataforma de bioconductor.

5.8 Análisis estadístico.

Las diferencias de frecuencias alélicas y genotípicas entre nuestros datos y los de informes previos se estimaron mediante la prueba de chi cuadrada (χ^2) usando el software STATA versión 8. (Stat Corp., College Station, TX, EE. UU.). Un valor p de < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Las frecuencias alélicas y de haplotipos, el número de alelos (k), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) se estimaron utilizando el software Arlequin versión 3.5. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculada por el

método estadístico de Weir & Cockerham ($F_{IS\ w \ \& \ c}$) utilizando el software GENèTIX versión 4.05.2 (Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia) (Rousset and Raymond 1995). Los niveles significativos se determinaron empíricamente con 10,000 permutaciones. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$. Los cálculos de desequilibrio genético se realizaron con el software Arlequin versión 3.1. La subdivisión de la población se evaluó mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA), utilizando el origen étnico como criterio de subdivisión y el software Arlequin. Para evaluar la relación genética con otras poblaciones, el análisis de componentes principales (PCoA) se realizó utilizando el software GeneAlex.

Para el análisis de datos correspondientes a alteraciones de la deglución encontrados en los diferentes grupos de estudio (retraso del reflejo de la deglución, derrame posterior, deglución fraccionada, penetración y aspiración) se utilizó prueba exacta de Fisher y se consideró significativa $p < 0.05$. El análisis de correlación se realizó con coeficiente de correlación de Pearson y Spearman.

5.9 Consideraciones éticas

A todos los individuos que aceptaron participar en este protocolo de investigación de les asesoró previamente sobre los riesgos y beneficios de su participación conforme a lo estipulado en la Carta de Consentimiento Informado (**Anexo 2**). Para el caso de las personas mayores de edad, ellas mismas firmaban el consentimiento informado y únicamente a ellas se les podía entregar el resultado del análisis molecular conforme a los principios de confidencialidad e individualidad. De igual forma cuando se trataba de pacientes menores de edad con manifestaciones clínicas sugestivas de DM1 ambos padres autorizaron la realización del estudio mediante la firma del consentimiento informado y el resultado del análisis molecular únicamente fue entregado a ellos. Todos los resultados fueron entregados personalmente por un Médico Especialista en

Genética Médica, certificado por el Consejo Mexicano de Genética A.C. que se encargó de otorgar el asesoramiento genético correspondiente. No se realizó diagnóstico presintomático en menores de edad.

6. RESULTADOS

Fase 1:

6.1 Distribución alélica del número de repetidos CTG en poblaciones mestizo-mexicana y nativo-americana.

En primer lugar se presentan las genotipificaciones de los repetidos CTG en el gen *DMPK* en una cohorte de población general mestizo-mexicana (n=638), así como en 10 grupos étnicos de la región norte, centro y sur del país (n=561), con la finalidad de analizar el componente genético del tracto de repetidos CTG en nuestra población. En el grupo de población mestizo-mexicana se encontraron 27 alelos con diferente número de repetidos CTG que van de 5 a 42 repetidos, mostrando una distribución bimodal con picos de mayor frecuencia en 5 y de 11 a 13 repetidos. Interesantemente, se encontraron 2 alelos premutados de 41 y 42 repetidos, respectivamente (**Figura 11A**). Por otro lado, los alelos más frecuentes en los grupos amerindios fueron los de 11 y 13 repetidos CTG, excepto en el grupo Yaqui que presentó una menor frecuencia de los alelos de 13 repetidos. Es de llamar la atención que se identificaron dos alelos con premutación de 41 y 46 repetidos CTG en poblaciones Maya y Nahua, respectivamente, lo que podría indicar presencia de DM1 en estos grupo étnicos (**Figura 13B y C**). Las frecuencias de cada población, así como los parámetros genético poblacionales para cada grupo se observan en la **Tabla 6**.

De manera relevante, la frecuencia de alelos largo normales fue mayor en el grupos de mestizos que en los nativo americanos ($p=0.045$), ya que en la población mestiza se encontró con una frecuencia de 8.77, mientras en la población nativa americana la frecuencia fue de 3.12. El porcentaje de alelos largos normales es comparable a lo observado en poblaciones caucásicas que muestran una mayor prevalencia de la enfermedad.

Tabla 6. Distribución de frecuencias de los alelos (CTG)_n en el gen *DMPK* en poblaciones mestiza y nativa-americana.

(CTG) _n Alleles	Mexican mestizo population				Amerindian populations									
	Central Valley	Central Valley	North	Western	Mayas	Totonacas	Popolucas	Zapotecas	Mixe	Nahuas Xochimilco	Nahuas Morelos	Pames	Tarahumaras	Yaquis
	Mexico City	Queretaro	Coahuila	Michoacan	n=90	n=46	n=34	n=46	n=45	n=78	n=31	n=85	n=74	n=32
5	0.179	0.181	0.088	0.074	0.122	0.185	0.015	-	0.156	0.045	0.016	0.071	0.020	0.078
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.016	-	-	-
7	-	0.002	-	-	-	-	-	-	0.011	-	-	-	-	-
8	0.004	-	0.004	0.015	0.006	0.011	-	-	0.022	0.032	-	0.006	-	-
9	-	-	0.009	-	-	-	-	-	-	0.006	-	-	0.007	-
10	0.008	0.002	0.009	-	-	-	-	-	-	0.026	-	0.018	-	0.016
11	0.230	0.235	0.283	0.250	0.178	0.250	0.265	0.522	0.311	0.404	0.274	0.400	0.412	0.563
12	0.058	0.050	0.066	0.015	0.033	0.033	0.059	-	0.044	-	0.081	0.024	0.020	0.031
13	0.368	0.364	0.407	0.402	0.561	0.467	0.544	0.457	0.400	0.423	0.468	0.371	0.459	0.172
14	0.051	0.042	0.027	0.029	0.039	0.022	0.044	-	0.056	0.006	0.081	0.053	0.014	0.078
15	0.010	0.012	0.035	0.044	0.006	-	0.015	-	-	-	-	0.024	0.007	0.016
16	0.006	0.005	0.004	0.015	0.006	-	-	0.022	-	0.006	-	-	0.007	-
17	0.006	0.010	0.013	-	-	-	-	-	-	0.013	0.065	0.006	0.007	-
18	0.002	-	0.004	0.044	-	-	-	-	-	0.006	-	0.000	0.007	-
19	0.010	0.005	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006	-	0.016
20	0.010	0.012	0.013	-	0.011	-	-	-	-	0.013	-	-	0.007	-
21	0.019	0.017	0.004	-	0.006	-	-	-	-	0.013	-	-	-	0.016
22	0.012	0.012	0.009	0.029	0.006	-	-	-	-	-	-	-	0.007	-
23	0.004	-	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006	0.007	-
24	0.002	0.002	-	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	0.007	0.016
25	0.012	0.010	0.004	0.015	-	-	-	-	-	-	-	0.006	0.007	-
26	-	0.007	-	-	0.006	0.033	-	-	-	-	-	0.006	0.007	-
27	0.004	0.007	-	-	0.011	-	0.044	-	-	-	-	0.006	-	-
28	0.002	0.007	-	0.029	-	-	0.015	-	-	-	-	-	-	-
29	0.002	-	-	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	0.005	0.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	0.002	-	0.004	-	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41*	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006	-	-	-	-
42*	-	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46*	-	-	-	-	0.006	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Large Normal Alleles (> 18)	0.080	0.091	0.053	0.147	0.044	0.033	0.059	0.000	0.000	0.032	0.000	0.029	0.047	0.047
Descriptive Statistics														
k	22	23	20	14	15	7	8	3	7	13	7	14	16	10
He	0.773	0.688	0.740	0.755	0.635	0.682	0.626	0.519	0.713	0.654	0.688	0.693	0.618	0.640
Ho	0.759	0.774	0.628	0.735	0.633	0.696	0.618	0.500	0.733	0.731	0.613	0.718	0.608	0.625
HW(P)	0.281	0.114	0.001	0.387	0.494	0.599	0.470	0.424	0.630	0.952	0.157	0.721	0.445	0.434
Fis	0.020	0.001	0.155	0.040	0.009	-0.009	0.028	0.047	-0.017	-0.112	0.126	-0.029	0.022	0.039

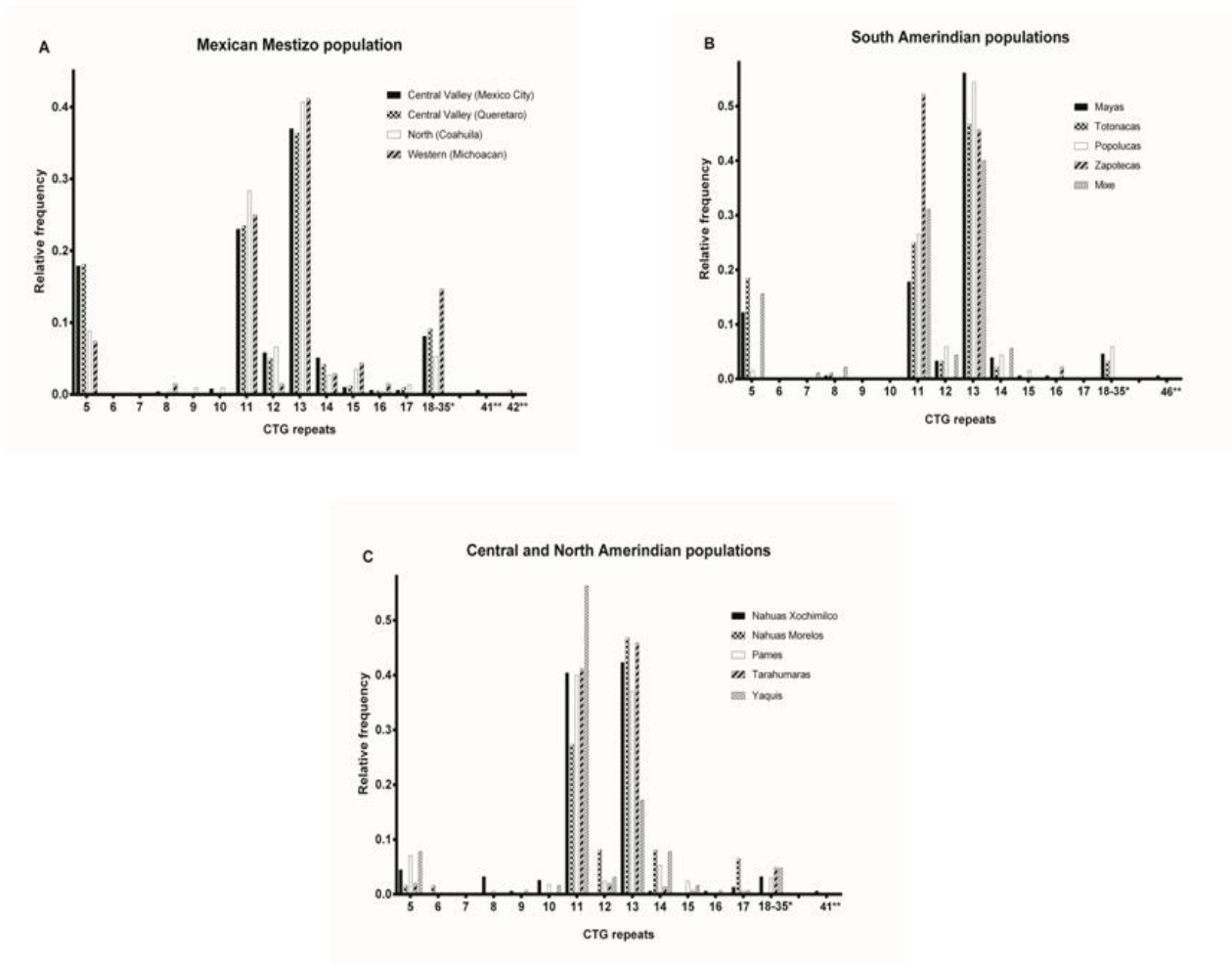


Figura 13. Distribución de repetidos CTG en el gen *DMPK* en población mestizo-mexicana y nativa-americana. A) Poblaciones mestizo- mexicanas del centro, suroeste y norte de México, B) Poblaciones nativas-americanas del sur y C) Poblaciones nativas-americanas del centro y norte del país.

Con base en la distribución de los alelos de CTG, la heterogeneidad genética entre las poblaciones amerindias y mestizas fue evaluada por AMOVA. Encontramos un 5% de diversidad entre las poblaciones ($p \leq 0.001$) pero muy alta heterogeneidad (95%) dentro de las subpoblaciones mestizas y los subgrupos Amerindios. Por lo tanto, la variación genética entre las subpoblaciones mestizas

y entre grupos amerindios se evaluó por separado mediante AMOVA. Encontramos una variación del 1% entre las subpoblaciones mestizas ($p \leq 0.068$) y del 7% entre los grupos Amerindios ($p \leq 0.001$). Luego, dividimos las poblaciones Amerindias en Uto-Aztecas (Nahuas, Tarahumaras y Yaquis), Oto-Mangueanas (Zapotecos y Pames), Totozoqueas (Totonacas), Mixe-Zoqueanas (Mixes) y Proto-Mayas (Mayas), utilizando el criterio del lenguaje. El AMOVA reveló un 5% de heterogeneidad entre las poblaciones y un 95% dentro de las poblaciones ($p \leq 0.001$), lo que sugiere una subestructura genética asociada principalmente con la afiliación lingüística.

Para determinar las similitudes genéticas entre las poblaciones Amerindias, se realizó una PCoA. La primera coordenada separó Mestizos-Mexicanos, Mixes, Pames, Totonacas, Yaquis de los Mayas, Nahuas, Popolucas, Tarahumaras y Zapotecos, mientras que la segunda coordenada separa a los Mayas, Mestizos-Mexicanos, Mixes, Nahuas de Morelos, Popolucas y Totonacas de los Nahuas de Xochimilco, Pames, Tarahumaras, Yaquis y Zapotecos. También, comparamos la estructura genética de las poblaciones mexicanas con la de las poblaciones de todo el mundo, incluidos los Estados Unidos (afroamericanos y chilenos), africanos (áfrica occidental), asiáticos (coreanos y tailandeses) y europeos (españoles y yugoslavos). Las poblaciones Uto-Aztecas (excepto los Nahuas de Morelos), los Zapotecos, los Pames, los Afroamericanos de Alabama, Africanos occidentales, los Europeos y las poblaciones tailandesas se agruparon en el primer componente, mientras que el segundo componente agrupaba a los latinos (Mestizos Mexicanos y Chilenos), amerindios (Mayas, Mixes, Nahuas-Morelos, Totonacas y Popolucas) y poblaciones Coreanas. Curiosamente, la población Mestiza se posicionó en el centro de la tabla (**Figura 14**), pero se asoció estrechamente con los grupos Amerindios. Estos datos implican que la distribución de los alelos repetidos de CTG de los mestizos podría estar influenciada por la ascendencia Amerindia.

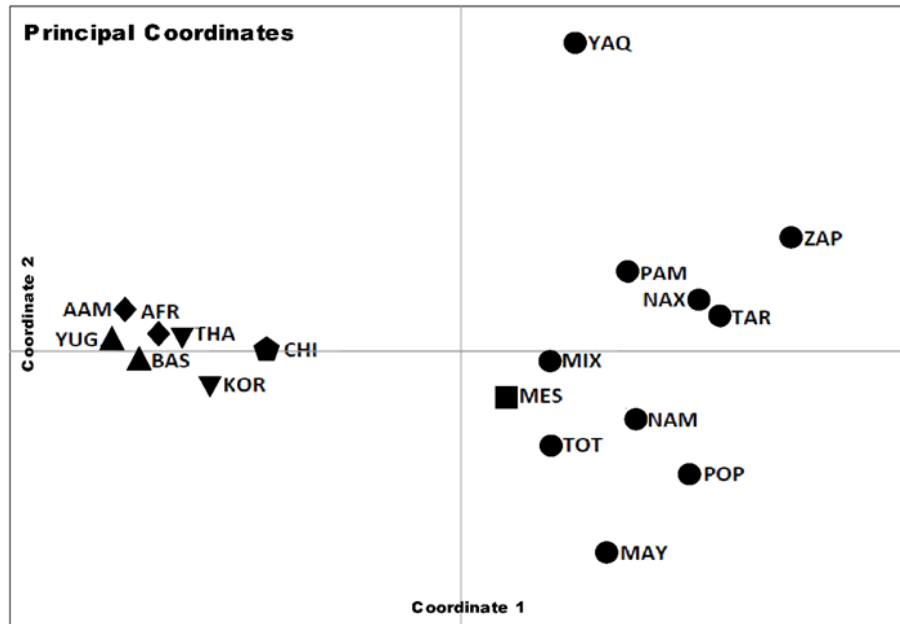


Figura 14. Análisis de componentes principales basado en los repetidos CTG. Análisis genético comparativo entre mestizos (cuadrados-MEX) y poblaciones native-americanas (círculos) [Yaquis (YAQ); Tarahumaras (TAR); Pames (PAM); Nahuas-Xochimilco (NAX); Nahuas-Morelos (NAM); Mayas (MAY); Totonacas (TOT); Popolucas (POP); Zapotecas (ZAP); y Mixes (MIX)] con poblaciones mundiales [Europea (triángulos) [Vascos- España (BAS) y Yugoslavos (YUG)]; Africanos (AFR) y Africano-Americanos (AAM) (rombos); Asiáticos (triángulo invertido) [Tailandeses (THA) y coreanos (KOR)]; y Chilenos (pentágonos-CHI)].

6.2 Identificación de pacientes con DM1

El Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) constituye un centro de referencia nacional de enfermedades neuromusculares, de tal forma que representa un punto clave para la identificación de individuos con DM1 en la República Mexicana. A partir de la identificación de múltiples casos índice para DM1, se analizaron más de 80 familias que incluyeron 630 individuos (entre pacientes con características clínicas y familiares de primer, segundo y tercer

grado). Para cada uno de ellos se aisló el material genético, con lo que se inició la conformación de un banco de DNA para el estudio de la DM1.

6.2.1 Identificación del número de repetidos CTG en el gen *DMPK* mediante PCR, TP-PCR a y electroforesis capilar

A partir de los 630 individuos susceptibles a análisis molecular conformados por pacientes con características clínicas compatibles para DM1 y los familiares en riesgo de ser portadores de la mutación que decidieron realizarse el estudio, se procedió inicialmente con la determinación molecular de la expansión de los repetidos CTG en el gen *DMPK* mediante PCR y posteriormente se confirmó la existencia de expansiones anormales mediante la técnica de TP-PCR. Estas técnicas al ser complementarias se realizaron sin excepción en cada uno de los individuos de estudio, la primera identifica el número exacto de repetidos con un límite de detección de ~100 repetidos CTG (Warner, Barron et al. 1996), mientras que la segunda determina con un 100% de sensibilidad la presencia o ausencia de alelos expandidos (Warner, Barron et al. 1996, Radvansky and Kadasi 2010). De los 630 individuos analizados se confirmó la presencia de la mutación en el gen *DMPK* en 340 individuos (>50 repetidos CTG).

En la **Figura 15** se muestran los patrones electroforéticos típicos mediante el uso de las técnicas de PCR y TP-PCR; en orden ascendente a descendente se puede observar el patrón típico para un individuo sano homocigoto, un individuo sano heterocigoto, un individuo que presenta una pre-mutación y un individuo positivo para DM1 con una expansión mayor a 100 repetidos CTG. Como se observa en los electroferogramas, para el caso de la técnica de PCR analizada a través de electroforesis capilar cada pico de fluorescencia corresponde a un alelo específico, de tal forma que al observar dos picos diferentes concluimos que dicho individuo es heterocigoto y

dependiendo del alelo de mayor tamaño, es posible clasificarlo como heterocigoto sano (**Figura 14B**), como portador de una premutación (**Figura 14C**) o de una mutación pequeña. En el caso de observar un solo pico, existen dos posibilidades: 1) que se trate de un homocigoto sano (**Figura 14 A**); o 2) que se trate un heterocigoto afectado en donde el alelo mutado sobrepasa el límite de detección por esta técnica (~100 repetidos CTG) y por lo tanto no puede ser caracterizado (**Figura 15D**). Es en este caso es cuando la TP-PCR cobra mayor importancia. Debido a la combinación de los oligonucleótidos previamente descritos, en la TP-PCR se produce una serie de amplicones que al ser analizados por electroforesis capilar muestran un corrimiento en forma de escalera con una periodicidad de 3 nucleótidos (**Figura 15D**), en donde la intensidad de la señal disminuye conforme aumenta el tamaño del amplicón (Warner, Barron et al. 1996, Falk, Vojtiskova et al. 2006, Radvansky and Kadasi 2010, Magana, Cortes-Reynosa et al. 2011).

Tomando en cuenta los 340 individuos con diagnóstico positivo para DM1, 267 presentaron fenotipo de DM1 clásica, 23 fueron de inicio infantil, 20 congénitos y resalta la presencia de 30 individuos presintomáticos, que como su nombre lo indica aún no desarrollan datos de la patología y por lo tanto son un grupo clave para estudiar los datos que se presentan en las etapas tempranas de la enfermedad (**Figura 16**). Cabe mencionar que en la literatura nunca se han reportado estudios de individuos presintomáticos portadores de la mutación para DM1, por lo que se identificó una cohorte muy valiosa para poder alcanzar los objetivos del presente trabajo.

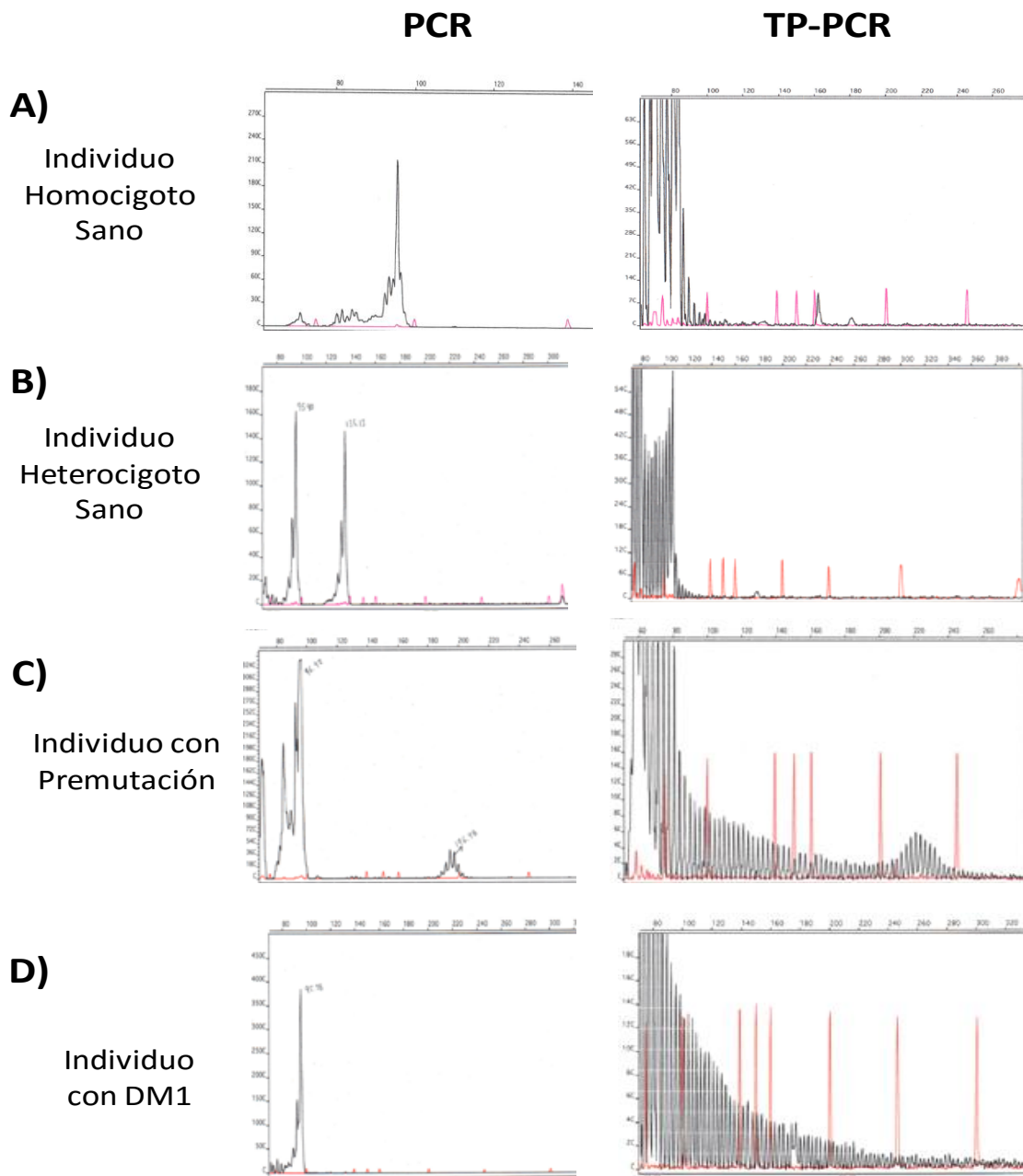


Figura 15. Genotipificación de los repetidos CTG en el gen DMPK a través de electroforesis capilar. El análisis se llevó a cabo mediante PCR (imágenes de la izquierda) y TP-PCR (imágenes de la derecha). A) Electroferograma de un individuo homocigoto sano (13 y 13 repetidos CTG); B) heterocigoto sano (5 y 13 repetidos CTG); C) individuo heterocigoto con premutación (13 y 46 repetidos CTG) D) individuo heterocigoto afectado (13 y >100 repetidos CTG).

Figura 16. Clasificación clínica de individuos con mutaciones por encima de 50 repetidos CTG.

340 INDIVIDUOS DIAGNOSTICADOS EN EL INR

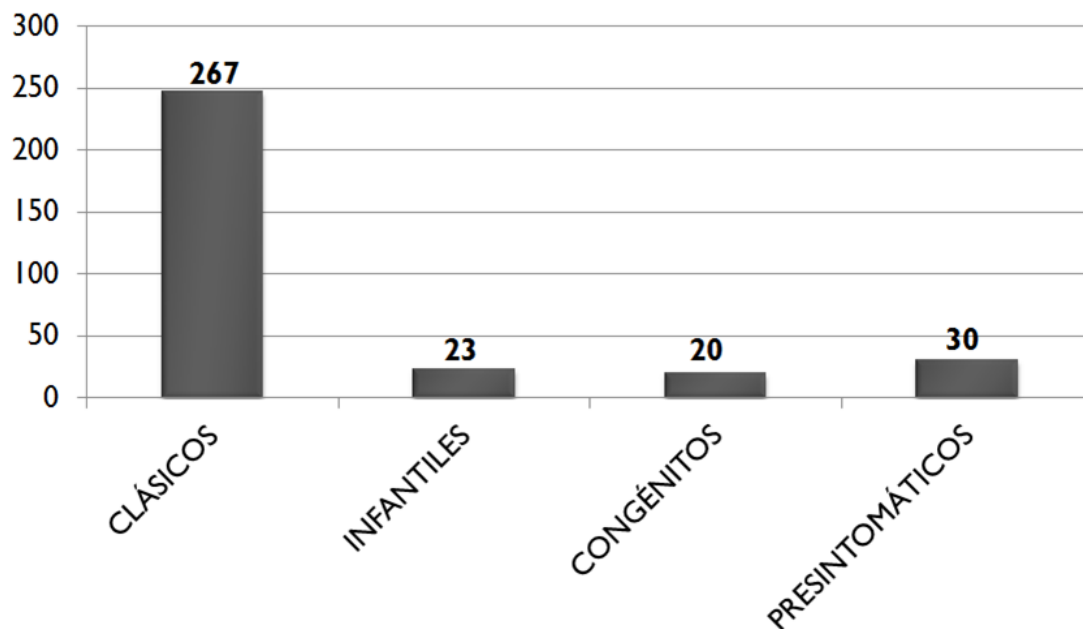


Figura 15. Genotipificación de los repetidos CTG en el gen *DMPK* a través de electroforesis capilar. El análisis se llevó a cabo mediante PCR (imágenes de la izquierda) TP-PCR (imágenes de la derecha). **A)** Electroferograma de un individuo homocigoto sano (13 y 13 repetidos CTG); **B)** heterocigoto sano (5 y 13 repetidos CTG); **C)** individuo heterocigoto con con premutación (13 y 46 repetidos CTG) **D)** individuo heterocigoto afectado (13 y >100 repetidos CTG).

Fase 2:

6.3 Selección de individuos en etapas tempranas de la enfermedad (asintomáticos).

Para realizar la valoración de fuerza muscular en los 30 individuos probablemente presintomáticos se utilizaron escala de MIRS, dinamómetro de mano y electromiografía en los músculos vasto medial y tibial anterior para la búsqueda de descargas miotónicas típicas. Se encontraron que 16 de de los

individuos estudiados permanecían asintomáticos. De ellos 10 son hombres y 6 mujeres entre 18 y 74 años de edad (Media 55.25 ± 16.77) **Tabla 7**.

Los datos obtenidos de las diferentes evaluaciones se resumen en la **Tabla 7**. La escala MIRS reveló que 15 de los 16 presintomáticos se encontraron en grado 1 de fuerza muscular y 1 en grado 2, con un compromiso mínimo localizado en músculos de cara. A nivel de dinamómetro observamos que en los 15 individuos evaluados la fuerza en ambas manos estaba prácticamente conservada conforme a lo esperado para su edad y sexo. Cabe mencionar que no existen tablas comparativas de fuerza en dinamometría de mano para pacientes mexicanos por lo que se utilizaron las medidas internacionales.

En una primera etapa la caracterización del alelo mutado se realizó mediante las técnicas de PCR y TP-PCR, el rango de alelos fue de 50 a 85 repetidos CTG. Sin embargo en 2 de los individuos no fue posible caracterizar el alelo mutado debido al límite de resolución de la PCR (**Tabla 7**).

Tabla 7. Resumen de datos característicos de los 16 individuos presintomáticos. Incluyendo datos demográficos, caracterización del número de repetidos CTG en el gen *DMPK* y fuerza muscular evaluado por MIRS y por dinamometría de mano.

SEXO	EDAD	REPETIDOS CTG	MIRS	DINAMÓMETRO MANO DER.	DINAMÓMETRO MANO IZQ.
M	18	-	MIRS 1	75 libras (83.4)	75 libras (65.2)
F	21	-	MIRS 1	62 libras (55.9)	35 libras (47.9)
M	44	76	MIRS 1	85 libras (86.9)	72 libras (78)
F	45	50	MIRS 1	55 libras (46.1)	44 libras (43.3)
M	50	82	MIRS 1	77.16 libras (86.9)	62 libras (78)
F	53	78	MIRS 1	50 libras (54.2)	35 libras (46.6)
F	56	85	MIRS 1	55 libras (44.8)	50 libras (35.4)
M	58	71	MIRS 1	70 libras (74.4)	60 libras (59.8)
M	61	82	MIRS 1	70 libras (69.3)	75 libras (56.5)
M	62	62	MIRS 1	62 libras (69.3)	70 libras (56.5)
F	63	59	MIRS 1	44 libras (45)	44 libras (35.6)
M	64	73	MIRS 2	77 libras (69.3)	66 libras (56.5)
F	69	68	MIRS 1	30 libras (37.9)	37 libras (31.3)
M	72	58	MIRS 1	57 libras (53.8)	53 libras (46.7)
M	74	67	MIRS 1	40 libras (53.8)	57 libras (46.7)
M	74	53	MIRS 1	55 libras (53.8)	40 libras (46.7)

6.4 Determinación de repetidos CTG mayores a 130 repetidos

Debido a que el límite de detección de la PCR fluorescente es de ~100-130 repetidos CTG se procedió a la estandarización y análisis a través de una variante de PCR conocida como SP-PCR (del inglés *Small Pool- PCR*), la cual se basa en el uso de diluciones seriadas de DNA que nos permiten identificar con mayor precisión el tamaño del alelo progenitor, así como la presencia de mosaicismo somático, ya que a diferencia del *Southern blot* se observan bandas más definidas, que permiten dilucidar con mayor precisión el tamaño del alelo mutado (Monckton, Wong et al. 1995). Las diluciones seriadas de la muestra de DNA corresponden a 3ng, 1ng, 40png y 200pg de DNA. En la **Figura 16**, se muestran unas placas de autoradiografía representativas de un individuo heterocigoto con una expansión anormal de 295 repetidos CTG (**Figura 17A**) y otro con una expansión de 514 repetidos CTG (**Figura 17B**). Se puede observar una disminución gradual de la intensidad de las bandas correspondiente a la disminución en la cantidad de DNA utilizado. Los fragmentos del marcador de peso molecular también están marcados con un digoxigenina para que puedan ser detectados durante la reacción de quimioluminiscencia.

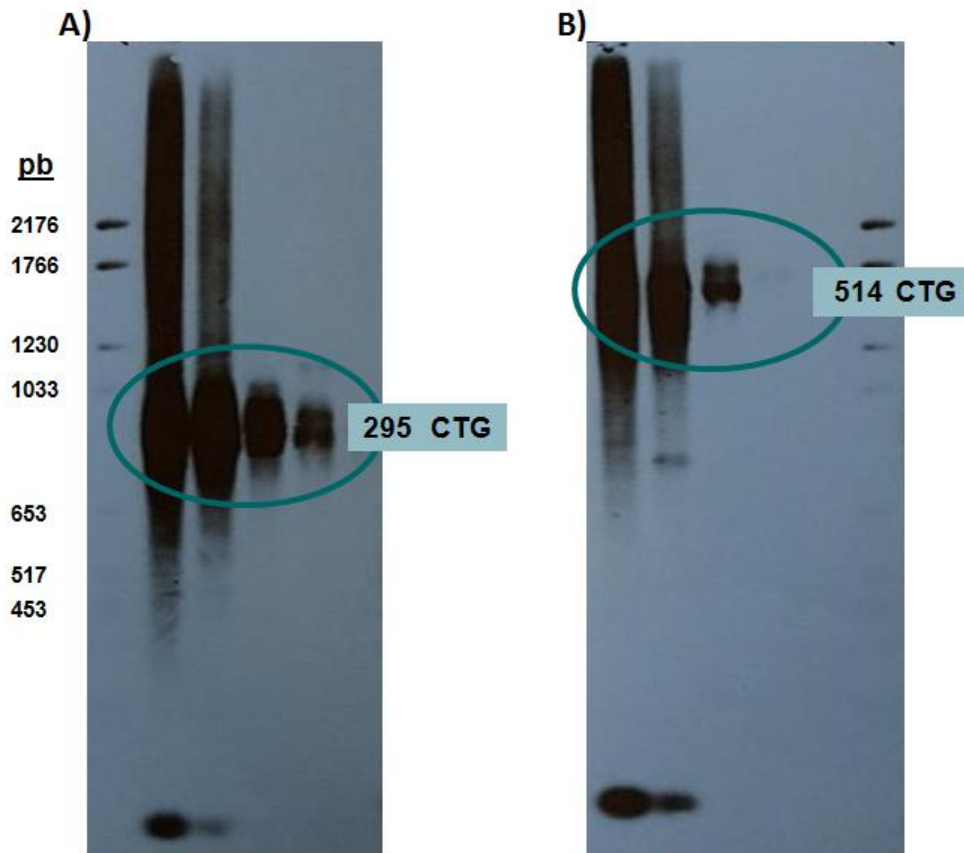


Figura 17. Placas de autoradiografía que muestran el resultado de la SP-PCR. Nótese las bandas correspondientes a las diluciones seriadas en A) individuo con expansión anormal de 295 repetidos CTG, la banda persiste durante las diferentes diluciones y por lo tanto es la que indica el tamaño del alelo progenitor: B) Individuo con 514 repetidos CTG.

De esta forma se pudo caracterizar el tamaño del alelo progenitor mutado en cada uno de los 2 individuos que como era de esperarse tenían expansiones mayores a 100 repetidos CTG. En la **Tabla 8** se muestra la caracterización completa del tamaño de alelos encontrado en individuos presintomáticos.

Tabla 8. Resumen del genotipo encontrado en individuos presintomáticos.

SEXO	EDAD	ALELO 1	ALELO 2
M	18	5	295
F	21	13	514
M	44	15	76
F	45	13	50
M	50	13	82
F	53	13	78
F	56	12	85
M	58	18	71
M	61	11	82
M	62	5	62
F	63	13	59
M	64	13	73
F	69	11	68
M	72	12	58
M	74	13	67
M	74	5	53

Es muy importante notar que estos individuos con el mayor número de repetidos son los más jóvenes y aunque como hemos visto, la DM1 es una enfermedad muy heterogénea, lo esperado sería que pertenecieran al grupo de DM1 clásica. Sin embargo, esto no es así ya que en ambos casos durante el corrimiento electroforético de la TP-PCR observamos la presencia de *gaps* que corresponden a interrupciones formadas por repetidos diferentes a CTG (**Figura 18**). Para confirmar dicho hallazgo se realizó una secuenciación automatizada, con lo que se identificó que la presencia de estas interrupciones podrían corresponder a secuencias CAG en el tracto de repetidos CTG.

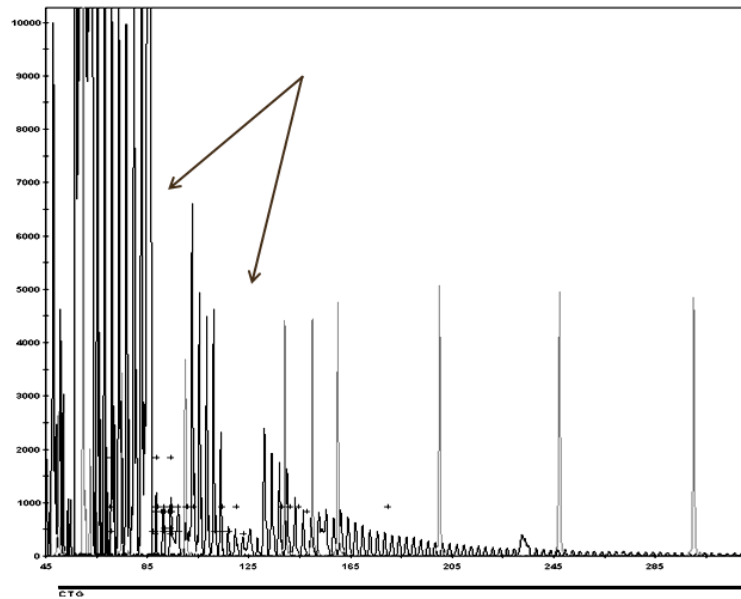


Figura 18. Corrimiento electroforético de TP-PCR. Las flechas muestran los sitios de interrupción originados por repetidos diferentes a CTG.

6.5 Marcadores clínicos iniciales de la patología en músculo esquelético

Con el objetivo de buscar marcadores clínicos en las etapas incipientes de la patología se realizó una evaluación fina de cambios electromiográficos no solo en 2 sino en 8 grupos musculares distribuidos en cuello, músculos de extremidades superiores e inferiores, incluyendo paravertebrales cervicales, trapecio, deltoides medio, bíceps, extensor común de los dedos, primer dorsal interóseo, vasto medial y tibial anterior.

Como es de esperarse en individuos con DM1 clásica el patrón encontrado fue una franca descarga miotónica con disminución progresiva de la amplitud acompañada del sonido de avión en picada, este ha sido perfectamente bien descrito en pacientes con síntomas característicos de la patología. La disminución de la amplitud indica disminución de fuerza durante la contracción a nivel de la fibra muscular (**Figura 19A**).

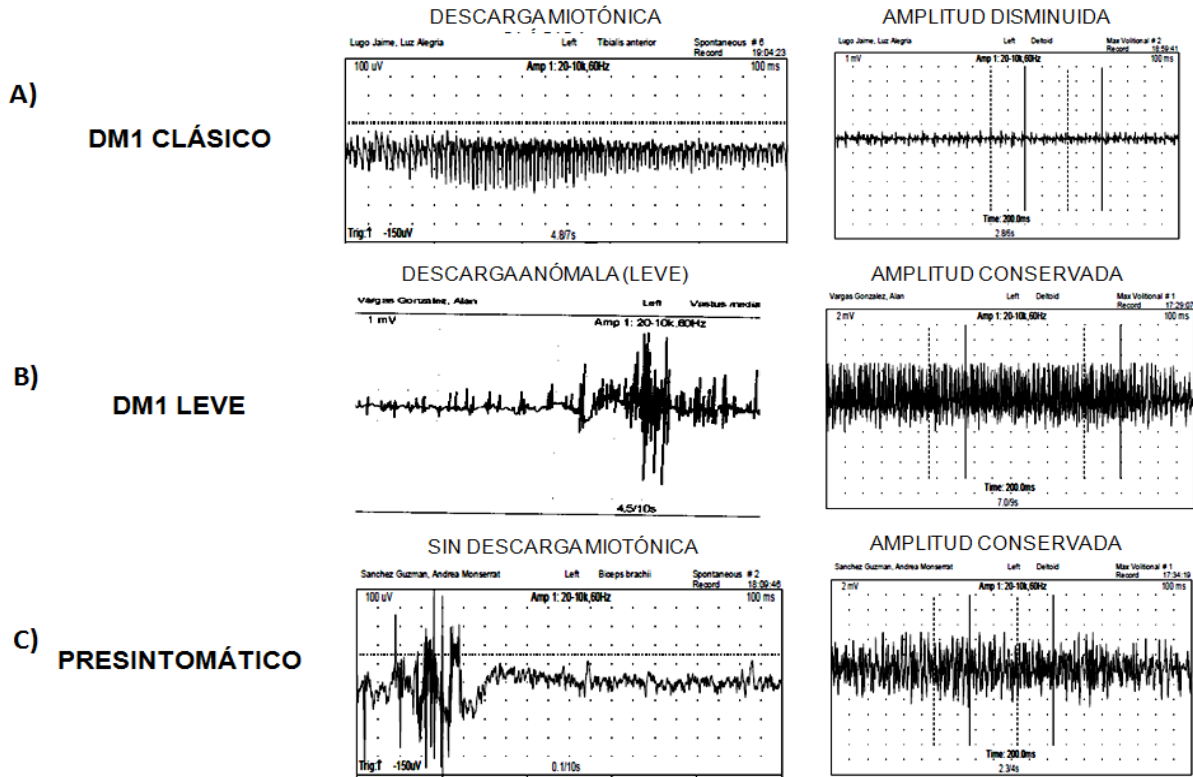


Figura 19. Patrón electromiográfico encontrado en individuos evaluados. A) Descarga Miotónica característica en individuos con DM1 clásica y disminución de la amplitud: B) Descarga anómala (leve) observada en etapas iniciales de la patología con amplitud conservada: y C) Ausencia de descarga Miotónica en individuos presintomáticos con amplitud conservada.

De forma particular en algunos grupos musculares evaluados (**Tabla 9**) encontramos una descarga anómala (leve) que no corresponde a una descarga

miotónica como tal pero que ya indica cambios a nivel de fibra muscular, además de que la amplitud se encuentra conservada lo que nos habla de una correcta funcionalidad durante la contracción (**Figura 18B**). Los grupos musculares que mostraron este tipo de cambios variaron en cada individuo e incluso se presentaron de forma unilateral lo que nos habla de la heterogeneidad fenotípica en esta patología. Estas descargas atípicas son indicativas de alteraciones iniciales en individuos pre-sintomáticos, los cuales podrían ser sugeridos como marcadores clínicos tempranos en las etapas iniciales de la DM1. Estos datos demuestran alteraciones atípicas en prácticamente todos los portadores asintomáticos analizados, lo cual no se observa con individuos sanos, aún en edades superiores a la quinta década de la vida. La ausencia de descargas miotónicas y la disminución de amplitud (**Figura 18C**), nos habla de que la fuerza muscular se encuentra conservada a nivel funcional y que por eso estos individuos permanecen sin compromiso clínico a este nivel.

Tabla 9. Resumen de hallazgos electromiográficos en cada individuo presintomático.

SEXO	EDAD	ALELO MUTADO	MIRS	AMPLITUD	DESCARGAS MIOTÓNICAS	MÚSCULO AFECTADO
M	18	295	MIRS 1	conservada	Presente (1)	Peroneo,
F	21	514	MIRS 1	conservada	Ausente (0)	
M	44	76	MIRS 1	conservada	Presente (1)	Vasto medial
F	45	50	MIRS 1	conservada	Presente (2)	Deltoides, tibial
M	50	82	MIRS 1	conservada	Ausente (0)	
F	53	78	MIRS 1	conservada	Ausente (0)	
F	56	85	MIRS 1	disminuida	Presente (4)	C7,C6 bilateral, 1 dorsal interóseo
M	58	71	MIRS 1	conservada	Ausente (0)	
M	61	82	MIRS 1	conservada	Ausente (0)	
M	62	62	MIRS 1	conservada	Presente (1)	Radicular cervical
F	63	59	MIRS 1	conservada	Ausente (0)	
M	64	73	MIRS 2	conservada	Presente (1)	C7
F	69	68	MIRS 1	conservada	Presente (1)	Trapezio izquierdo
M	72	58	MIRS 1	conservada	Presente (2)	Vasto medial, extensor común
M	74	67	MIRS 1	conservada	Presente (1)	C6
M	74	53	MIRS 1	disminuida	Ausente (0)	

6.6 Marcadores clínicos iniciales de la patología en músculo liso

Para valoración detallada de músculo liso nos enfocamos en evaluar la presencia de disfagia ya que ha sido ampliamente estudiada en individuos con DM1 clásica a nivel mundial, además de que constituye una causa muy importante de morbi-mortalidad. Como se mencionó anteriormente el primer abordaje fue a través de la aplicación de un cuestionario detallado para evaluar si los individuos de estudio perciben algún dato clínico que comprometa la deglución. Se analizó un grupo de portadores presintomáticos y se comparó con un grupo control pareado por edad y género, así como con un grupo de pacientes con DM1 para dar validez externa a los hallazgos encontrados. En este sentido todos los individuos presintomáticos, así como el grupo de controles pareados por edad y sexo tuvieron un puntaje de deglución normal. Nueve de los pacientes con DM1 clásica se refirieron normales, uno con disfagia leve, tres con disfagia moderada y uno con disfagia severa (**Figura 20**).

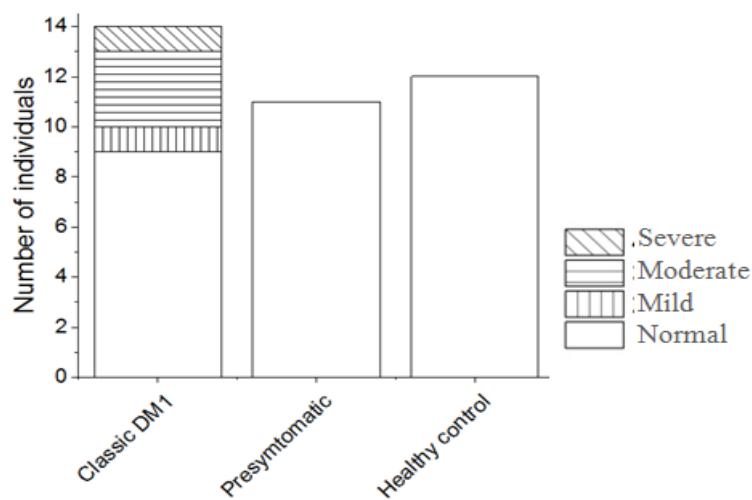


Figura 20. Resultados del cuestionario de evaluación de disfagia. Nótese que 100% de individuos presintomáticos y controles sanos no perciben datos de disfagia.

La evaluación directa de la deglución mediante FEES mostró conforme a lo esperado que los pacientes con DM1 presentaban presencia de residuos para todas las consistencias evaluadas, pero de forma interesante pudimos observar que también los individuos presintomáticos presentaron residuos a pesar de no percibir complicaciones durante la deglución (**Figura 21**). Todos los individuos asintomáticos presentan residuos en menor medida que los pacientes clásicos, sin embargo es evidente la presencia de alteraciones orofaríngeas.

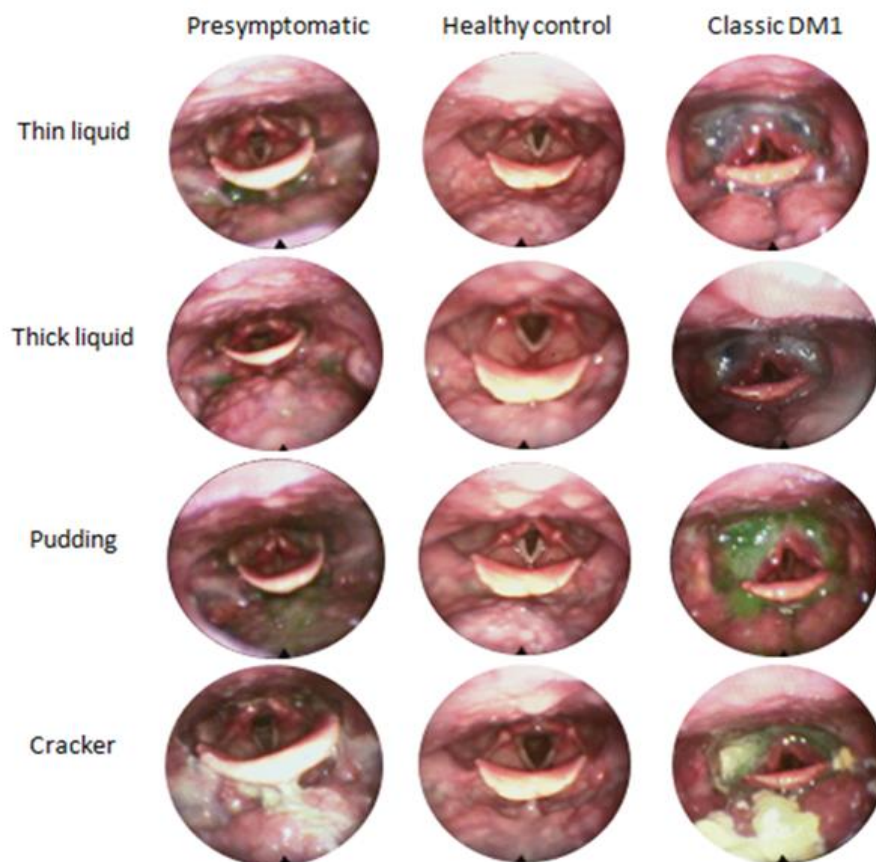


Figura 21. Fotografías tomadas durante la FEES. Nótese la presencia de residuos para todas las consistencias tanto en individuos presintomáticos como en pacientes con DM1 clásicos.

Durante la evaluación de la deglución por endoscopia se evaluaron diferentes parámetros incluyendo: retraso del reflejo, derrame posterior, deglución fraccionada, penetración y aspiración. Cada una de estas alteraciones puede ocurrir durante el paso de alimento de la boca al esófago y ocasionar complicaciones respiratorias y nutricionales.

El retraso del reflejo estuvo presente en 90.90% de los individuos presintomáticos, 92.85% de los DM1 clásicos y en 33.33% de los controles sanos. Encontramos diferencias significativas tanto en el grupo de presintomáticos ($p < 0.05$) como en el grupo de DM1 clásicos ($p < 0.005$) respecto de los controles sanos (**Figura 22A**). Además todos los presintomáticos, 92.85% de los DM1 clásicos y 58.33% de los controles sanos presentaron derrame posterior, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de asintomáticos versus el grupo control (**Figura 22B**).

La deglución fraccionada estuvo presente en 54.54% de los presintomáticos, 50% de los DM1 clásicos y solamente en el 8.33% de los controles sanos; mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) tanto para los presintomáticos como para los DM1 clásicos en comparación con el grupo control (**Figura 22C**).

Finalmente, 9.09% de presintomáticos, 35.71% de DM1 clásicos y ninguno de los individuos sanos mostraron penetración, ni aspiración; únicamente los DM1 clásicos mostraron una p significativa respecto del grupo control ($p < 0.05$) (**Figuras 22D y 22E**).

Además de observar las frecuencias de los datos clínicos evaluados en las **Figuras 22A-E** se muestra la proporción de los diferentes grados de severidad de la disfagia utilizando la escala de Langmore (Langmore, Schatz et al. 1988).

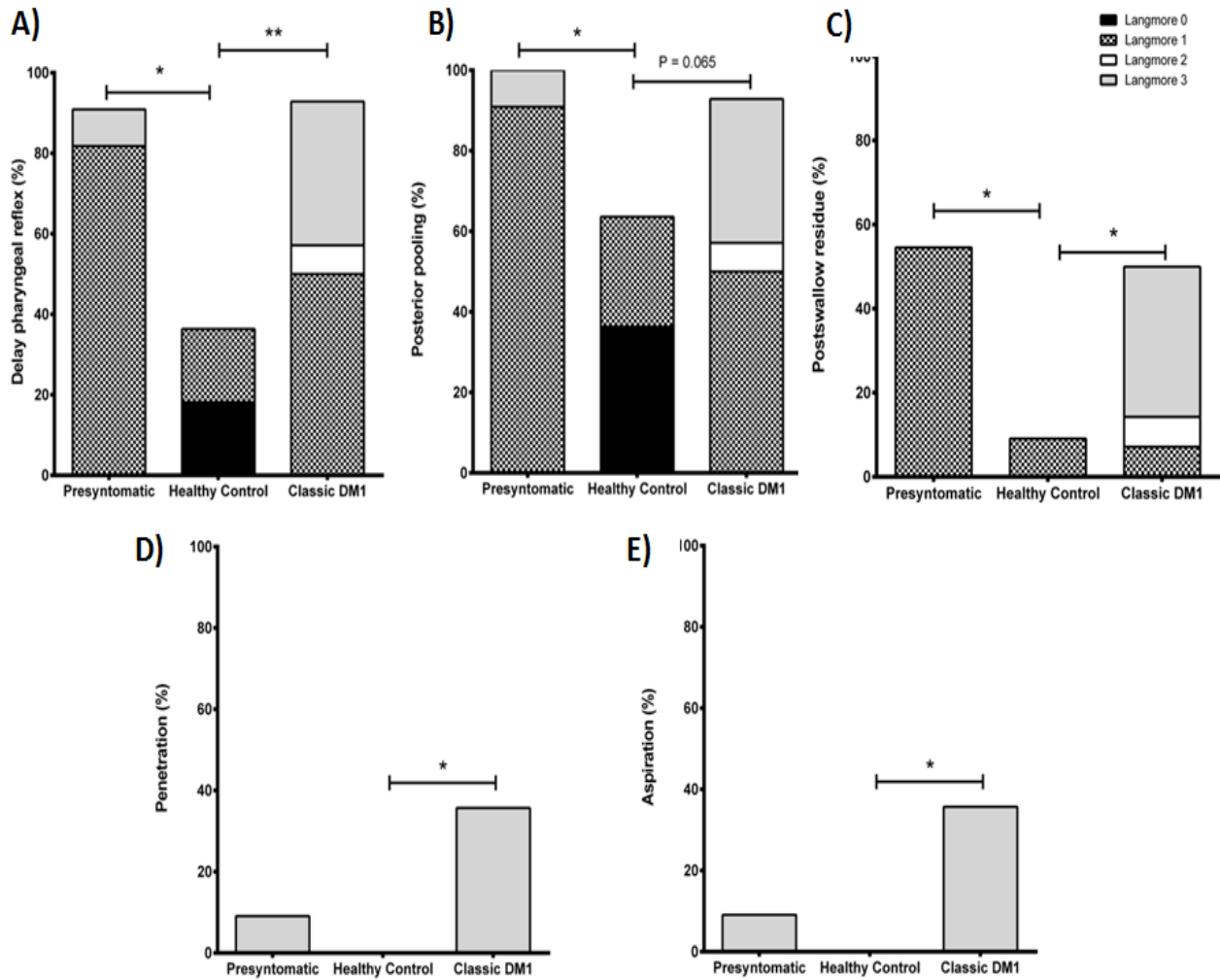


Figura 22. Frecuencia de alteraciones de deglución en presintomáticos, controles sanos y DM1 clásicos. A) Retraso del reflejo, B) derrame posterior, C) deglución fraccionada, D) penetración y E) aspiración. Nótese la proporción de la severidad de la disfagia medida con la escala de Langmore. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

El análisis de *Odds ratio (OR)* demostró una mayor riesgo para desarrollar retraso del reflejo y deglución fraccionada tanto en individuos presintomáticos como en pacientes con DM1 (**Tabla 10**).

Tabla 10. Odds Ratio (OR) para alteraciones de la deglución en los grupos de estudio.

Variable	Presintomáticos (OR)	DM1 clásicos (OR)
Retraso del reflejo	20.00 (1.84-216.3)	26.00 (2.44-276.0)
Derrame posterior	16.87 (0.80-352.1)	9.28 (0.89-96.01)
Deglución fraccionada	13.20 (1.23-140.8)	11.00 (1.10-109.7)
Penetración	3.57 (0.13-97.31)	14.47 (0.70-295.5)
Aspiración	3.57 (0.13-97.31)	14.47 (0.70-295.5)

Durante el análisis de FEES a todos los individuos estudiados se les monitoreó con un oxímetro de pulso, de tal forma que si presentó un compromiso ventilatorio lo podíamos detectar mediante la saturación de oxígeno. Como ya lo hemos mencionado las formas más graves de disfagia cursan con alteraciones de la respiración. Por lo tanto esta es otra forma indirecta de correlacionar la gravedad de la disfagia con otros parámetros clínicos. La correlación de Pearson y Spearman no mostró relación entre la desaturación de oxígeno versus el número de repetidos CTG ni la edad al momento del estudio (**Tabla 11**).

Tabla 11. Correlación entre la desaturación de oxígeno y el número de repetidos CTG o edad en los diferentes grupos de estudio.

Variable	Pearson	Spearman
DM1 CLÁSICOS:		
Num. repetidos CTG	r = - 0.020 (p = 0.94)	r = 0.017 (p = 0.70)
Edad	r = - 0.336 (p = 0.24)	r = 0.019 (p = 0.52)
PRESINTOMÁTICOS:		
Num. repetidos CTG	r = - 0.094 (p = 0.78)	r = - 0.491 (p = 0.02)
Edad	r = - 0.413 (p = 0.69)	r = - 0.266 (p = 0.20)
CONTROLES SANOS		
Edad	r = - 0.413 (p = 0.69)	r = - 0.4189 (p = 0.20)

6.7 Identificación de biomarcadores moleculares

A partir de muestras de plasma de 13 individuos presintomáticos, 13 individuos controles pareados por edad y sexo y 14 pacientes con DM1 se realizó la extracción total de miRNAs y la medición de la expresión se realizó por qPCR. De acuerdo a la reportado por Perfetti y cols. y Koutsoulidou y cols. (Koutsoulidou, Kyriakides et al. 2015, Perfetti, Greco et al. 2016), nosotros medimos la expresión de miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-140, miR-454, miR-574 y miR-27b.

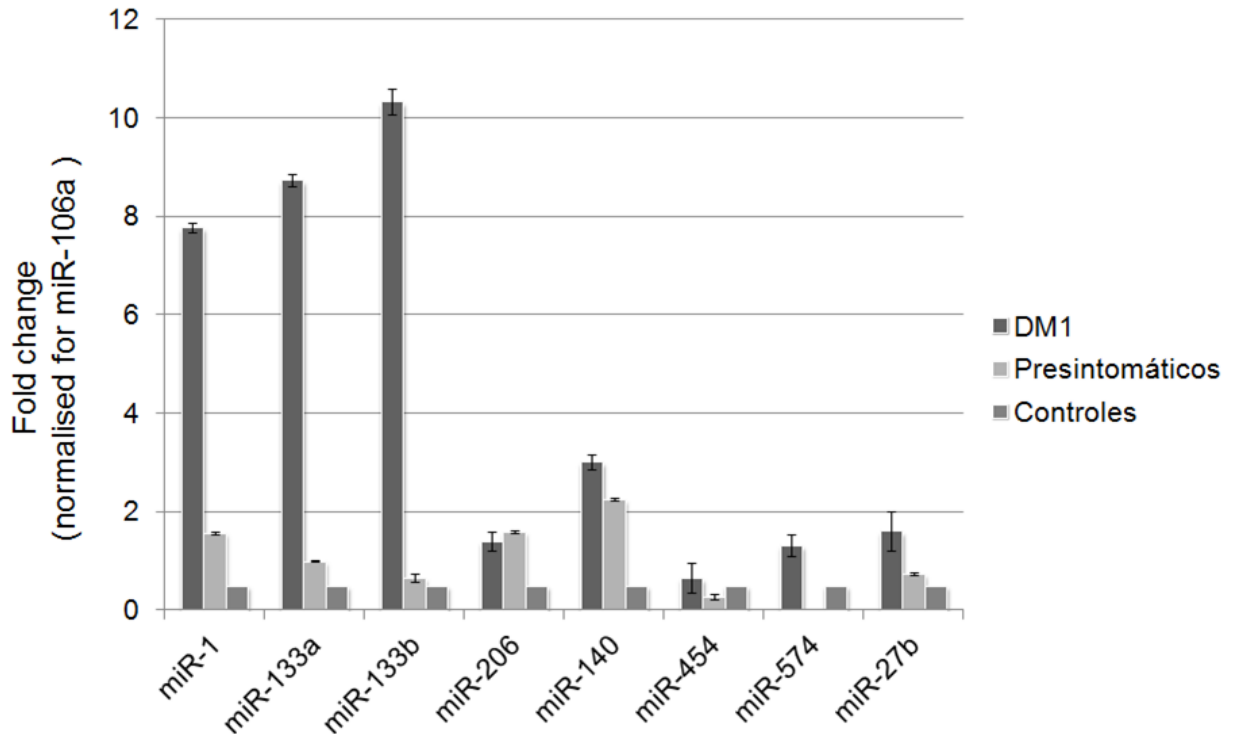


Figura 23. Cuantificación relativa de miRNAs plasmáticos en pacientes DM1 e individuos presintomáticos. Las barras en la gráfica corresponden al valor medio de las veces de cambio comparados con los controles mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$ comparativo. El valor de miR-106A fue utilizado como referencia interna para normalización.

La normalización es un dato crítico en todos los ensayos de miRNAs, en este estudio utilizamos tres miRNAs como normalizadores: uno endógeno (cel-miR-39) y dos endógenos (miR-106a y miR-17-5p). A este respecto pudimos observar que cel-miR-39 y miR-106a mostraron una expresión más estable durante las diferentes evaluaciones, por lo que en un primer abordaje fueron los mejores candidatos para normalizar los datos.

En el grupo de pacientes con DM1 encontramos que miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-140, miR-574 y miR-27b muestran sobreexpresión respecto al grupo control (**Figura 23**), lo que corresponde a lo previamente

reportado en la literatura (Perfetti, Greco et al. 2016). Sin embargo, miR-454 no mostró diferencias significativas, esto probablemente pudiera haber sido afectado por diversas variables como el tamaño de la muestra o a las diferencias de edad, tiempo de evolución y edad de inicio de la patología en comparación con los grupos previamente reportados.

Los miRNAs: miR-1, miR-133a y miR-133b son los que muestran mayor cambio en pacientes con DM1 clásica, presentando 7.76, 8.72 y 10.32 veces más expresión, respectivamente. Esto es de esperarse ya que corresponden a los miRNAs que participan mayormente en el metabolismo de músculo esquelético y que han sido directamente correlacionados con degeneración de músculo. Por otro lado, de acuerdo a lo reportado por Fritegotto y cols. una sobreexpresión de miR-206 podría hablarnos de un potencial estado de regeneración.

De forma muy interesante, en individuos presintomáticos observamos que existe una sobreexpresión significativa respecto del grupo control de los miRNAs: miR-1, miR-133a, miR-206, miR-140 y miR-27b (Figura 23). Lo que nos habla de que estos marcadores se encuentran alterados en etapas tempranas de la enfermedad.

Llama la atención que miR-206 se encuentra prácticamente en los mismos niveles de expresión que en los individuos con DM1 (Figura 23), como mencionamos antes este dato podría estar en relación al proceso de regeneración muscular que puede activarse en respuesta al daño muscular o probablemente sea un indicador asociado a la progresión lenta de la enfermedad, se requiere de más estudios para el mejor entendimiento de estos mecanismos.

Además en miR-1, miR-140 y más discretamente en miR-133a y miR-27b observamos un aumento progresivo en la sobreexpresión del grupo de presintomáticos y DM1 respecto al grupo control. Lo que apoya que este grupo de miRNAs pueden utilizarse como biomarcadores de la enfermedad y que pueden ser liberados de las células musculares apoptóticas al plasma inclusive, antes de que se presenten las manifestaciones de la enfermedad.

7. DISCUSIÓN.

7.1. El papel de la DM1 en la población Mexicana

Las enfermedades causadas por expansión de repetidos constituyen una forma de mutación muy importante en los seres humanos, debido a que están relacionadas con más de 30 enfermedades neurológicas, neurodegenerativas y neuromusculares, las cuales son de interés social debido a que pueden producir altos niveles de discapacidad. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra la DM1, causada por la expansión anormal de repetidos del trinucleótido CTG en la región no codificante 3' (3'-UTR) del gen *DMPK*, la cual es considerada como la distrofia muscular más común en adultos, caracterizada por la presentación de manifestaciones clínicas multisistémicas que son altamente variables entre cada paciente.

A la fecha, en países Latinoamericanos y en México no existen datos epidemiológicos de referencia, por lo que se desconoce la prevalencia de esta patología y su impacto clínico en nuestra sociedad. La falta de un diagnóstico eficaz y el desconocimiento médico de la DM1 en los servicios de salud de nuestro país han provocado que se encuentre sub-diagnosticada. A falta de información epidemiológica confiable, y ante la necesidad de conocer su comportamiento en nuestra población, en el presente trabajo se abordó de manera inicial, conocer el comportamiento de los repetidos CTG del gen *DMPK* en la población mestizo mexicana (638 individuos mestizo-mexicanos no relacionados), así como en individuos con ancestría Amerindia (Población nativo-americana formada por 561 individuos no relacionados provenientes de 10 etnias diferentes), con la finalidad de determinar datos sugerentes de su prevalencia en nuestra población. Esta estimación se basa en la determinación de la frecuencia de los alelos largos normales, ya que se conoce que en patologías asociadas a mutaciones dinámicas producidas por expansiones

anormales de tripletes repetidos 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) se ha observado que una alta frecuencia de alelos largos normales que presentan un número de repetidos cercano al umbral correspondiente a la mutación, puede estar asociada con un aumento en el número de casos de dichas patologías. Con respecto a la DM1, se ha descrito que en las poblaciones con baja prevalencia de DM1 como poblaciones Africanas, Afro-americanas y Taiwanesas, la frecuencia de estos alelos largos normales es menor al 1%, mientras que en poblaciones como la Japonesa y diversas poblaciones Europeas se presenta una frecuencia alta por encima del 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.

Cabe resaltar, que la determinación de los repetidos CTG se basó en una PCR fluorescente que acota la región de repetidos CTG en el gen *DMPK*, la separación de fragmentos marcados a través de electroforesis capilar permite la identificación precisa del número de repetidos CTG de alelos correspondientes a intervalos no patológicos y de alelos con pequeñas expansiones. Por lo tanto es muy útil para determinar de manera exacta el rango de premutación y mutaciones que superan el umbral de penetrancia completa menores a ~130 repetidos.

Conforme a nuestros resultados, a partir del análisis de frecuencias alélicas encontramos una distribución bimodal de los alelos repetidos de CTG en la población mestiza contemporánea, con picos de 5 repetidos CTG y 11 y 13 repetidos CTG. Esta distribución alélica es particular para nuestra población, ya que a nivel mundial se ha determinado que el alelo más frecuente en la mayoría

de las poblaciones analizadas es el de 5 repetidos (Cobo, Poza et al. 1996, Tishkoff, Goldman et al. 1998, Culjkovic, Stojkovic et al. 2002). La distribución *suigeneris* en la población mestizo mexicana sugiere una constitución poblacional específica, posiblemente conformada por linajes europeos y amerindios, debido a que las poblaciones de Europa oriental y occidental exhibieron las frecuencias más altas para el alelo de 5 repetidos, mientras que los alelos de 11 y 13 repetidos CTG se encontraron como los alelos predominantes en los grupos amerindios de nuestra población, lo cual coincide con algunos grupos étnicos de Sudamérica (Tishkoff, Goldman et al. 1998). Curiosamente, observamos una frecuencia relativamente baja de los alelos de 12 repetidos en amerindios; esta distribución característica para nuestra población podría deberse a cuellos de botella genéticos en las poblaciones amerindias ya que una distribución alélica similar se reportó anteriormente en otras poblaciones de nativos americanos, incluyendo Ticuna (América del Sur) y Cheyenne (América del Norte) (Tishkoff, Goldman et al. 1998). Al observar los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales, se hace evidente una mayor influencia de los grupos nativo-americanos en nuestra población, aunque al mostrarse en el centro de las coordenadas se confirma también la influencia europea en menor medida. Este análisis permite determinar que el *background* genético de nuestra población es una combinación ancestral, aunque con mayores niveles de ancestría amerindia. Sin embargo, es interesante observar que entre los mismos grupos étnicos se presentan variaciones genéticas, las cuales pueden deberse a que la afiliación lingüística determinó claramente la subestructura genética de los amerindios, lo que sugiere que la distancia genética y los procesos de afiliación lingüística evolucionaron por separado en los grupos amerindios de México. Se cree que los eventos de flujo génico en regiones geográficamente distantes que se ven afectados por condiciones demográficas e históricas particulares pueden

generar heterogeneidad genética entre y dentro de poblaciones de diferentes zonas de México.

Ahora bien, considerando lo postulado por Tishkoff, la presencia de alelos expandidos son originados a partir de alelos intermedios o largos (alelos normales mayores a 18 repetidos CTG) (Tishkoff, Goldman et al. 1998), esto ha sido corroborado a través de diversos estudios epidemiológicos que confirman que las poblaciones que presentan una alta prevalencia de DM1 correlacionan con una mayor presencia de alelos intermedios o largos. Estos datos son de gran relevancia, ya que a pesar de no contar con estudios epidemiológicos en nuestra población, se sugiere que la prevalencia de esta enfermedad podría ser comparable a poblaciones de origen caucásico o poblaciones Japonesas. Es posible reforzar esta hipótesis con el hecho de que en un pequeño periodo de tiempo se pudo identificar un número considerable de individuos con esta mutación. Aunado a esto, identificamos dos alelos premutados en sujetos amerindios y observamos una frecuencia relativamente alta de alelos largos normales en Mayas, Popolucas y Nahuas, así como un par de sujetos con premutación de población mestiza-mexicano (**Tabla 6**). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de una posible alta presencia de la mutación en nuestra población. Curiosamente, ningún paciente con DM1 ha sido identificado en las poblaciones indígenas de México, lo que podría deberse en parte a la falta de servicios clínicos y de diagnóstico en comunidades aisladas. Se necesitan más estudios clínicos y genéticos como el genotipado de marcadores mitocondriales, en muestras de poblaciones mestizas y amerindias más grandes y bien caracterizadas.

7.2. La identificación de una extensa cohorte de pacientes con DM1

Sabiendo que el estudio poblacional sugiere una alta prevalencia de DM1 en México y que teníamos buenas posibilidades de captar una cohorte

importante de pacientes con DM1, procedimos a la evaluación de casos índice con características clínicas sugestivas de DM1 en el INR, el cual constituye un centro de referencia nacional de enfermedades neuromusculares. Se realizó la captación de un grupo de individuos con sintomatología afín a DM1 y de sus familiares de primer y segundo grado. Para el diagnóstico molecular se utilizó la combinación de dos técnicas: una PCR fluorescente y una TP-PCR, ambas analizadas a través de electroforesis capilar. La electroforesis capilar se seleccionó debido que es una técnica de separación de biomoléculas altamente sensible (Liu and Gomez 2009, Magana, Arenas-Sordo et al. 2009). Posteriormente, se realizó una técnica conocida como Small Pool PCR (SP-PCR) con lo que se puede determinar el tamaño aproximado de repetidos CTG en alelos expandidos. El conjunto de técnicas moleculares para la identificación de repetidos CTG desarrollados para el presente proyecto conforman la técnica diagnóstica única para la determinación de DM1 en nuestro país, por lo que es importante mencionar las ventajas en el desarrollo de estas tecnologías.

La identificación precisa del tamaño de los alelos es extremadamente importante debido a las implicaciones en el pronóstico clínico y reproductivo de estos individuos en estudio, ya que la diferencia de algunos pares de bases en alelos cortos o intermedios implica la diferencia entre un alelo normal y uno con premutación o más aún la diferencia entre una premutación y una mutación. Sin embargo debido a la procesividad de la Taq polimerasa y al método de análisis de los fragmentos basado en la detección de fluorescencia, esta metodología tiene un límite de detección de ~100 repetidos CTG (Radvansky and Kadasi 2010). Esta desventaja, lleva a realizar modificaciones en el estudio para poder tener un diagnóstico confiable, para ello se utilizó la técnica de TP-PCR que fue originalmente desarrollada por Warner y colaboradores (Warner, Barron et al. 1996) y tiene la capacidad de identificar de forma rápida la presencia de alelos expandidos en cualquier enfermedad causada por expansión de trinucleótidos o

tetranucleótidos, lo que la convierte en una técnica accesible para el análisis molecular de rutina de este tipo de padecimientos. Aunque no es capaz de determinar el tamaño exacto de los repetidos después de cierto límite, puede distinguir con absoluta precisión a los homocigotos sanos y heterocigotos afectados sin límite de restricción, por lo que la hace una técnica 100% efectiva para la determinación diagnóstica de DM1.

En la TP-PCR la especificidad en la amplificación es asegurada por el oligonucleótido de secuencia específica P1, mientras que la utilización de un segundo oligonucleótido dirigida a la secuencia de repetidos, tiene como objetivo amplificar a partir de múltiples sitios de unión dentro de la región de repetidos CTG generando diversos fragmentos de longitud variable, en tanto que el tercer oligonucleótido reamplifica los segmentos previamente sintetizados de tal forma que aumenta la eficacia de la PCR. Dicha combinación de oligonucleótidos produce una serie de amplicones que al ser analizados por electroforesis capilar producen un corrimiento en forma de escalera con una periodicidad de 3 nucleótidos, en donde la intensidad de la señal disminuye conforme aumenta el tamaño del amplicón, con lo que se puede discernir si un individuo presenta expansiones anormales o no (Warner, Barron et al. 1996, Magana, Cortes-Reynosa et al. 2011). La combinación de estos dos métodos de amplificación analizados a través de electroforesis capilar, constituyen una aproximación eficiente para el diagnóstico de la DM1 con un bajo coste y en un tiempo reducido, optimizando así tiempo y recursos para la realización de un diagnóstico de rutina. Cabe mencionar que los beneficios inmediatos que se obtuvieron en el caso de los individuos fue per se la confirmación molecular de su diagnóstico, siendo que muchos de los pacientes con miotonía y/o debilidad llevaban años sin tener una certeza diagnóstica. Este diagnóstico permite que los pacientes tengan acceso a las estrategias terapéuticas recomendadas hasta el momento, las cuales impactarán a mediano y largo plazo en un mejor

pronóstico y calidad de vida de los pacientes, así como en una mejor planeación de su vida reproductiva después haber recibido el asesoramiento genético correspondiente.

Tomando como base la posibilidad de realizar un estudio diagnóstico confiable y la factibilidad de reclutar pacientes procedimos a la identificación de la mutación en el gen *DMPK*. A partir del análisis de 630 individuos se identificaron 340 individuos portadores de una mutación mayor a 50 repetidos CTG en el gen *DMPK*, el resto son individuos con repetidos CTG dentro de parámetros normales (5 a 34 repetidos CTG). Esta cohorte identificada conforma posiblemente la cohorte más grande de pacientes analizadas en Latinoamérica. Al clasificar a los pacientes de acuerdo a la edad de inicio de la sintomatología encontramos que 20 pacientes presentaron la forma congénita de la enfermedad, 23 tuvieron un inicio infantil y 267 un inicio clásico. Un dato muy relevante es que 30 de los individuos positivos para la mutación permanecen asintomáticos, es decir, aún no desarrollaron manifestaciones clínicas de la enfermedad. Este grupo de individuos asintomáticos portadores de la mutación para DM1 constituyen un referente muy valioso de estudio para la búsqueda de las primeras señales clínicas (signos o síntomas) en etapas iniciales de la enfermedad, así como la identificación de biomarcadores predictivos del desarrollo de la enfermedad. Hasta la fecha no existen reportes a cerca de una detallada caracterización clínica, neurológica, neurofisiológica y de imagen en este grupo de pacientes (Kim, Kim et al. 2008), sin embargo en otras patologías se han podido caracterizar síntomas iniciales de la enfermedad con gran eficacia (Montes-Brown, Machado et al. 2012, Storey 2013, Wu, Wang et al. 2013, Velazquez-Perez, Rodriguez-Labrada et al. 2014), sugiriendo posibles biomarcadores de la patología, así como signos prodromales de la enfermedad, con lo que es posible realizar un seguimiento del curso de la patología.

7.3. Caracterización de los signos en etapas iniciales de la DM1

La percepción asintomática de los pacientes es subjetiva, ya que muchos individuos pueden presentar síntomas patológicos, sin que el paciente refiera alguna complicación. Por lo tanto, a través de estudios que valoran la fuerza muscular y la presencia de descargas miotónicas, solo se seleccionaron 16 individuos sin presentación de síntomas asociados con la enfermedad. Como era de esperarse la mayoría de estos individuos presentaron alelos mutados menores a 100 repetidos CTG. Sin embargo, 2 individuos sobrepasaron el límite de resolución de la técnica (~130 repetidos) por lo que se procedió a la estandarización de una variante de PCR conocida como SP-PCR. Monckton y colaboradores describieron a la SP-PCR como una forma de caracterizar la inestabilidad dinámica del repetido CTG en células somáticas y germinales en varones con DM1, demostrando que las bandas observadas en el análisis mediante otras técnicas de hibridación están formadas por múltiples bandas correspondientes a los alelos con diferente número de repetidos a consecuencia de la inestabilidad que presenta la expansión (Monckton, Wong et al. 1995, Gomes-Pereira, Bidichandani et al. 2004, Morales, Couto et al. 2012). En general la SP-PCR es un método eficiente basado en una serie de diluciones que permiten caracterizar con mayor precisión el alelo más frecuente, la presencia de mosaicismo y más recientemente el tamaño del alelo progenitor.

El resultado de SP-PCR reveló que uno de los individuos poseía una expansión de 295 repetidos CTG y el otro 514 repetidos CTG, esto llama mucho la atención ya que por el tamaño de la expansión podría esperarse que ya presentarían algún dato de miotonía o debilidad, pero no fue así. La explicación a esta particularidad la pudimos dilucidar en el corrimiento electroforético de la TP-PCR que en ambos casos demostró la presencia de *gaps* correspondiente a interrupciones de repetidos de secuencia diferente a CTG. Estos *gaps* se deben

a que el *primer* de la TP-PCR dirigido a los repetidos CTG no hibrida si hay cambios en la secuencia y por lo tanto no se obtienen amplicones en este fragmento en donde la secuencia no es complementaria, al realizar la electroforesis capilar la ausencia de amplicones se observa como *gaps* en la escalera típicamente observada en un individuo con expansión anormal. La secuencia de la región analizada confirmó la presencia de repetidos CAA.

La identificación de estos alelos complejos en el gen *DMPK* tiene implicaciones a nivel del asesoramiento genético y el diagnóstico molecular, ya que en estos casos la TP-PCR podría dar falsos negativos. Además de que los pacientes con alelos con interrupciones pueden manifestar tanto síntomas neurológicos atípicos, como formas leves de la patología de inicio tardío. Por lo tanto el pronóstico para estos pacientes es difícil de determinar debido a lo incierto de la correlación genotipo-fenotipo (Santoro, Masciullo et al. 2017). Son pocos los individuos descritos en la literatura con interrupciones y solamente en una de las familias el fenotipo es significativamente diferente a lo descrito para la DM1 clásica (Braidă, Stefanatos et al. 2010), en esta familia el fenotipo incluyó un espectro neurológico variable que incluye neuropatía tipo Charcot-Marie-Tooth (CMT), pérdida de audición temprana y encefalopatía. Los primeros estudios del probable efecto de la estabilización de las interrupciones sobre la replicación del DNA hipotetizan que las interrupciones pueden alterar la afinidad por las proteínas de splicing involucradas en la patogénesis de la DM1 (Musova, Mazanec et al. 2009). Además se ha postulado que pueden interferir con la estructura de la cromatina, la actividad transcripcional del locus DM1 y la interacción de la secuencia CUG del RNA con las proteínas (Santoro, Masciullo et al. 2017).

Cabe mencionar que estos individuos no están emparentados y a pesar de la baja frecuencia de interrupciones reportadas para DM1 en este grupo de

estudio tuvimos la oportunidad de evaluar 2 casos presintomáticos con presencia de interrupciones.

Ya que teníamos caracterizado el grupo de individuos presintomáticos procedimos a la búsqueda de biomarcadores clínicos y moleculares. Debido a que la DM1 se caracteriza por su afectación a nivel de músculo esquelético decidimos realizar una evaluación detallada a este nivel en búsqueda de datos clínicos tempranos que nos hablara de que está sucediendo en las etapas incipientes de la enfermedad. Se evaluaron 8 grupos musculares con EMG y encontramos que nueve de estos individuos ya presentaban alteraciones de fibra muscular caracterizadas por descargas atípicas leves, diferentes a las que normalmente se encuentran en DM1, la mayoría las presentó sólo en uno de los músculos evaluados, incluso de forma unilateral, dos pacientes tuvieron afectación en dos músculos y solamente uno tuvo afectación en 4 músculos. Aunque los músculos afectados tuvieron una distribución heterogénea, los más frecuentes fueron paracervicales y vasto medial.

Estos cambios a nivel de fibra muscular podrían indicar que ya hay desregulación de *splicing* alternativo afectando genes como *CLCN1* en donde la disminución de la inclusión del exón 7a afecta la conductancia del ion en el canal de cloro, provocando un retraso en la relajación de la fibra muscular (Acket, Lepage et al. 2016). Este gen es el que se ha relacionado principalmente a la presencia de descargas miotónicas por lo que si presenta inicios de alteraciones de *splicing* pudiera estar implicado también en estas descargas atípicas leves (Nakamori, Sobczak et al. 2013). Es muy importante mencionar que a nivel de amplitud, prácticamente en todos los casos se encontró conservada, lo que nos habla que la fuerza muscular esta conservada y que los cambios encontrados aún son subclínicos.

Después de buscar biomarcadores a nivel de músculo esquelético decidimos evaluar músculo liso ya que es bien sabido que la disfagia es un síntoma común que puede ser difícil de diagnosticar y tratar. Además de que está fuertemente asociada al incremento de la morbi-mortalidad y a la disminución en la calidad de vida, baja autoestima y pobre participación social. Aunque la disfagia ha sido ampliamente descrita en varias distrofias musculares, incluyendo la DM1, no existen reportes detallados de evaluación de la deglución en etapas tempranas de la enfermedad, ni una correlación con la evaluación detallada de músculo esquelético.

Aunque la disfagia es uno de los síntomas que más comprometen la vida en la DM1, pudimos darnos cuenta que los pacientes no perciben alteraciones de la deglución como un problema de salud, incluso cuando fueron interrogados directamente al respecto mediante el cuestionario *dysphagia handicap index*. La falta de percepción se asocia con una progresión crónica, posiblemente desde etapas tempranas de la enfermedad, por lo que los pacientes no identifican alteraciones orofaríngeas evidentes.

A pesar de la ausencia de compromiso de músculos distales como resultado de la evaluación de músculo esquelético, la FEES mostró que en individuos presintomáticos había diferencias significativas para retraso del reflejo, derrame posterior y deglución fraccionada en comparación con el grupo de individuos sanos pareados por edad y sexo. Lo que nos indica que el músculo liso presenta afectación durante las etapas iniciales de la patología y que probablemente se desarrollan antes que las alteraciones de músculo esquelético, dichas alteraciones pueden presentarse debido a la disminución de la sensibilidad y debilidad de los músculos faríngeos.

Por otro lado no todas las variables estudiadas en FEES presentaron afectación en presintomáticos. La aspiración y la penetración sólo se

encontraron con cambios significativos en el grupo de DM1 clásica respecto del grupo control, éstas son las formas más graves de disfagia y por lo tanto nos indica que aunque hay presencia de disfagia en presintomáticos, no es tan grave como en la forma clásica de la enfermedad. Sin embargo si requiere manejo, terapia física y prevención de las complicaciones.

De acuerdo a lo documentado en la literatura, estos cambios pueden explicarse por la presencia de mosaicismo somático, ya que se ha reportado en la literatura que individuos con 70 a 90 repetidos CTG en DNA extraído de leucocitos pueden tener cientos e incluso miles de repetidos a nivel de músculo esquelético (Nakamori, Sobczak et al. 2013). Y estas expansiones podrían ya estar causando alteraciones de splicing en genes de metabolismo muscular como *TTN*, *RYR1*, *CAMK2B*, *ARFGAP2* y *CLCN1*, entre otros. Hace falta realizar más estudios de caracterización de *splicing* y número de repetidos a nivel de músculo liso, ya que son pocos los estudios en la literatura que contemplan los cambios a este nivel.

Se ha demostrado que una intervención a tiempo puede evitar que el desarrollo de las complicaciones de la DM1 puedan aparecer de manera prematura, por lo que una rehabilitación adecuada en etapas iniciales de la patología podría proveer una mejor función muscular y por ende una mayor calidad de vida. La importancia de estos datos se hace aún más relevante, al demostrar que la severidad de los aspectos foniatrícos no presentan una correlación directa con el tiempo de evolución o número de repetidos, esto nos lleva a hipotetizar que las complicaciones foniatricas aparecen desde la etapa inicial de la patología, la cual se incrementa de manera crónica desde el tiempo de aparición inicial.

7.4. miRNAs como posibles biomarcadores de DM1

A fin de identificar biomoléculas para monitorear la progresión de la enfermedad, que sean objetivos, cuantificables, no invasivos y que reflejen la fisiopatología en evolución, en los últimos años se han propuesto a los microRNAs como posibles biomarcadores. En los últimos años se han analizado múltiples estudios en los que se han descrito alteraciones en la expresión de múltiples miRNAs tanto en modelos animales como en pacientes con DM1. Cabe resaltar que éste es el primer estudio que analiza cambios de expresión de miRNAs en etapas iniciales de la patología, incluso en etapas presintomáticas. El análisis de miRNAs es de gran valor ya que al ser un análisis no invasivo, que puede ser realizado en un laboratorio clínico de manera rápida por una técnica convencional, pueden ser utilizados como marcadores eficientes.

Además se ha visto que los cambios en la expresión de los microRNAs podría ser un reflejo de lo que está ocurriendo en un tejido específico. Para esta etapa de la investigación decidimos evaluar los 8 miRNA reportados en el metaanálisis de la Dra. Perfetti y colaboradores, incluyendo *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-206*, *miR-27b*, *miR-140-3p*, *miR-454* y *miR-574* (Perfetti, Greco et al. 2016), comparados contra un control exógeno (cel-miR-39) y 2 endógenos (*miR-106a* y *miR-17-5p*). *miR-106a* mostró mayor estabilidad en su expresión durante todos los ensayos. De acuerdo a lo recomendado por la Dra. Perfetti se puso especial atención en el control de las variables, previo a la toma de muestra, los participantes estaban en ayuno, no habían realizado actividad física 3 días antes de la toma de muestra y no tomaban ningún medicamento.

Conforme a lo esperado en el grupo de pacientes con DM1 encontramos que *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b*, *miR-206*, *miR-140*, *miR-574* y *miR-27b* estaban sobreexpresados respecto al grupo control (Perfetti, Greco et al. 2016). Y el mayor aumento lo presentaron *miR-1*, *miR-133a* y *miR-133b* que son los

miRNAs involucrados en la degeneración muscular y son liberados por las fibras apoptóticas. Esto nos habla de que los individuos con DM1 clásica presentan debilidad y un importante compromiso muscular, lo que correlaciona con los datos observados durante la valoración clínica. miR-454 no mostró diferencias significativas, esto probablemente esté en relación al tamaño de la muestra o a las diferencias de edad, tiempo de evolución y edad de inicio de la patología en comparación con los grupos previamente reportados. La sobreexpresión de miR-206 podría hablarnos de un potencial estado de regeneración (Fritegotto, Ferrati et al. 2017).

Un hallazgo muy relevante fue que en individuos presintomáticos observamos que existe una sobreexpresión significativa respecto del grupo control de los miRNAs: miR-1, miR-133a, miR-206, miR-140 y miR-27b. Lo que es un indicativo de que estos marcadores se encuentran alterados en etapas tempranas de la enfermedad y que deben seguir siendo valorados en estudios longitudinales para conocer su comportamiento durante la progresión de la enfermedad y sus cambios frente a intervenciones terapéuticas. miR-1, miR-206 y miR133a/b pertenecen a los llamados miomiRNAs, los cuales se sobreexpresan de manera específica durante la miogénesis y diferenciación de músculo cardíaco y esquelético. Se ha demostrado que miR1 y miR206 promueven la diferenciación a través de la inhibición de la desacetilasa de histona 4 (HDAC4), mientras que miR133 promueve la proliferación posiblemente inhibiendo el factor de respuesta de suero (SRF), el cual es un factor de transcripción que se une a elementos de respuesta a suero del tipo C-Fos. La miogénesis en el músculo esquelético es coordinada por la activación de factores reguladores (MRFs) en respuesta a reguladores corriente arriba. Los blancos de miR-1 y miR-206 en mioblastos incluyen follistatina, utrofina y ciclina D1 y en células satélites a Pax3 y Pax7 requeridos para mantener la proliferación celular (Falcone, Perfetti et al. 2014). Pax3 y Pax7 son inhibidos

también por miR-206 quien se dirigen a las secuencias blanco en la región 3'UTR de ambos mensajeros. El 3'UTR del ARNm de Pax3 también tiene una secuencia blanco para miR-1, pero este tiene menos efecto. El impacto de miR-206 sobre la proliferación parece depender de PAX3, pero sorprendentemente no de PAX7. miR-27 también se dirige a la 3'UTR del mensajero de Pax3, este miRNA está presente en células satélite y se acumula antes de la diferenciación. (Buckingham and Relaix 2015). Otro dato interesante es que la expresión de miR-206 se encuentra prácticamente en los mismos niveles en los individuos con DM1 y los individuos presintomáticos, como mencionamos antes este dato podría estar en relación al proceso de regeneración muscular que puede activarse en respuesta al daño muscular o probablemente sea un indicador asociado a la progresión lenta de la enfermedad, se requiere de más estudios para el mejor entendimiento de estos mecanismos.

Estos hallazgos aunados a la inestabilidad somática de cada individuo, la cual se ha visto que tiene un alto componente hereditario, constituyen hasta ahora el mejor abordaje predictivo del desarrollo de la sintomatología, sin embargo aún falta mucho por dilucidar. La determinación del alelo progenitor es un buen acercamiento para el estudio de la correlación genotipo-fenotipo y aprovechando la colección de pacientes y familias disponibles en este estudio también sería una buena forma de abordar los estudios de segregación, la correlación con los cambios en la expresión en diferentes tejidos y la relación con la presencia de biomarcadores. Éste trabajo representa la aplicación directa que tiene la biología molecular en el diagnóstico definitivo de enfermedades hereditarias en humanos y las aportaciones de la investigación clínica y molecular al mejor entendimiento de los mecanismos moleculares patogénicos. Es de resaltar el gran esfuerzo multidisciplinario que llevó a la captación y manejo exitoso de pacientes con DM1.

8. CONCLUSIONES.

Se genotipificaron 638 mestizos mexicanos y 561 nativo americanos, encontrando una alta frecuencia de alelos largos normales y 4 individuos con premutación. Lo que nos sugiere una posible alta prevalencia de la enfermedad en nuestra población.

Se conjuntó un grupo de más de 80 familias con DM1, conformando uno de los estudios familiares más extensos a nivel mundial.

Se captó una cohorte de 340 individuos positivos para DM1.

Se identificaron 16 individuos presintomáticos con expansión anormal de repetidos CTG, considerados como un grupo susceptible de estudio para búsqueda de biomarcadores

Se estandarizó de la técnica SP-PCR para la determinación del alelo progenitor en los pacientes con DM1.

Se buscaron marcadores clínicos a nivel de músculos esquelético y músculo liso. Encontrando datos de compromiso muscular a nivel electromiográfico y presencia de disfagia durante las etapas iniciales de la DM1. Estos hallazgos han sido reportados en la literatura.

En DM1 clásica se encontró sobreexpresión en plasma de los miRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-140, miR-574 y miR-27b.

En individuos presintomáticos se encontraron sobreexpresados miR-1, miR-133a, miR-206, miR-140 y miR-27b, lo que sugiere que estos biomarcadores se encuentran alterados desde etapas iniciales de la enfermedad.

9. PERSPECTIVAS.

Complementar el estudio poblacional con marcadores mitocondriales

Realizar Small Pool-PCR en la muestra total de individuos afectados para determinar tamaño del alelo progenitor.

Realizar el análisis parental de la transmisión.

Realizar determinación de número de repetidos en músculos esquelético y en músculo liso para establecer una posible relación genotipo-fenotipo.

Realizar ensayos para determinar cambios en el *splicing* alternativo en músculo esquelético y músculo liso para entender la patogénesis en la evolución de la enfermedad.

Realizar un estudio longitudinal evaluando la presencia de marcadores clínicos y moleculares para caracterizar mejor la progresión de la enfermedad y la respuesta a posibles tratamientos.

ANEXO 1



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION SERVICIO DE GENETICA PROTOCOLO Distrofia Miotonica

No. Expediente: _____ Fecha: _____

Nombre: _____

Domicilio: _____

Teléfono: _____ L. origen: _____

Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____ Sexo: M F

Edad de inicio: _____ AHF: SI No

Favor de realizar el Arbol genealógico al reverso indicando la edad de inicio de otros afectados

CARA

Alopecia frontal

Facies Inexpresiva

MUSCULO

Debilidad en cara

Ptoxis

Maseteros

Debilidad en Cuello

Esternomastoides

Flexores

Debilidad Proximal

Deltoides

Cuadriceps

Intercostales

Debilidad Distal

Mano

Muñeca

Pie

Tobillo

Debilidad Generalizada

Fatiga

Marcha claudicante

Hipotrofia

Cara

M. Superiores

M. Inferiores

Miotonia

Hiporreflexia

+

++

+++

++++

Dolor muscular

SNC

Personalidad evasiva

Personalidad pasiva-agresiva

Apatía

Depresión

Ansiedad

Retardo mental

Disartria

Hipersomnía

Apneas nocturnas

Cambios subcorticales en materia blanca por RMN

OJOS

Catarata (Lámpara de hendidura)

Subcapsular posterior

Múltiple

Punctata

Degeneración retiniana

Tensión intraocular baja

ENDOCRINO

Atrofia testicular

Oligospermia

Pérdida fetal frecuente

Complicaciones mayores

RESPIRATORIO

Hipoventilación

Neumonía

CARDIACO (ECG)

Defectos de conducción

Taquiarritmias

GASTROINTESTINAL

Disfagia

Diarrea

Constipación

Megacolon

Pseudo-obstrucción

Cálculos biliares

LABORATORIO

CPK:

Glucosa:

Testosterona:

FSH:

EMG

Descargas miotónicas

ARBOL GENEALOGICO
[Favor de indicar edad actual y edad de inicio de los afectados]

ANEXO 2



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PROTOCOLO DE Distrofia Miotónica



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 'GENOMICA DE LA Distrofia Miotónica Tipo 1 (DM1): IDENTIFICACION DE GENES CON POTENCIAL TERAPEUTICO PARA LA DM1 MEDIANTE MICROARREGLOS DE DNA Y ANALISIS PROTEOMICO' 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: _____

MEDICO SOLICITANTE: DR. NORBERTO LEYVA GARCÍA

FIRMA: _____

RESPONSABLE DEL PROYECTO: DR. EN C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE

FIRMA:

ANEXO 3

Dysphagia Handicap Index

Nombre: _____ No. Expediente: _____

Edad: _____ Fecha: _____

	Nunca	A veces	Siempre
1P Toso cuando tomo líquidos (agua, té, café, etc)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2P Toso cuando como alimentos sólidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3P Siento reseca la boca.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4P Necesito tomar líquidos (agua) para poder pasar o los alimentos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5P He perdido peso por mi problema de deglución.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1F Evito comer algunos alimentos debido a mi problema de deglución.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2F He cambiado mi forma de deglutir o tragar (pasar) los alimentos para hacer más fácil comer.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1E Me avergüenza comer en público.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3F Me tardo más tiempo en comer de lo que tardaba antes.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4F Como comidas más pequeñas debido a mi problema de deglución.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6P Tengo que tragar nuevamente para que la comida baje completamente antes de volver a tomar otro bocado.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2E Me siento deprimido porque no puedo comer lo que quiero.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3E No disfruto tanto comer como lo disfrutaba antes.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5F No socializo mucho debido a mi problema de deglución (salir con amigos, al cine, etc).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6F Evito comer debido a mi problema de deglución	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7F Como menos debido a mi problema de deglución	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4E Me siento nervioso debido a mi problema de deglución	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5E Me siento discapacitado debido a mi problema de deglución.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6E Me siento molesto conmigo mismo debido a mi problema de deglución.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7P Siento que me ahogo cuando tomo algún medicamento (tableta, jarabe).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7E Me da miedo dejar de respirar y ahogarme cuando como.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8F Debo alimentarme otra manera debido a mi problema de deglución (tubo de alimentación, sonda de gastrostomía).	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9F He cambiado mi dieta debido a mi problema de deglución.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8P Tengo una sensación de atragantamiento cuando como.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9P Después de comer me da tos hasta que logro expulsar la comida.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1	2	3	4	5	6	7
Normal		Moderado			Severo	
<p>Marque con un círculo el número que corresponda a la gravedad de su dificultad para tragar (1 = ninguna dificultad en absoluto; 4 = algo de problema; 7 = el peor problema que podría tener)</p>						

BIBLIOGRAFÍA

- Acket, B., B. Lepage, P. Maury, M. C. Arne-Bes and P. Cintas (2016). "Chloride channel dysfunction study in myotonic dystrophy type 1 using repeated short exercise tests." *Muscle Nerve* **54**(1): 104-109.
- Amack, J. D., S. R. Reagan and M. S. Mahadevan (2002). "Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD." *J Cell Biol* **159**(3): 419-429.
- Ashizawa, T. and P. S. Sarkar (2011). "Myotonic dystrophy types 1 and 2." *Handb Clin Neurol* **101**: 193-237.
- Barnes, P. R., D. Hilton-Jones, G. Norbury, A. Roberts and S. M. Huson (1994). "Incorrect diagnosis of myotonic dystrophy and its potential consequences revealed by subsequent direct genetic analysis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**(5): 662.
- Bellini, M., S. Biagi, C. Stasi, F. Costa, M. G. Mumolo, A. Ricchiuti and S. Marchi (2006). "Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy." *World J Gastroenterol* **12**(12): 1821-1828.
- Braida, C., R. K. Stefanatos, B. Adam, N. Mahajan, H. J. Smeets, F. Niel, C. Goizet, B. Arveiler, M. Koenig, C. Lagier-Tourenne, J. L. Mandel, C. G. Faber, C. E. de Die-Smulders, F. Spaans and D. G. Monckton (2010). "Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients." *Hum Mol Genet* **19**(8): 1399-1412.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, H. G. Harley, A. J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V. P. Stanton, J. P. Thirion, T. Hudson and et al. (1992). "Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member." *Cell* **69**(2): 385.
- Buckingham, M. and F. Relaix (2015). "PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis." *Semin Cell Dev Biol* **44**: 115-125.
- Bugiardini, E., G. Meola and D.-C. Group (2014). "Consensus on cerebral involvement in myotonic dystrophy: workshop report: May 24-27, 2013, Ferrere (AT), Italy." *Neuromuscul Disord* **24**(5): 445-452.
- Cleary, J. D. and L. P. Ranum (2013). "Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease." *Hum Mol Genet* **22**(R1): R45-51.
- Cleary, J. D. and L. P. Ranum (2014). "Repeat associated non-ATG (RAN) translation: new starts in microsatellite expansion disorders." *Curr Opin Genet Dev* **26**: 6-15.
- Cobo, A. M., J. J. Poza, A. Blanco, A. Lopez de Munain, A. Saenz, M. Azpitarte, J. Marchessi and J. F. Marti Masso (1996). "Frequency of myotonic dystrophy gene carriers in cataract patients." *J Med Genet* **33**(3): 221-223.
- Contreras-Cubas, C., B. E. Sanchez-Hernandez, H. Garcia-Ortiz, A. Martinez-Hernandez, F. Barajas-Olmos, M. Cid, E. C. Mendoza-Caamal, F. Centeno-Cruz, G. Ortiz-Cruz, J. C. Jimenez-Lopez, E. J. Cordova, E. G. Salas-Bautista, Y. Saldana-Alvarez, J. C. Fernandez-Lopez, O. M. Mutchinick and L. Orozco (2016). "Heterogenous Distribution of MTHFR Gene Variants among Mestizos and Diverse Amerindian Groups from Mexico." *PLoS One* **11**(9): e0163248.

Culjkovic, B., O. Stojkovic, S. Vukosavic, D. Savic, V. Rakocevic, S. Apostolski and S. Romac (2002). "CTG repeat polymorphism in DMPK gene in healthy Yugoslav population." *Acta Neurol Scand* **105**(1): 55-58.

Chan, N. L., J. Guo, T. Zhang, G. Mao, C. Hou, F. Yuan, J. Huang, Y. Zhang, J. Wu, L. Gu and G. M. Li (2013). "Coordinated processing of 3' slipped (CAG)_n/(CTG)_n hairpins by DNA polymerases beta and delta preferentially induces repeat expansions." *J Biol Chem* **288**(21): 15015-15022.

Charlet, B. N., R. S. Savkur, G. Singh, A. V. Philips, E. A. Grice and T. A. Cooper (2002). "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." *Mol Cell* **10**(1): 45-53.

Chau, A. and A. Kalsotra (2015). "Developmental insights into the pathology of and therapeutic strategies for DM1: Back to the basics." *Dev Dyn* **244**(3): 377-390.

Chebel, S., K. Ben Hamda, A. Boughammoura, M. Frih Ayed and M. H. Ben Farhat (2005). "[Cardiac involvement in Steinert's myotonic dystrophy]." *Rev Neurol (Paris)* **161**(10): 932-939.

Cheng, A. W., J. Shi, P. Wong, K. L. Luo, P. Trepman, E. T. Wang, H. Choi, C. B. Burge and H. F. Lodish (2014). "Muscleblind-like 1 (Mbnl1) regulates pre-mRNA alternative splicing during terminal erythropoiesis." *Blood* **124**(4): 598-610.

Dasgupta, T. and A. N. Ladd (2012). "The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**(1): 104-121.

de Die-Smulders, C. E., C. J. Howeler, C. Thijs, J. F. Mirandolle, H. B. Anten, H. J. Smeets, K. E. Chandler and J. P. Geraedts (1998). "Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy." *Brain* **121** (Pt 8): 1557-1563.

de Haro, M., I. Al-Ramahi, B. De Gouyon, L. Ukani, A. Rosa, N. A. Faustino, T. Ashizawa, T. A. Cooper and J. Botas (2006). "MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1." *Hum Mol Genet* **15**(13): 2138-2145.

de Koning, A. P., W. Gu, T. A. Castoe, M. A. Batzer and D. D. Pollock (2011). "Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome." *PLoS Genet* **7**(12): e1002384.

Di Prospero, N. A. and K. H. Fischbeck (2005). "Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases." *Nat Rev Genet* **6**(10): 756-765.

Dragileva, E., A. Hendricks, A. Teed, T. Gillis, E. T. Lopez, E. C. Friedberg, R. Kucherlapati, W. Edelmann, K. L. Lunetta, M. E. MacDonald and V. C. Wheeler (2009). "Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes." *Neurobiol Dis* **33**(1): 37-47.

Du, H., M. S. Cline, R. J. Osborne, D. L. Tuttle, T. A. Clark, J. P. Donohue, M. P. Hall, L. Shiue, M. S. Swanson, C. A. Thornton and M. Ares, Jr. (2010). "Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy." *Nat Struct Mol Biol* **17**(2): 187-193.

Falcone, G., A. Perfetti, B. Cardinali and F. Martelli (2014). "Noncoding RNAs: emerging players in muscular dystrophies." *Biomed Res Int* **2014**: 503634.

Falk, M., M. Vojtiskova, Z. Lukas, I. Kroupova and U. Froster (2006). "Simple procedure for automatic detection of unstable alleles in the myotonic dystrophy and Huntington's disease loci." Genet Test **10**(2): 85-97.

Fardaei, M., M. T. Rogers, H. M. Thorpe, K. Larkin, M. G. Hamshere, P. S. Harper and J. D. Brook (2002). "Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells." Hum Mol Genet **11**(7): 805-814.

Fernandez-Costa, J. M., B. Llamusi, A. Bargiela, M. Zulaica, M. C. Alvarez-Abril, M. Perez-Alonso, A. Lopez de Munain, A. Lopez-Castel and R. Artero (2016). "Six Serum miRNAs Fail to Validate as Myotonic Dystrophy Type 1 Biomarkers." PLoS One **11**(2): e0150501.

Fritegotto, C., C. Ferrati, V. Pegoraro and C. Angelini (2017). "Micro-RNA expression in muscle and fiber morphometry in myotonic dystrophy type 1." Neurol Sci **38**(4): 619-625.

Fu, Y. H., A. Pizzuti, R. G. Fenwick, Jr., J. King, S. Rajnarayan, P. W. Dunne, J. Dubel, G. A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong and et al. (1992). "An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy." Science **255**(5049): 1256-1258.

Gannon, A. M., A. Frizzell, E. Healy and R. S. Lahue (2012). "MutSbeta and histone deacetylase complexes promote expansions of trinucleotide repeats in human cells." Nucleic Acids Res **40**(20): 10324-10333.

Garrott, H. M., M. J. Walland and J. O'Day (2004). "Recurrent posterior capsular opacification and capsulorhexis contracture after cataract surgery in myotonic dystrophy." Clin Exp Ophthalmol **32**(6): 653-655.

Gennarelli, M., G. Novelli, F. Andreasi Bassi, L. Martorell, M. Cornet, E. Menegazzo, M. L. Mostacciuolo, J. M. Martinez, C. Angelini, A. Pizzuti, M. Baiget and B. Dallapiccola (1996). "Prediction of myotonic dystrophy clinical severity based on the number of intragenic [CTG]_n trinucleotide repeats." American Journal of Medical Genetics **65**(4): 342-347.

Gladman, J. T., R. S. Yadava, M. Mandal, Q. Yu, Y. K. Kim and M. S. Mahadevan (2015). "NKX2-5, a modifier of skeletal muscle pathology due to RNA toxicity." Hum Mol Genet **24**(1): 251-264.

Goers, E. S., J. Purcell, R. B. Voelker, D. P. Gates and J. A. Berglund (2010). "MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing." Nucleic Acids Res **38**(7): 2467-2484.

Gomes-Pereira, M., S. I. Bidichandani and D. G. Monckton (2004). "Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction." Methods Mol Biol **277**: 61-76.

Gomes-Pereira, M., M. T. Fortune, L. Ingram, J. P. McAbney and D. G. Monckton (2004). "Pms2 is a genetic enhancer of trinucleotide CAG/CTG repeat somatic mosaicism: implications for the mechanism of triplet repeat expansion." Hum Mol Genet **13**(16): 1815-1825.

Guo, J., L. Chen and G. M. Li (2017). "DNA mismatch repair in trinucleotide repeat instability." Sci China Life Sci **60**(10): 1087-1092.

Guo, J., L. Gu, M. Leffak and G. M. Li (2016). "MutSbeta promotes trinucleotide repeat expansion by recruiting DNA polymerase beta to nascent (CAG)_n or (CTG)_n hairpins for error-prone DNA synthesis." Cell Res **26**(7): 775-786.

Guo, S., Y. Zhang, F. Yuan, Y. Gao, L. Gu, I. Wong and G. M. Li (2006). "Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation." *J Biol Chem* **281**(31): 21607-21616.

Han, H., M. Irimia, P. J. Ross, H. K. Sung, B. Alipanahi, L. David, A. Golipour, M. Gabut, I. P. Michael, E. N. Nachman, E. Wang, D. Trcka, T. Thompson, D. O'Hanlon, V. Slobodeniuc, N. L. Barbosa-Morais, C. B. Burge, J. Moffat, B. J. Frey, A. Nagy, J. Ellis, J. L. Wrana and B. J. Blencowe (2013). "MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming." *Nature* **498**(7453): 241-245.

Ho, T. H., D. Bundman, D. L. Armstrong and T. A. Cooper (2005). "Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* **14**(11): 1539-1547.

Jain, A. and R. D. Vale (2017). "RNA phase transitions in repeat expansion disorders." *Nature* **546**(7657): 243-247.

Jakovcevski, M. and S. Akbarian (2012). "Epigenetic mechanisms in neurological disease." *Nat Med* **18**(8): 1194-1204.

Joseph, J. T., C. S. Richards, D. C. Anthony, M. Upton, A. R. Perez-Atayde and P. Greenstein (1997). "Congenital myotonic dystrophy pathology and somatic mosaicism." *Neurology* **49**(5): 1457-1460.

Kadyrov, F. A., L. Dzantiev, N. Constantin and P. Modrich (2006). "Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair." *Cell* **126**(2): 297-308.

Kalsotra, A. and T. A. Cooper (2011). "Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing." *Nat Rev Genet* **12**(10): 715-729.

Kalsotra, A., R. K. Singh, P. Gurha, A. J. Ward, C. J. Creighton and T. A. Cooper (2014). "The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue, dramatically altering miRNA and mRNA expression." *Cell Rep* **6**(2): 336-345.

Kalsotra, A., K. Wang, P. F. Li and T. A. Cooper (2010). "MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development." *Genes Dev* **24**(7): 653-658.

Kalsotra, A., X. Xiao, A. J. Ward, J. C. Castle, J. M. Johnson, C. B. Burge and T. A. Cooper (2008). "A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20333-20338.

Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, A. Mankodi, C. Lungu, C. A. Thornton, D. Esson, A. M. Timmers, W. W. Hauswirth and M. S. Swanson (2003). "A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy." *Science* **302**(5652): 1978-1980.

Kanadia, R. N., C. R. Urbinati, V. J. Crusselle, D. Luo, Y. J. Lee, J. K. Harrison, S. P. Oh and M. S. Swanson (2003). "Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3." *Gene Expr Patterns* **3**(4): 459-462.

Kantartzis, A., G. M. Williams, L. Balakrishnan, R. L. Roberts, J. A. Surtees and R. A. Bambara (2012). "Msh2-Msh3 interferes with Okazaki fragment processing to promote trinucleotide repeat expansions." *Cell Rep* **2**(2): 216-222.

Kim, S. Y., J. Y. Kim, G. P. Kim, J. J. Sung, K. S. Lim, K. W. Lee, J. H. Chae, Y. H. Hong, M. W. Seong and S. S. Park (2008). "Molecular and clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 in Koreans." *Korean J Lab Med* **28**(6): 483-492.

Kimura, T., M. Nakamori, J. D. Lueck, P. Pouliquin, F. Aoike, H. Fujimura, R. T. Dirksen, M. P. Takahashi, A. F. Dulhunty and S. Sakoda (2005). "Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1." Human Molecular Genetics **14**(15): 2189-2200.

Kino, Y., D. Mori, Y. Oma, Y. Takeshita, N. Sasagawa and S. Ishiura (2004). "Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats." Hum Mol Genet **13**(5): 495-507.

Kino, Y., C. Washizu, M. Kurosawa, Y. Oma, N. Hattori, S. Ishiura and N. Nukina (2015). "Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins." Hum Mol Genet **24**(3): 740-756.

Koshelev, M., S. Sarma, R. E. Price, X. H. Wehrens and T. A. Cooper (2010). "Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **19**(6): 1066-1075.

Koutsoulidou, A., T. C. Kyriakides, G. K. Papadimas, Y. Christou, E. Kararizou, E. Z. Papanicolaou and L. A. Phylactou (2015). "Elevated Muscle-Specific miRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress." PLoS One **10**(4): e0125341.

Koutsoulidou, A., M. Photiades, T. C. Kyriakides, K. Georgiou, M. Prokopi, K. Kapnisis, A. Lusakowska, M. Nearchou, Y. Christou, G. K. Papadimas, A. Anayiotos, K. Kyriakou, E. Kararizou, E. Zamba Papanicolaou and L. A. Phylactou (2017). "Identification of exosomal muscle-specific miRNAs in serum of myotonic dystrophy patients relating to muscle disease progress." Hum Mol Genet **26**(17): 3285-3302.

Kumar, A., S. Agarwal, D. Agarwal and S. R. Phadke (2013). "Myotonic dystrophy type 1 (DM1): a triplet repeat expansion disorder." Gene **522**(2): 226-230.

Kunkel, T. A. and D. A. Erie (2005). "DNA mismatch repair." Annu Rev Biochem **74**: 681-710.

Kuyumcu-Martinez, N. M., G. S. Wang and T. A. Cooper (2007). "Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation." Mol Cell **28**(1): 68-78.

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

Ladd, A. N., N. Charlet and T. A. Cooper (2001). "The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing." Mol Cell Biol **21**(4): 1285-1296.

LaDonna, K. A., W. J. Koopman, S. L. Ray and S. L. Venance (2016). "Hard to Swallow: A Phenomenological Exploration of the Experience of Caring for Individuals With Myotonic Dystrophy and Dysphagia." J Neurosci Nurs **48**(1): 42-51.

Lai, Y., H. Budworth, J. M. Beaver, N. L. Chan, Z. Zhang, C. T. McMurray and Y. Liu (2016). "Crosstalk between MSH2-MSH3 and polbeta promotes trinucleotide repeat expansion during base excision repair." Nat Commun **7**: 12465.

Lang, W. H., J. E. Coats, J. Majka, G. L. Hura, Y. Lin, I. Rasnik and C. T. McMurray (2011). "Conformational trapping of mismatch recognition complex MSH2/MSH3 on repair-resistant DNA loops." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(42): E837-844.

- Langmore, S. E., K. Schatz and N. Olsen (1988). "Fiberoptic endoscopic examination of swallowing safety: a new procedure." Dysphagia **2**(4): 216-219.
- Leder, S. B. and J. T. Murray (2008). "Fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing." Phys Med Rehabil Clin N Am **19**(4): 787-801, viii-ix.
- Lee, J. E., J. Y. Lee, J. Wilusz, B. Tian and C. J. Wilusz (2010). "Systematic analysis of cis-elements in unstable mRNAs demonstrates that CUGBP1 is a key regulator of mRNA decay in muscle cells." PLoS One **5**(6): e11201.
- Lee, K. Y., M. Li, M. Manchanda, R. Batra, K. Charizanis, A. Mohan, S. A. Warren, C. M. Chamberlain, D. Finn, H. Hong, H. Ashraf, H. Kasahara, L. P. Ranum and M. S. Swanson (2013). "Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy." EMBO Mol Med **5**(12): 1887-1900.
- Leonard, R. J., K. A. Kendall, R. Johnson and S. McKenzie (2001). "Swallowing in myotonic muscular dystrophy: a videofluoroscopic study." Arch Phys Med Rehabil **82**(7): 979-985.
- Li, F., G. Mao, D. Tong, J. Huang, L. Gu, W. Yang and G. M. Li (2013). "The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α ." Cell **153**(3): 590-600.
- Li, G. M. (2008). "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair." Cell Res **18**(1): 85-98.
- Lin, X., J. W. Miller, A. Mankodi, R. N. Kanadia, Y. Yuan, R. T. Moxley, M. S. Swanson and C. A. Thornton (2006). "Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **15**(13): 2087-2097.
- Liu, X. and F. A. Gomez (2009). "Frontal analysis microchip capillary electrophoresis to study the binding of ligands to receptors derivatized on magnetic beads." Anal Bioanal Chem **393**(2): 615-621.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ C(T)} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lueck, J. D., C. Lungu, A. Mankodi, R. J. Osborne, S. L. Welle, R. T. Dirksen and C. A. Thornton (2007). "Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1." Am J Physiol Cell Physiol **292**(4): C1291-1297.
- Lueck, J. D., A. Mankodi, M. S. Swanson, C. A. Thornton and R. T. Dirksen (2007). "Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy." J Gen Physiol **129**(1): 79-94.
- Magana, J. J., M. Arenas-Sordo and R. Gomez Ortega (2009). "[Capillary electrophoresis, a new diagnostic tool]." Rev Med Chil **137**(7): 946-956.
- Magana, J. J., P. Cortes-Reynosa, R. Escobar-Cedillo, R. Gomez, N. Leyva-Garcia and B. Cisneros (2011). "Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population." Mol Biol Rep **38**(2): 1341-1346.
- Magana, J. J., N. Leyva-Garcia and B. Cisneros (2009). "Pathogenesis of myotonic dystrophy type 1." Gaceta Medica De Mexico **145**(4): 331-337.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy and et al. (1992). "Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene." Science **255**(5049): 1253-1255.

Mankodi, A., M. P. Takahashi, H. Jiang, C. L. Beck, W. J. Bowers, R. T. Moxley, S. C. Cannon and C. A. Thornton (2002). "Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy." *Mol Cell* **10**(1): 35-44.

Manley, K., T. L. Shirley, L. Flaherty and A. Messer (1999). "Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice." *Nat Genet* **23**(4): 471-473.

Marra, G., I. Iaccarino, T. Lettieri, G. Roscilli, P. Delmastro and J. Jiricny (1998). "Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8568-8573.

Masuda, A., H. S. Andersen, T. K. Doktor, T. Okamoto, M. Ito, B. S. Andresen and K. Ohno (2012). "CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay." *Sci Rep* **2**: 209.

Mathieu, J., P. Allard, L. Potvin, C. Prevost and P. Begin (1999). "A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy." *Neurology* **52**(8): 1658-1662.

Mathieu, J., H. Boivin, D. Meunier, M. Gaudreault and P. Begin (2001). "Assessment of a disease-specific muscular impairment rating scale in myotonic dystrophy." *Neurology* **56**(3): 336-340.

McMurray, C. T. (2010). "Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development." *Nat Rev Genet* **11**(11): 786-799.

Meola, G. (2013). "Clinical aspects, molecular pathomechanisms and management of myotonic dystrophies." *Acta Myol* **32**(3): 154-165.

Meola, G. and R. Cardani (2015). "Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms." *Biochim Biophys Acta* **1852**(4): 594-606.

Michalowski, S., J. W. Miller, C. R. Urbinati, M. Paliouras, M. S. Swanson and J. Griffith (1999). "Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein." *Nucleic Acids Res* **27**(17): 3534-3542.

Miller, J. W., C. R. Urbinati, P. Teng-Umuay, M. G. Stenberg, B. J. Byrne, C. A. Thornton and M. S. Swanson (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy." *EMBO J* **19**(17): 4439-4448.

Mirkin, S. M. (2007). "Expandable DNA repeats and human disease." *Nature* **447**(7147): 932-940.

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

Monckton, D. G., L. J. C. Wong, T. Ashizawa and C. T. Caskey (1995). "Somatic Mosaicism, Germline Expansions, Germline Reversions and Intergenerational Reductions in Myotonic-Dystrophy Males - Small Pool Pcr Analyses." *Human Molecular Genetics* **4**(1): 1-8.

Montes-Brown, J., A. Machado, M. Estevez, C. Carricarte and L. Velazquez-Perez (2012). "Autonomic dysfunction in presymptomatic spinocerebellar ataxia type-2." *Acta Neurol Scand* **125**(1): 24-29.

Morales, F., J. M. Couto, C. F. Higham, G. Hogg, P. Cuenca, C. Braidá, R. H. Wilson, B. Adam, G. del Valle, R. Brian, M. Sittenfeld, T. Ashizawa, A. Wilcox, D. E. Wilcox and D. G. Monckton (2012). "Somatic

instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity." Hum Mol Genet **21**(16): 3558-3567.

Musova, Z., R. Mazanec, A. Krepelova, E. Ehler, J. Vales, R. Jaklova, T. Prochazka, P. Koukal, T. Marikova, J. Kraus, M. Havlovicova and Z. Sedlacek (2009). "Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene." Am J Med Genet A **149A**(7): 1365-1374.

Nageshwaran, S. and R. Festenstein (2015). "Epigenetics and Triplet-Repeat Neurological Diseases." Front Neurol **6**: 262.

Nakamori, M., C. E. Pearson and C. A. Thornton (2011). "Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG)ⁿ(CAG) repeats." Hum Mol Genet **20**(3): 580-588.

Nakamori, M., K. Sobczak, A. Puwanant, S. Welle, K. Eichinger, S. Pandya, J. Dekdebrun, C. R. Heatwole, M. P. McDermott, T. Chen, M. Cline, R. Tawil, R. J. Osborne, T. M. Wheeler, M. S. Swanson, R. T. Moxley, 3rd and C. A. Thornton (2013). "Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy." Ann Neurol **74**(6): 862-872.

Osborne, R. J., X. Lin, S. Welle, K. Sobczak, J. R. O'Rourke, M. S. Swanson and C. A. Thornton (2009). "Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **18**(8): 1471-1481.

Pascual, M., M. Vicente, L. Monferrer and R. Artero (2006). "The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing." Differentiation **74**(2-3): 65-80.

Pearson, C. E., K. Nichol Edamura and J. D. Cleary (2005). "Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations." Nat Rev Genet **6**(10): 729-742.

Perbellini, R., S. Greco, G. Sarra-Ferraris, R. Cardani, M. C. Capogrossi, G. Meola and F. Martelli (2011). "Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1." Neuromuscul Disord **21**(2): 81-88.

Perfetti, A., S. Greco, E. Bugiardini, R. Cardani, P. Gaia, C. Gaetano, G. Meola and F. Martelli (2014). "Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1." Neuromuscul Disord **24**(6): 509-515.

Perfetti, A., S. Greco, R. Cardani, B. Fossati, G. Cuomo, R. Valaperta, F. Ambrogi, A. Cortese, A. Botta, A. Mignarri, M. Santoro, C. Gaetano, E. Costa, M. T. Dotti, G. Silvestri, R. Massa, G. Meola and F. Martelli (2016). "Validation of plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1." Sci Rep **6**: 38174.

Pilz, W., L. W. Baijens and B. Kremer (2014). "Oropharyngeal dysphagia in myotonic dystrophy type 1: a systematic review." Dysphagia **29**(3): 319-331.

Pilz, W., L. W. Baijens, V. L. Passos, R. Verdonschot, F. Wesseling, N. Roodenburg, C. G. Faber and B. Kremer (2014). "Swallowing assessment in myotonic dystrophy type 1 using fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing (FEES)." Neuromuscul Disord **24**(12): 1054-1062.

Planells, J. G., J. Molano, S. Borrego and G. A. CIBERER (2011). "Recommendations of good practices for the genetic diagnosis of myotonic dystrophy." Medicina Clinica **136**(7): 303-308.

- Radvansky, J. and L. Kadasi (2010). "The expanding world of myotonic dystrophies: how can they be detected?" Genet Test Mol Biomarkers **14**(6): 733-741.
- Rau, F., F. Freyermuth, C. Fugier, J. P. Villemin, M. C. Fischer, B. Jost, D. Dembele, G. Gourdon, A. Nicole, D. Duboc, K. Wahbi, J. W. Day, H. Fujimura, M. P. Takahashi, D. Auboeuf, N. Dreumont, D. Furling and N. Charlet-Berguerand (2011). "Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy." Nat Struct Mol Biol **18**(7): 840-845.
- Rimoin, D. L. and A. E. H. Emery (2007). Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. Philadelphia, Churchill Livingstone.
- Ronnlblom, A., H. Forsberg and A. Danielsson (1996). "Gastrointestinal symptoms in myotonic dystrophy." Scand J Gastroenterol **31**(7): 654-657.
- Rousset, F. and M. Raymond (1995). "Testing heterozygote excess and deficiency." Genetics **140**(4): 1413-1419.
- Salisbury, E., K. Sakai, B. Schoser, C. Huichalaf, C. Schneider-Gold, H. Nguyen, G. L. Wang, J. H. Albrecht and L. T. Timchenko (2008). "Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1." Exp Cell Res **314**(11-12): 2266-2278.
- Santoro, M., M. Masciullo, G. Silvestri, G. Novelli and A. Botta (2017). "Myotonic dystrophy type 1: role of CCG, CTC and CGG interruptions within DMPK alleles in the pathogenesis and molecular diagnosis." Clin Genet **92**(4): 355-364.
- Schmidt, M. H. and C. E. Pearson (2016). "Disease-associated repeat instability and mismatch repair." DNA Repair (Amst) **38**: 117-126.
- Schmittgen, T. D., E. J. Lee, J. Jiang, A. Sarkar, L. Yang, T. S. Elton and C. Chen (2008). "Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA." Methods **44**(1): 31-38.
- Spranger, M., S. Spranger, M. Tischendorf, H. M. Meinck and M. Cremer (1997). "Myotonic dystrophy. The role of large triplet repeat length in the development of mental retardation." Arch Neurol **54**(3): 251-254.
- St Guily, J. L., S. Perie, T. N. Willig, S. Chaussade, B. Eymard and B. Angelard (1994). "Swallowing disorders in muscular diseases: functional assessment and indications of cricopharyngeal myotomy." Ear Nose Throat J **73**(1): 34-40.
- Stevens, J. R., E. E. Lahue, G. M. Li and R. S. Lahue (2013). "Trinucleotide repeat expansions catalyzed by human cell-free extracts." Cell Res **23**(4): 565-572.
- Steyaert, J., C. de Die-Smulders, J. P. Fryns, E. Goossens and D. Willekens (2000). "Behavioral phenotype in childhood type of dystrophia myotonica." Am J Med Genet **96**(6): 888-889.
- Storey, E. (2013). "Presymptomatic features of spinocerebellar ataxias." Lancet Neurol **12**(7): 625-626.
- Suenaga, K., K. Y. Lee, M. Nakamori, Y. Tatsumi, M. P. Takahashi, H. Fujimura, K. Jinnai, H. Yoshikawa, H. Du, M. Ares, Jr., M. S. Swanson and T. Kimura (2012). "Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain." PLoS One **7**(3): e33218.
- T. Ashizawa, M. B. (2000). "New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC)." Neurology **54**(6): 1218-1221.

Tian, L., C. Hou, K. Tian, N. C. Holcomb, L. Gu and G. M. Li (2009). "Mismatch recognition protein MutSbeta does not hijack (CAG)_n hairpin repair in vitro." J Biol Chem **284**(31): 20452-20456.

Timchenko, L. T., J. W. Miller, N. A. Timchenko, D. R. DeVore, K. V. Datar, L. Lin, R. Roberts, C. T. Caskey and M. S. Swanson (1996). "Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy." Nucleic Acids Res **24**(22): 4407-4414.

Tishkoff, S. A., A. Goldman, F. Calafell, W. C. Speed, A. S. Deinard, B. Bonne-Tamir, J. R. Kidd, A. J. Pakstis, T. Jenkins and K. K. Kidd (1998). "A global haplotype analysis of the myotonic dystrophy locus: implications for the evolution of modern humans and for the origin of myotonic dystrophy mutations." American Journal of Human Genetics **62**(6): 1389-1402.

Tome, S., K. Manley, J. P. Simard, G. W. Clark, M. M. Slean, M. Swami, P. F. Shelbourne, E. R. Tillier, D. G. Monckton, A. Messer and C. E. Pearson (2013). "MSH3 polymorphisms and protein levels affect CAG repeat instability in Huntington's disease mice." PLoS Genet **9**(2): e1003280.

Tome, S., A. Nicole, M. Gomes-Pereira and G. Gourdon (2014). "Non-radioactive detection of trinucleotide repeat size variability." PLoS Curr **6**.

Turner, C. and D. Hilton-Jones (2010). "The myotonic dystrophies: diagnosis and management." J Neurol Neurosurg Psychiatry **81**(4): 358-367.

Velazquez-Perez, L., R. Rodriguez-Labrada, N. Canales-Ochoa, J. M. Montero, G. Sanchez-Cruz, R. Aguilera-Rodriguez, L. E. Almaguer-Mederos and J. M. Laffita-Mesa (2014). "Progression of early features of spinocerebellar ataxia type 2 in individuals at risk: a longitudinal study." Lancet Neurol **13**(5): 482-489.

Wang, E. T., N. A. Cody, S. Jog, M. Biancolella, T. T. Wang, D. J. Treacy, S. Luo, G. P. Schroth, D. E. Housman, S. Reddy, E. Lecuyer and C. B. Burge (2012). "Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins." Cell **150**(4): 710-724.

Ward, A. J., M. Rimer, J. M. Killian, J. J. Dowling and T. A. Cooper (2010). "CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **19**(18): 3614-3622.

Warner, J. P., L. H. Barron, D. Goudie, K. Kelly, D. Dow, D. R. Fitzpatrick and D. J. Brock (1996). "A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR." J Med Genet **33**(12): 1022-1026.

Wells, R. D., R. Dere, M. L. Hebert, M. Napierala and L. S. Son (2005). "Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases." Nucleic Acids Res **33**(12): 3785-3798.

Williams, G. M. and J. A. Surtees (2015). "MSH3 Promotes Dynamic Behavior of Trinucleotide Repeat Tracts In Vivo." Genetics **200**(3): 737-754.

Wu, T., C. Wang, J. Wang, M. Hallett, Y. Zang and P. Chan (2013). "Preclinical and clinical neural network changes in SCA2 parkinsonism." Parkinsonism Relat Disord **19**(2): 158-164.

Yadava, R. S., C. D. Frenzel-McCardell, Q. Yu, V. Srinivasan, A. L. Tucker, J. Puymirat, C. A. Thornton, O. W. Prall, R. P. Harvey and M. S. Mahadevan (2008). "RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression." Nat Genet **40**(1): 61-68.

Yum, K., E. T. Wang and A. Kalsotra (2017). "Myotonic dystrophy: disease repeat range, penetrance, age of onset, and relationship between repeat size and phenotypes." Curr Opin Genet Dev **44**: 30-37.

Zhang, Y., F. Yuan, S. R. Presnell, K. Tian, Y. Gao, A. E. Tomkinson, L. Gu and G. M. Li (2005). "Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system." Cell **122**(5): 693-705.

Zhao, X. N. and K. Usdin (2015). "The Repeat Expansion Diseases: The dark side of DNA repair." DNA Repair (Amst) **32**: 96-105.

Zu, T., B. Gibbens, N. S. Doty, M. Gomes-Pereira, A. Huguet, M. D. Stone, J. Margolis, M. Peterson, T. W. Markowski, M. A. Ingram, Z. Nan, C. Forster, W. C. Low, B. Schoser, N. V. Somia, H. B. Clark, S. Schmechel, P. B. Bitterman, G. Gourdon, M. S. Swanson, M. Moseley and L. P. Ranum (2011). "Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 260-265.