

ARTICULO DE REVISION

# ASPECTOS GENETICOS Y MOLECULARES DE LA DISTROFIA MIOTONICA

## Molecular and genetic aspects of myotonic dystrophy

Fernando Morales Montero, Patricia Cuenca Berger

Instituto de Investigaciones en Salud y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica  
INISA, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica - famorale@cariari.ucr.ac.cr

### RESUMEN

La distrofia miotónica es una enfermedad multisistémica, la cual afecta varios tejidos, como el músculo, el cerebro y algunos tejidos endocrinos. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta y expresión variable. El defecto molecular es una expansión del trinucleótido CTG presente en la región 3' no codificante del gen DMPK, el cual codifica para una proteína quinasa. Existe una correlación positiva entre el número de repeticiones del trinucleótido CTG del alelo afectado y la severidad de la enfermedad y una correlación inversa entre la edad de expresión de la enfermedad y la longitud de la repetición. Se presenta inestabilidad de la repetición tanto mitótica como meióticamente, la primera provoca heterogeneidad somática y la segunda causa aumento en el número de repeticiones con la transmisión de padres a hijos. El mecanismo que conlleva a la expansión y su secuencia a nivel celular no se conocen por el momento, aunque han surgido algunas hipótesis al respecto. La transmisión de la enfermedad en una familia dependerá tanto del sexo del padre que aporte la mutación como del tamaño de la repetición presente en los gametos. La forma congénita de la enfermedad ocurre casi exclusivamente por transmisión materna, mientras que las mutaciones negativas o contracciones ocurren por la vía paterna. Hasta el momento no existe tratamiento para la enfermedad, pues la fisiopatología de la misma no se conoce.

### ABSTRACT

*Myotonic Dystrophy is a multisystemic illness which affects several tissues such as the muscle, the brain and some endocrine tissues. It presents a dominant of autosomic inheritance with incomplete penetrance and variable expression. The molecular defect turned out to be an expansion of the trinucleotide CTG present in the 3' non-codifying region of the gen DMPK. There is a positive correlation between the number of repetitions of the trinucleotide CTG of the affected allele and the severity of the illness. There is also an inverse correlation between the age in which the symptoms appear and the longitude of the repetition.*

*There is instability of the repetition both mitotic and meiotic. The mechanism that takes to expansion and its consequences at the cellular level are not known yet. The transmission of the illness within a family will depend on the gender of the parent with the mutation as well as on the size of the repetition present in the gametes.*

**Keywords:** *Myotonic Dystrophy, triplets expansion, genetic instability, somatic heterogeneity, apoptosis, parental transmission.*

### INTRODUCCIÓN

La Distrofia Miotónica (DM) es la forma más común de distrofia muscular en adultos. Su incidencia varía en distintas poblaciones, para los japoneses se estima en 1/20 000, para caucásicos 1/8000, llegando a 1/475 en ciertas regiones de Canadá (1). Sin embargo, es extremadamente rara en africanos negros, en los cuales sólo se ha descrito una familia nigeriana afectada (2).

La DM es una enfermedad multisistémica, caracterizada por miotonía, desgaste y debilidad muscular progresiva, calvicie frontal, cataratas, problemas respiratorios, hipogonadismo, arritmias cardíacas producidas por defectos en el sistema de conducción del músculo cardíaco y atrofia testicular. Se presenta generalmente en la tercera o cuarta década, pero puede ocurrir congénitamente con síntomas más severos, incluyendo hipotonía, con diplegia facial, retardo mental, defectos en la succión y deglución. La forma congénita presenta una alta tasa de mortalidad perinatal y aquellos pacientes que sobreviven a este período desarrollan los síntomas clásicos de la enfermedad aproximadamente a los diez años de edad.

La DM presenta un patrón de herencia autosómico dominante con expresión variable (*existe variación en los síntomas y signos de los pacientes afectados*) y penetrancia incompleta (*no todos los individuos portadores de la mutación manifiestan la enfermedad*). La variabilidad fenotípica de la enfermedad abarca, desde individuos con una expresión tardía

leve consistente únicamente de cataratas, hasta individuos que presentan la forma congénita con expresión multisistémica (3). Representa uno de los mejores ejemplos del fenómeno de anticipación genética, en el cual, los síntomas se manifiestan a edades más tempranas y en forma más severa conforme pasan las generaciones en una familia (4).

El gen se expresa principalmente en el músculo liso, esquelético y cardíaco. En niveles más bajos también en el cerebro, y en tejidos endocrinos (5,6). Existe un paralelo entre el patrón de expresión del gen en los diferentes tejidos y la forma fenotípica en que se manifiesta la enfermedad en los pacientes (5).

El defecto génico fue identificado en el cromosoma 19, banda q13.3, el cual resultó ser una expansión del trinucleótido repetido CTG (Citosina, Timina, Guanina) en la región 3' no codificante (3' UTR) del gen DMPK (*región que no está representada en la proteína*), denominado así porque codifica por la proteína quinasa de la DM (Miotonina) (Ver figura 1). Esta tiene una secuencia similar a la familia de proteínas quinasas serina/treonina; las cuales están relacionadas con las quinasas dependientes de AMPc (7-11).

El análisis de secuencia del ADN copia (ADNc) del gen, sugiere que la miotonina es una proteína de 69 kDa (12). Sin embargo, Salvatori *et al* (13) lograron determinar que los tamaños específicos de dichas isoformas son de 54Da y 72kDa, las cuales probablemente no son proteínas integrales de membranas. Por medio del uso de técnicas especializadas, se ha detectado la localización subcelular específica de esta quinasa en los discos intercalados de los miocitos cardíacos y fibras de Purkinje (12,13), al igual que en la unión neuromuscular del músculo esquelético (12), más específicamente en las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático del músculo esquelético (13).

La expansión de la tripleta CTG es inestable, es decir, que conforme transcurren las divisiones celulares el número de repeticiones cambia. La población normal presenta alelos con 5 a 37 repeticiones. Los individuos afectados tiene de 50 a más de 2000 repeticiones (Ver figura 1). La DM es considerada una de las enfermedades genéticas más homogéneas, ya que, más del 99% de los casos son causados por la expansión, incluyendo en estos estudios diversos grupos étnicos de Europa, Norte y Sur América, Asia y Australia (2,14).

El mecanismo fisiopatológico para la degeneración multisistémica en esta enfermedad no es conocido (15) y aunque su base genética ya se ha dilucidado, muy poco se sabe acerca del defecto celular responsable de las manifestaciones pleiotrópicas de la enfermedad (6,16-18).

Se presenta una correlación positiva entre el número de repeticiones presentes en el alelo afectado y la severidad de la enfermedad. Con base en esto se han establecido varias categorías clínicas:

- I.- Asintomática
- II.- Leve: expresión de cataratas en adultos mayores de 40 años. En algunos casos se presenta debilidad y desgaste muscular leve.
- III.- Clásica del adulto: Se expresan los rasgos neuromusculares típicos con miotonía al examen físico o electromiográfico y cambios distróficos en la adolescencia o temprano en la vida adulta.
- IV.- Pediátrica: expresión en personas menores de diez años, los rasgos predominantes son retardo en el desarrollo y debilidad leve.

V.- Congénita: problemas neuromusculares, usualmente severos, claramente documentados al nacimiento (19).

No obstante la presencia de la correlación positiva, hay un traslape entre la longitud del alelo y la categoría clínica; lo cual indica que el tamaño como único parámetro no es suficiente para predecir con certeza la severidad y forma de expresión de la enfermedad (20).

La inestabilidad de las repeticiones está directamente relacionada con su tamaño. Repeticiones de trinucleótidos dentro del rango normal son pequeños polimorfismos estables, con una tasa de mutación relativamente baja y sólo cuando sobrepasan el tamaño umbral (sobre las 40 repeticiones) se vuelven muy inestables. Dichas repeticiones tienen más probabilidad de expandirse que de contraerse (21). La causa de la pérdida de estabilidad es desconocida, ya que los mecanismos responsables no han sido aún bien estudiados (22). Existe una correlación inversa entre la edad de expresión y la longitud de repetición. El incremento de la expansión a través de las generaciones aumenta la severidad de la enfermedad y provoca que los síntomas aparezcan a edades cada vez más tempranas. Estas mutaciones inestables también explican a nivel molecular la genética inusual (penetrancia incompleta, expresión variable y la anticipación) de otras enfermedades (23).

Ciertas propiedades de la región repetida CTG en el gen DMPK, tales como inestabilidad mitótica y meiótica, logran explicar los patrones inusuales de la herencia y las variaciones en las manifestaciones clínicas de la DM (16). La inestabilidad mitótica provoca heterogeneidad somática, esto significa que la longitud de las repeticiones varía dentro y entre tejidos. El número de repeticiones aumenta con la transmisión de padres a hijos, lo cual es evidencia de inestabilidad meiótica. Aunque el aumento en el número de repeticiones es la regla para ambos sexos, el tamaño del alelo del padre es más importante en determinar el alelo del hijo y por consiguiente su fenotipo. Sin embargo, cuando se trata de la forma severa de DM, ésta es casi exclusivamente heredada por una madre afectada. Por lo tanto, el sexo del padre que transmite la mutación es importante para determinar el tamaño del alelo anormal en los hijos (24).

### ***Inestabilidad meiótica de la repetición CTG***

La expansión de la repetición del trinucleótido CTG, ocurre en la gametogénesis, tanto del hombre como de la mujer (23).

Para expansiones parentales con un rango entre 0 y 0.5 Kb, se ha encontrado una correlación positiva entre el tamaño de la repetición y la variación intergeneracional, y es muy similar en la meiosis de ambos sexos. Pero, para expansiones mayores a 0.5 Kb, la variación intergeneracional es más importante en la ovogénesis que en la espermatogénesis, lo que podría reflejar un mecanismo diferente en las gametogénesis masculina y femenina.

El alargamiento parece obligatorio después de la ovogénesis, cualquiera que sea el tamaño de la repetición materna. Lo contrario sucede cuando la expansión CTG paterna es mayor de 1.5 Kb, ya que, en estos casos más bien se presenta disminución en el número de repeticiones, casi exclusivamente después de la espermatogénesis. Este hecho, podría ocurrir debido a:

- 1- una barrera de selección durante la espermatogénesis, la cual evitaría la sobrevivencia de espermatozoides portadores de grandes repeticiones.



2- mecanismos de reparación que conduzcan a contracciones en el sexo masculino.

Alternamente, estos mecanismos podrían ocurrir temprano en la embriogénesis, únicamente cuando la mutación es heredada paternalmente (20).

En síntesis, se presenta un incremento más grande en el tamaño de la repetición en transmisiones de mujeres que en transmisiones de hombres (25).

### **Heterogeneidad e inestabilidad somática de la tripleta CTG**

El diagnóstico molecular de un gran número de pacientes, ha demostrado que el ADN de muchos individuos afectados, contiene una muestra de diferentes tamaños de la expansión. Esta inestabilidad somática se ha demostrado dentro y entre diferentes tejidos. El número de repeticiones llega a ser mayor en el músculo esquelético que en los leucocitos de la sangre periférica del mismo individuo.

Por regla general, los pacientes más viejos tienden a tener expansiones más pequeñas, pero un grado de heterogeneidad más grande, mientras que los pacientes jóvenes, tienden a tener expansiones más grandes, pero más homogéneas (26).

La carencia de heterogeneidad somática detectable en leucocitos de pacientes con distrofia miotónica congénita (DMC) comparada con adultos, sugiere que esta heterogeneidad es establecida después del nacimiento y podría ser un proceso continuo a través de la vida (14). Sin embargo, los datos muestran que la inestabilidad de la repetición (presente en los espermatozoides) ocurre poscigóticamente, presentándose de manera continua en aquellas células que se dividen mitóticamente (27). En síntesis, como se demostró para el síndrome del cromosoma X frágil, la heterogeneidad somática para la mutación puede ser establecida durante un estado muy temprano en la embriogénesis, o puede depender de la inestabilidad mitótica específica de cada célula (20).

El comportamiento somático de la repetición expandida en el desarrollo fetal. Los resultados muestran que la heterogeneidad de la expansión en tejidos fetales, no se detecta antes de las 13 semanas de desarrollo, sin embargo casi siempre se observa entre las 16 semanas y el nacimiento. Si la inestabilidad comenzara al inicio del segundo trimestre se correlacionaría con el periodo de rápido crecimiento en el feto, e implicaría que durante los estados de diferenciación del desarrollo, en el primer trimestre, las repeticiones se ven de algún modo estabilizadas. Esto podría ser debido a una mayor fidelidad en la reparación del ADN durante el primer trimestre, eficiencia que no puede ser retenida durante la fase de rápido crecimiento (27).

### **Posibles consecuencias de la expansión a nivel celular**

La patogénesis de la DM permanece incierta. Ha sido difícil asociar su herencia autosómica dominante con la pérdida de función de la miotonina, ya que, el producto del alelo normal podría contribuir al menos con un 50% de los niveles normales de la proteína (6).

Se ha sugerido, que la mutación produce cambios en la expresión de las isoformas (las dos distintas proteínas producto del gen (DMPK) o en los niveles de miotonina y que esos

cambios podrían ser responsables del fenotipo final. Tales cambios en los niveles, podrían ser debidos a defectos en la transcripción, estabilidad del ARNm, procesamiento y transporte, eficiencia de traducción o una combinación de esos factores (18). Los resultados de los estudios realizados para explicar el efecto de la mutación en la expresión del gen DMPK en tejidos de individuos afectados han sido contradictorios. Se ha informado que, tanto los niveles del ARNm del gen DMPK, como los niveles de la miotonina están disminuidos en el músculo esquelético de los pacientes (2,28,29). Otros autores, por el contrario no han encontrado alteraciones de estos niveles (30), o han encontrado niveles incrementados (31). Sin embargo, la variabilidad de esos resultados, probablemente sean producto de los diferentes sistemas experimentales y métodos usados para determinar los niveles del ARNm y proteína (6).

Bhagwati *et al* (6) han propuesto, basándose en los resultados obtenidos en sus estudios, que los niveles disminuidos de la miotonina podrían causar apoptosis (muerte celular programada) a las células musculares y así contribuir a la patología del músculo en la DM.

La función normal de la miotonina en la célula y las sustancias con las cuales interactúa como proteína quinasa aún no se conocen, lo cual hace que las predicciones acerca del papel de la proteína en la patología de la DM sean difíciles de establecer. Sin embargo, es posible que el gen DMPK no sea el único determinante del fenotipo, y que otros genes o factores estén participando en el desarrollo de la enfermedad (16,18,32).

Actualmente hay tres hipótesis patogénicas con datos que apoyan cada una:

**1-Pérdida de función/haploinsuficiencia:** esta hipótesis sugiere que la repetición expandida lleva a pérdida de transcripción, traducción o ambas, del gen. Cada paciente es heterocigota, así que este cambio podría solo afectar la transcripción o traducción del alelo mutado (haploinsuficiencia). Consistente con este método, algunas publicaciones han mostrado que los niveles del ARN y la quinasa DM estaban reducidos en el músculo de los pacientes, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, es difícil entender como esos leves cambios en los niveles de la proteína podrían resultar en la gran variabilidad clínica vista en la DM (33).

**2-Cambios en la cromatina (ADN y proteínas) con cambios en la transcripción multigénica (33):** esta hipótesis sugiere que la expansión lleva a una estructura alterada de la cromatina y a la unión anormal de los nucleosomas (primer estado de condensación de la cromatina durante la mitosis) (34,35). Esta estructura alterada podría producir un efecto a gran escala en la transcripción génica, alterando la expresión del gen DMPK y otros genes vecinos. La variabilidad clínica de la enfermedad podría explicarse por una relación entre el tamaño de la mutación y el número de genes vecinos afectados. Si este mecanismo fuera cierto, entonces se esperaría que se anule la transcripción del alelo mutado, sin embargo, ese no es el caso (33).

**3-Defecto en el metabolismo general del ARN por el ARN mutante:** esta hipótesis sugiere que la expansión en el ARN podría tener un efecto deletéreo en la célula, alterando el metabolismo del ARN de un número de genes (33). Esto es apoyado por varias publicaciones, ya que, como lo informaron Taneja *et al* (36) y Davis *et al* (37), la expansión podría producir una retención nuclear de transcritos (ARN) DM, produciéndose

focos nucleares del ARNm del gen DMPK en células de pacientes con DM, ya que, se han detectado concentraciones altas anormales de ARNm en el núcleo de tales células DM16. Además de esto, Wang *et al* (38) y Krahe *et al* (39) también mostraron que el ARN de la quinasa DM que contiene la expansión estuvo presente en niveles altos en el músculo de pacientes. Recientemente, Timchenko *et al* (40,41), identificaron y caracterizaron proteínas de unión al ARN que reconocen específicamente la repetición CUG (Citosina, Uracilo, Guanina) presente en los transcritos (ARN) del gen DMPK, mostrando que estas proteínas están en el citoplasma en células normales pero que son secuestradas en el núcleo de células DM (33).

Todos esos datos muestran que la información contenida en el gen DMPK mutado es transcrita en ARN; el cual contiene la expansión, este ARN es procesado inadecuadamente por lo cual forma agregados dentro del núcleo de las células DM. Estos agregados de ARN secuestran a las proteínas de unión al ARN con la repetición CUG, haciendo imposible que lleven a cabo su función citosólica normal. La pérdida de estas proteínas por parte del citoplasma tiene un efecto dominante en el metabolismo del ARN, produciendo una desregulación de muchos ARNs. Esta hipótesis podía explicar la herencia dominante, la dramática variabilidad clínica y la naturaleza multisistémica de la enfermedad a través de alteraciones de moléculas específicas de ARN de otros genes, con expresión en tejidos y etapas del desarrollo específicas (33).

Hacia el extremo 3' del gen DMPK se ha descrito el gen DMAPH (proteína homeodominio asociada al locus DM), en donde, traslapándose con los dos genes existe una isla CpG (región que controla la expresión de los genes). Se especula que esta isla se ve afectada por la expansión CTG presente en el gen DMPK mutado (Ver figura 2). Se conoce poco sobre la expresión del gen DMAPH aunque se han detectado dos isoformas de ARNm en varios tejidos humanos. Se ha encontrado que se expresa prácticamente en los mismos tejidos que la miotonina. Es posible que la reducción en la expresión de este gen en un 50% por causa de la expansión CTG, pueda ser suficiente para causar algunos de los cambios fisiopatológicos de la DM18.

Thornton *et al* (15) cultivaron mioblastos primarios normales y de pacientes con DM y determinaron la abundancia relativa del ARN transcrito del gen DMAPH. En los mioblastos de personas normales los niveles eran similares, pero en los provenientes de pacientes con DM clásica, los niveles de los transcritos (ARN) de este gen estaban disminuidos. También se encontraron niveles reducidos en el cerebro y el corazón en 2 pacientes con DM, pero no en pacientes con DM sin debilidad muscular y con expansiones pequeñas de la triplete (menos de 80). Estos hallazgos indican que la expresión reducida del gen DMAPH está relacionada con el tamaño de la expansión.

Es posible que la isla CpG funcione como una región controladora de varios genes, influyendo la expresión de genes distantes al DMPK, por lo tanto, se propone un modelo de efecto de campo para explicar la variabilidad observada en el cuadro clínico de diferentes pacientes. Diferentes tamaños de expansión podrían afectar la actividad génica en forma diferencial. Algunos genes afectados de esta forma podrían ser: DMPK, DMAPH, Gen 59 y otros genes aún no caracterizados (18) (Ver figura 2).

El producto proteico del gen DMPK parece funcionar como una proteína quinasa serina/treonina, aunque su sustrato o sustratos naturales no han sido bien definidos (16,17). En años recientes, surgieron evidencias de que mutaciones que destruyen la función de los canales iónicos, pueden producir anomalías en la excitabilidad de la membrana muscular (17). Ahora, como los pacientes con DM presentan defectos en la excitación muscular después de la contracción voluntaria, se sugirió que tales canales iónicos podrían ser excelentes candidatos para sustratos de la miotonina (16). Después de muchas investigaciones al respecto, algunos investigadores concluyeron que los niveles alterados de la quinasa en células musculares de pacientes afectados podrían causar alteraciones en la excitabilidad del retículo sarcoplasmático y miotonía (17). Estas observaciones sugieren que DMPK podría modular los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje (42), lo cual explicaría ciertas manifestaciones del fenotipo muscular. Sin embargo, tal modulación parece ocurrir sólo en el músculo esquelético y no en el músculo cardíaco (17). Benders *et al* (42), muestran en un estudio reciente, nuevas evidencias con respecto a una relación entre la actividad de DMPK y la homeostasis del calcio en las células del músculo esquelético. Ellos concluyen que DMPK modula los eventos iniciales del mecanismo de acoplamiento de excitación-contracción del músculo esquelético.

### ***Transmisión parental de la repetición CTG expandida***

El tamaño de la repetición en los pacientes afectados con DM depende de como ocurrió la transmisión en la familia; si la mutación fue heredada de la madre o del padre. La distrofia miotónica congénita (DMC) ocurre casi exclusivamente a través de transmisión materna, la cual, es resultado de grandes expansiones CTG. Sin embargo, la transmisión de grandes expansiones que resultan en DMC por la vía paterna ocurre excepcionalmente. Las contracciones de la repetición expandida, tienden a ocurrir por transmisión paterna (43). Estudios previos han estimado un riesgo entre 10-40% de tener un niño afectado con la forma congénita, para las madres afectadas tienen niños afectados congénitamente (20). La DMC es heredada casi por completo por la vía materna aunque unos pocos casos son heredados paternalmente. Esto excluye la impronta materna y la herencia mitocondrial. La posibilidad de que DMPK sea un gen sujeto a impronta genómica (*diferencia en la actividad de los genes con respecto a su origen parental*) es poco probable, ya que, no hay diferencias en la metilación de las islas CpG dentro de DMPK entre alelos derivados de la madre o del padre en pacientes de expresión adulta y congénita (3). Algunos estudios muestran que el comienzo de la expresión clínica en familias con DM, se asocia con la transmisión paterna de la mutación DM (24).

Cuando la expansión es un padre (hombre) afectado es pequeña (menor de 100 repeticiones), la expansión incrementa significativamente en los hijos. Sin embargo, cuando es grande, el incremento de la expansión es menor. En general, repeticiones transmitidas por los padres, no exceden las mil copias en la mayoría de los hijos, mientras repeticiones transmitidas por la madre, exceden las mil repeticiones tanto en los hijos con DMC como con la forma clásica de DM (43).



La mutación negativa está exclusivamente asociada con la transmisión paterna. Consiste en que los hijos heredan un alelo con un número de repeticiones menor que su padre, o sea, hay una reducción en el tamaño de la mutación de una generación a otra. Sin embargo, los datos clínicos no son aún suficientes para sacar conclusiones concernientes a las consecuencias de la mutación negativa, además, de que el mecanismo que causa el cambio de un alelo amplificado a uno de tamaño normal es desconocido (45).

Es posible que, el incremento en la inestabilidad asociada con transmisión masculina, simplemente refleje el mayor número de divisiones en la espermatogénesis que en la ovogénesis (24).

Es tentador especular que una combinación de la infertilidad en los hombres y la selección negativa contra espermatozoides que portan grandes expansiones, podrían estar involucrados en el origen materno casi exclusivo de la DMC. Es posible que la ausencia de hijos afectados con DMC por transmisión masculina, refleje un efecto negativo sobre la fertilidad de los espermatozoides que contienen alelos con grandes repeticiones (25).

Algunos autores argumentan que la enfermedad podría extinguirse en las familias, a causa de la pérdida del gen en pacientes severamente afectados después de algunas generaciones debido al celibato, matrimonios sin hijos, retardo mental, y alta mortalidad infantil. En una familia el fenómeno de anticipación conduciría en última instancia a la pérdida del alelo mutado. Se especula, bajo estas condiciones, que en unas pocas generaciones el alelo desaparecería por completo (46). Sin embargo, esta enfermedad también se caracteriza por una alta tasa de mutaciones nuevas en la población (47).

Algunos investigadores han mostrado que la mayoría de las madres con hijos afectados pero sin DMC tienen menos de 500 repeticiones y madres con prole DMC, tienen entre 500 y 1500 repeticiones. Sin embargo, algunos datos muestran que puede darse el caso contrario. Por lo tanto, ni el tamaño de la repetición en la madre con DM, ni la extensión de la expansión pueden ofrecer una explicación segura para el origen de la DMC (43).

Los estudios muestran que se puede definir un punto de corte en las 300 repeticiones. Para una madre que tiene menos de 300 repeticiones, la probabilidad de tener un niño con DMC es cerca del 10%. Cuando el alelo materno es de 300 repeticiones o más, la posibilidad de predecir un caso de DMC es de un 59% (44).

Estudios clínicos han mostrado una relación estrecha entre la condición fenotípica de la madre durante el embarazo y el riesgo de tener un niño con DMC. Los estudios moleculares han sugerido que existen diferencias entre los sexos para la transmisión de la amplificación del gen DM. Por ahora parece ser la única explicación para la transmisión materna de la DMC. Sin embargo, esta explicación no parece suficiente y otros factores desconocidos podrían jugar un papel importante (48). Estudios previos habían mostrado que una enfermedad multisistémica en la madre, incrementa el riesgo de tener un niño con DMC. Sin embargo, el riesgo siempre existe para una madre afectada. Algunos investigadores han sugerido que la DMC se origina como resultado de una adición de patología, por un lado una madre afectada con disturbios metabólicos, y por otro, el desarrollo del feto afectado con un número de repeticiones relativamente altas (44).

Hasta el momento no existe tratamiento para la enfermedad,

pues la fisiopatología de la misma no se conoce. Es probable que cuando el mecanismo o mecanismos que provocan la expansión sean conocidos, surja una o varias explicaciones para los efectos que esta expansión tiene sobre el fenotipo, al igual que la función de la proteína. Sin embargo, esto sólo se podrá lograr con el análisis genético, bioquímico y fisiológico de aquellos casos que tengan la enfermedad.

### La situación en Costa Rica

Hasta la fecha, solo hay una publicación relacionada con la forma congénita de la DM conocida también como la Enfermedad de Steinert neonatal. Se describen las principales manifestaciones clínicas de 4 casos, en donde, los autores señalan que la enfermedad es subdiagnosticada en el país, además recalcan la necesidad de un consejo genético oportuno y correcto para aquellos pacientes en riesgo, tanto de los que pueden llegar a desarrollar la enfermedad como los que la pueden heredar a sus hijos (49). Ahora, mediante diferentes técnicas moleculares, es posible confirmar el diagnóstico clínico obtenido por electromiografía. La DM no se ha estudiado en Costa Rica, no se conoce su prevalencia, ni se hace diagnóstico molecular en las familias afectadas. Por ser una enfermedad neurodegenerativa e incluso, en algunos casos muy severa, es de suma importancia conocer la población costarricense que porta la mutación, ya que, esta es la mejor manera de ofrecer un consejo genético adecuado. Es importante que en el país se comiencen a estudiar estas enfermedades y a implementar su diagnóstico. Las familias afectadas tienen derecho a conocer su condición de portadores y las implicaciones que esto puede tener en sus descendientes. La información obtenida por los estudios moleculares, además contribuirá a un mejor entendimiento de los mecanismos subyacentes. Por medio del inicio de estos estudios, se podrá estimar la prevalencia de este tipo de problema neurológico en Costa Rica. Se conocerá la forma de como la mutación se está expresando en las familias costarricenses, también se podrá saber, dentro de las familias con afectados, el riesgo que tienen los miembros asintomáticos de portar la amplificación. Con el adecuado consejo genético, se podría prevenir el nacimiento de niños que presentan los rasgos clínicos más severos. Trabajos de esta índole, permitirán difundir entre los clínicos costarricenses los mecanismos moleculares responsables de las enfermedades que presentan el fenómeno de anticipación, al mismo tiempo, que se demostrará la importancia de los estudios genético-moleculares.

**Agradecimientos y Colaboradores:** A la Vicerrectoría de Investigación de la UCR por el apoyo brindado a través del proyecto No. 742-98-322. También agradecemos a los doctores Carlos de Céspedes, Enrique San Gil e Isabel Castro por la lectura, crítica y sugerencias brindadas en beneficio del presente manuscrito. Al OIEA, que ha permitido construir la infraestructura para el estudio de mutaciones inestables en el INISA.

### BIBLIOGRAFIA

1. Zerilnick C, Torroni A, Sherman S, Warren S. Normal variation at the myotonic dystrophy locus in global human populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1995 56: 123-130.

2. Krahe R, Eckhart M, Ogunniyi A, Osuntokun B, Siciliano M, Ashizawa T. De novo myotonic dystrophy mutation in a Nigerian kindred. *Am. J. Hum. Genet.* 1995 56: 1067-1074.
3. Harris S, Moncrieff C, Johnson K. Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward. *Hum. Mol. Genet.* 1996 5: 1417-1423.
4. Fraser C. Trinucleotide repeats not the only cause of anticipation. *The Lancet* 1997 350: 459-460.
5. Jansen G, Willems P, Coerwinkel M, Nillesen W, Smeets H, Vits L, Höeler C, Brunner H, Wieringa B. Gonosomal mosaicism in DM patients: Involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expression in sperm. *Am. J. Hum. Genet.* 1994 54: 575-585.
6. Bhagwati S, Leung B, Shafiq S, Ghatpande A. Myotonic Dystrophy: decreased levels of myotonin protein kinase (Mt-PK) leads to apoptosis in muscle cells. *Exp. Neurol.* 1997 146: 277-281.
7. Aslanidis C, Jansen G, Amemiya C, Shuter G, Mahadevan M, Tsilfidis C, Chen C, Alleman J, Wormskamp N, Vooijs M, Buxton J, Johnson K, Smeets H, Lennon G, Carrano A, Korneluk R, Wiering B, Jong P. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature.* 1992 355: 548-551.
8. Buxton J, Shelbourne P, Davies J, Jones C, Van Tongeren T, Aslanidis C, Jong P, Jansen G, Anvert M, Riley B, Williamson R, Johnson K. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with DM. *Nature.* 1992 355: 547-548.
9. Fu Y, Pizzuti A, Fenwick R, King J Jr, Rajnarayan S, Dunne P, Dubel J, Nasser G, Ashizawa T, Jong P, Wieringa B, Koeneluk R, Perryman M, Epstein H, Caskey C. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science.* 1992 255: 1256-1258.
10. Harley H, Brook J, Rundle S, Crow S, Reardon W, Buckler A, Harper P, Housman D, Shaw D. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in DM. *Nature.* 1992 355: 545-546.
11. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shuter G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barceló J, O'Hoy K, Leblond S, Earle-Macdonald J, Jong P, Wieringa B, Korneluk R. Myotonic Dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science.* 1992 255: 1253-1255.
12. Maeda M, Taft C, Bush E, Holder E, Bailey W, Neville H, Perryman M, Bies R. Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 70-kDa forms of DMPK J. *Biol. Chem.* 1995 270: 20246-20249.
13. Salvatori S, Biral D, Furlan S, Marin O. Evidenci for localization of the myotonic dystrophy protein kinase to the terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum. *J. Mus. Res. Cell. Motil.* 1997 18: 429-440.
14. Meiner A, Wolf C, Carey N, Okitsu A, Johnson K, Shelbourne P, Kunath B, Sauermann W, Thiel H, Kupferling P, Kunert E. Direct molecular analysis of myotonic dystrophy in the German population: important considerations in genetic counselling. *J. Med. Genet.* 1995 32: 645-649.
15. Thornton C, Wymer J, Simmons Z, McClain C, Moxley III. Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat. Genet.* 1997 16: 407-409.
16. Caskey C, Swanson M, Tjmenchenko L. Myotonic Dystrophy: Discussion of molecular mechanism. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1996 61: 607-614.
17. Chahine M, George Jr A. Myotonic Dystrophy modulates skeletal muscle but not cardiac voltage-gated sodium channels. *FEBS Lett.* 1997 142: 621-624.
18. Johnson K, Boucher C, King S, Winchester C, Bailey M, Hamilton G, Carey N. Is myotonic dystrophy a single-gene disorder? *Biochem. Soc. Trans.* 1996 24: 510-513.
19. Hecht B, Donnelly A, Gedeon A, Byard R, Haan E, Mulley J. Direct molecular diagnosis of the myotonic dystrophy. *Clin. Genet.* 1993 43: 276-285.
20. Lavedan C, Hofmann-Radvanyi H, Shelbourne P, Rabes J, Duros C, Savoie D, Dehaupas I, Luce S, Johnson K, Junien C. Myotonic Dystrophy: size and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* 1993 52: 875-883.
21. La Spada A, Paulson H, Fishbeck K. Trinucleotide repeat expansion in neurological disease. *Ann. Neurol.* 1994 36: 814-822.
22. Ishii S, Nishio T, Sunohara N, Yoshihara T, Takemura K, Hiki K, Tsujino S, Sakuragawa N. Small increase in triplet length of cerebellum from patient with myotonic dystrophy. *Hum. Genet.* 1996 98: 138-140.
23. Wrogemann K, Biancalana V, Devys D, Imbert G, Trottier Y, Mandel J. Microsatellites and disease: A new paradigm. DNA fingerprinting: State of the science, ed. by S.J.D. Pena, R. Chakraborty, et al. Berlin: Birkhäuser. 1993 141-152.
24. Brunner H, Brüggewirh H, Nillesen W, Jansen G, Hamel B, Hoppe R, de Die C.E.M., Höweler C, van Oost, B, Wieringa B, Ropers H, Smeets H. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am. J. Hum. Genet.* 1993 53: 1016-1023.
25. Harley H, Rundle S, MacMillan J, Myring J, Brook D, Crow S, Reardon W, Fenton I, Shaw D, Harper P. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 1993 52: 1164-1174.
26. Wong L, Ashizawa T, Monckton D, Caskey C, Richards C. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am. J. Hum. Genet.* 1995 56: 114-122.
27. Martorell L, Johnson K, Boucher C, Biaget M. Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)<sub>n</sub> repeat during human fetal development. *Hum. Mol. Genet.* 1997 6: 887-880.
28. Carango P, Noble J, Marks H, Funange V. Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* 1993 18: 340-348.
29. Fu Y, Friedman D, Richards S, Pearman J, Gibbs R, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman M, Scarlato G, Fenwick R, Caskey C. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science.* 1993 260: 235-238.
30. Bhagwati S, Ghatpande A, Leung B. Normal levels of DM RNA and myotonin protein kinase in skeletal muscle from adult myotonic dystrophy (DM) patients. *Biochem. Biophys. Acta.* 1996 1317: 155-157.
31. Sabourin L, Mahadevan M, Narang M, Lee D, Surh L, Korneluk R. Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of DM gene. *Nat. Genet.* 1993 4: 233-238.
32. Bhagwati S, Ghatpande A, Leung B. Identification of two nuclear proteins which bind to RNA CUG repeats: significance for myotonic dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 228: 55-62.
33. Morrone A, Pegoraro E, Angelini C, Zammarchi E, Marconi G, Hoffman E. RNA metabolism in myotonic dystrophy: Patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent with abnormal insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1997 99: 1691-1698.
34. Wang Y, Amirhaerin S, Kang S, Wells R, Griffith J. Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeat from myotonic dystrophy gene. *Science.* 1994 265: 669-671.
35. Wang Y, Griffith J. Expanded CTG repeat blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning element. *Genomics.* 1995 25: 570-573.
36. Taneja K, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer R.



Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of DM cells and tissues. *J. Cell. Biol.* 1995 128: 995-1002.

37. Davis B, McCurrach M, Taneja K, Singer R, Housman D. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997 94: 7388-7393.

38. Wang J, Pegoraro E, Menegazzo E, Gennareli M, Hoop R, Angelini C, Hoffman E. Myotonic Dystrophy: evidence for a dominant-negative RNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1995 4: 599-606.

39. Kraahe R, Ashizawa T, Abbruzzese C, Roeder E, Carango P, Giancanelli M, Funanage V, Siciiano M. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics.* 1995 28: 1-14.

40. Timchenko L, Miller J, Timchenko N, DeVore D, Datar K, Lin L, Roberts R, Caskey C, Swanson M. Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucl. Acids. Res.* 1996 24: 4407-4414.

Timchenko L, Timchenko N, Caskey C, Roberts R. Novel proteins with binding specificity: Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucl. Acids. Res.* 1996 24: 4407-4414.

42. Benders A, Groenen P, Oerlemans F, Veerkamp J, Wieringa B. Myotonic Dystrophy is involved in the modulation of the Ca<sup>2+</sup>-homeostasis in skeletal muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1997 100: 1440-1447.

43. Ashizawa T, Dume P, Ward P, Seltzer W, Richards C. Effects of the sex of DM patients on the unstable triplet in their affected offspring. *Neurology.* 1994 44: 120-122.

44. Cobo A, Poza J, Martorell L, López de Munain A, Empananza J, Biaget M. Contribution of molecular analysis to the estimation of the risk of congenital DM. *J. Med. Genet.* 1995 32: 105-108.

45. Abielovich D, Lerer Y, Pashut-Lavon I, Shmueli R, Raas-Rothschild A, Frydman M. Negative expansion of the myotonic dystrophy unstable sequence. *Am. J. Hum. Genet.* 1993 52: 1175-1181.

46. de Die-Smulders CEM, Höweler C, Mirandolle J, Brunner H, Hovers V, Brüggewirth H, Smeets H, Garaedto J. Anticipation resulting in elimination of the DM gene: a follow up study of one extended family. *J. Med. Genet.* 1994 31: 595-601.

47. Imbert G, Krets C, Johnson K, Mandel J. Origin of the expansion mutation in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 1993 4: 72-76.

48. López de Munain A, Cobo A, Poza J, Navarrete D, Martorell L, Palau F, Empananza J, Biaget M. Influence of the sex of the transmitting grandparent in congenital DM. *J. Med. Genet.* 1995 32: 689-691.

49. Quesada R, Brian R. La enfermedad de Steinert Neonatal. Reporte de cuatro casos en Costa Rica y revisión de la literatura. *Neuroeje.* 1992 10: 13-19.

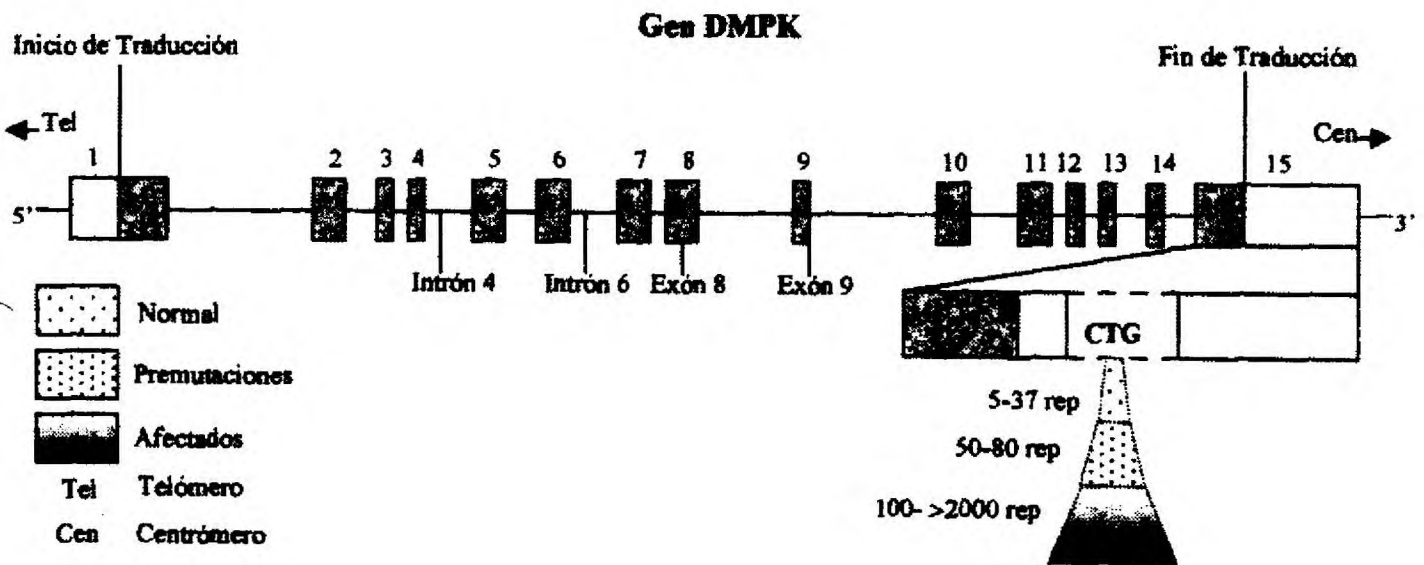


Figura 1. Organización estructural del gen DMPK  
 El gen DMPK consta de 15 exones (rectángulos) y 14 intrones (líneas). Los 15 exones se transcriben y durante la maduración del ARN los intrones son eliminados, resultando en un ARNm de 3.2 Kb que se traduce en la proteína llamada miotonina o proteína quinasa de la DM (solo la parte sombreada de los exones se traduce). Se muestra la repetición CTG en la región 3' no traducida en el exón 15, al igual que los distintos ámbitos en el número de repeticiones descritos en la literatura. La dirección hacia el centrómero y telómero del cromosoma # 19 también está señalada.

Figure 1. Structural organization of DMPK gene.  
 DMPK gene has 15 exons (rectangles) and 14 introns (lines). All 15 exons are transcribed and introns are eliminated during RNA's maturation, resulting in an RNAm of 3.2 Kb which is translated into the protein called myotonin or MD's protein kinase (only the shadowed part of the exons is translated). The CTG repetition is shown in the 3' untranslated region on exon 15, as well as the different ranges in the number of repetitions described in the literature. The direction towards the centromere and telomere of chromosome # 19 is also shown.

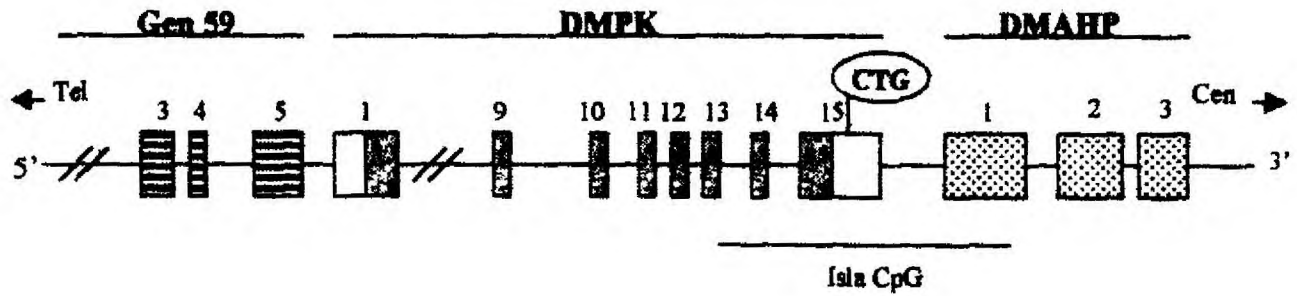


Figura 2. Genes relacionados con la repetición CTG en el gen DMPK. Se muestra la organización estructural de los genes alrededor de la repetición CTG en el gen DMPK. La distancia que separa al gen DMPK de sus vecinos (Gen 59 mostrado como rectángulos rellenos de rayas y el gen DMAHP mostrado como rectángulos rellenos de puntos) es de aproximadamente de 1 Kb. Se muestra la isla CpG que abarca alrededor de 3.6 Kb conteniendo la región final del gen DMPK (región que presenta la repetición CTG) y parte del primer exón del gen DMAHP. Se señalan la dirección del centrómero y del telómero.

Figure 2. Genes related to the repetition CTG in gene DMPK. The structural organization of genes around the CTG repetition is shown. The distance between gene DMPK and its neighbours (gene 59 shown as rectangles filled with lines and gene DMAHP shown as rectangles filled with dots) is around 1KB. The CGP island is shown, it covers about 3.6 Kb containing the end region of gene DMPK (where the CTG repetition takes place) and some part of the first exon of gene DMAHP. Centromere and telomere directions are signaled.