



Población y Salud en Mesoamérica

ISSN: 1659-0201

revista.ccp@ucr.ac.cr

Universidad de Costa Rica

Costa Rica

Vásquez Cerdas, Melissa; Vindas-Smith, Rebeca; Cuenca Berger, Patricia; del Valle Carazo, Gerardo; Morales Montero, Fernando
Estudios genético-moleculares de miotonías hereditarias en la población costarricense
Población y Salud en Mesoamérica, vol. 19, núm. 2, 2022, Enero-Junio, pp. 442-464
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica

DOI: <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.48067>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44670274019>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

CCP

Centro Centroamericano
de Población

Doi: <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.48067>
19, número 2, Art. Cient. enero-junio 2022



Población y Salud en Mesoamérica

Estudios genético-moleculares de miotonías hereditarias en la población costarricense

Melissa Vásquez Cerdas, Rebeca Vindas-Smith, Patricia Cuenca Berger, Gerardo del Valle Carazo y Fernando Morales Montero

Como citar este artículo:

Vásquez Cerdas, M., Vindas-Smith, R., Cuenca Berger, P., del Valle Carazo, G. y Morales Montero, F. (2022). Estudios genético-moleculares de miotonías hereditarias en la población costarricense. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2). Doi: 10.15517/psm.v0i19.48067



ISSN-1659-0201 <http://ccp.ucr.ac.cr/revista/>

Revista electrónica semestral
[Centro Centroamericano de Población](#)
[Universidad de Costa Rica](#)

Estudios genético-moleculares de miotonías hereditarias en la población costarricense

Molecular-genetic studies of inherited myotonic conditions in Costa Rica

Melissa Vásquez Cerdas¹, Rebeca Vindas-Smith², Patricia Cuenca Berger³, Gerardo del Valle Carazo⁴ y Fernando Morales Montero⁵

Resumen: Introducción: las miotonías hereditarias son enfermedades del músculo esquelético, clínica y genéticamente heterogéneas, caracterizadas por presentar miotonía (retraso en la relajación muscular). Se dividen en distróficas y no distróficas, las cuales son causadas por mutaciones en el ADN. **Objetivo:** describir los hallazgos más relevantes sobre algunas miotonías hereditarias en Costa Rica. **Metodología:** se realizaron estudios genético-moleculares en individuos afectados con una condición miotónica y sus familiares en riesgo genético. **Resultados:** la mutación de la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) se encontró en 246 individuos. Nuestros estudios contribuyeron a mejorar la correlación entre el tamaño de la mutación y la edad de inicio de los síntomas, además, se demostró el papel modificador de algunos otros factores genéticos en la DM1. De las familias de 18 pacientes negativos para la mutación DM1, en ocho se logró identificar una mutación en genes que proporcionan la información para formar canales iónicos. Los análisis de función ayudaron a mostrar que esas mutaciones ocasionan cambios estructurales y estos modifican las propiedades de los canales, provocando una pérdida o ganancia de su función. **Conclusiones:** este trabajo permitió la clasificación clínica correcta de muchos pacientes, así como explorar las bases genéticas y moleculares de la variabilidad clínica de estas enfermedades, mediante la búsqueda de factores modificadores de la DM1 y los estudios funcionales de mutaciones causantes de canalopatías hereditarias, aspecto clave para asesorar a pacientes y familias y abordar la enfermedad de la forma más adecuada.

Palabras clave: análisis funcionales, diagnóstico molecular, miotonías, mutación.

Abstract: Introduction: Hereditary myotonias are a clinically and genetically heterogeneous group of skeletal muscle diseases characterized by myotonia (delayed muscle relaxation). Clinically, they are classified as dystrophic and non-dystrophic myotonias, which are caused by mutations in the DNA. Aim: Describe the most relevant findings on some hereditary myotonias in Costa Rica. **Methodology:** Genetic-molecular studies of these diseases were carried out in individuals affected with a myotonic condition and their relatives at genetic risk. **Results:** The mutation for myotonic dystrophy type 1 (DM1) was found in 246 individuals. We

¹ Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo electrónico: melissa.vasquez@ucr.ac.cr. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8879-5500>

² Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo electrónico: rebeca.vindas@ucr.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-0805>

³ Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo electrónico: patcube03@yahoo.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1255-2809>

⁴ Laboratorio de Neurofisiología (Neuro-Lab) San José, COSTA RICA. Correo electrónico: neurolab22@yahoo.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9450-6405>

⁵ Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA Correo electrónico: fernando.moralesmontero@ucr.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6564-8671>

have seen an improvement in the correlations between the size of the mutation and the age of onset of symptoms, in addition we have demonstrated the modifying role of some genetic factors in DM1. Of 18 patients who were negative for the mutation causing DM1, in eight families, a mutation was identified in genes, that provide the instructions for producing proteins called ion channels. Analyzes at the functional level helped to show that these mutations cause structural changes that modify the properties of these channels, causing a loss or gain of channel function. **Conclusions:** Our studies have allowed a correct clinical classification for many patients with these pathologies, in addition to explore the genetic and molecular basis of the clinical variability of these diseases, by searching for DM1 modifying factors and functional studies of new mutations that cause hereditary channelopathies, which is key to provide genetic counseling to patients and families and treating the disease in the most appropriate way.

Keywords: Functional analyses, Molecular diagnosis, Mutation, Myotonias.

Recibido: 12 ago, 2021 | **Corregido:** 01 nov, 2021 | **Aceptado:** 05 nov, 2021

1. Introducción

Las miotonías hereditarias son enfermedades genéticas raras, se presentan con muy baja frecuencia en el país. Sin embargo, son altamente discapacitantes, limitan la movilidad y, por tanto, afectan la funcionalidad y la calidad de vida de quienes las padecen; además, por su origen genético cuentan con escasas opciones terapéuticas y de prevención. Así pues, representan un reto para el paciente, su familia y el sistema de salud, ya que, por su poca ocurrencia, se requieren grandes esfuerzos para diagnosticarlas de forma temprana, comprender sus manifestaciones clínicas y encontrar el abordaje apropiado. Debido a su complejidad, gravedad y a que comprometen diferentes órganos y sistemas simultáneamente, explorar las bases genéticas y moleculares de la variabilidad clínica (variación de las manifestaciones clínicas) en cuanto al tipo y severidad de estas patologías entre individuos afectados y familias con la misma alteración genética, así como realizar un diagnóstico certero, resultan claves para brindar la asesoría y el tratamiento más adecuado.

En este artículo presentamos un resumen de los hallazgos de mayor relevancia ya publicados en la investigación sobre las miotonías hereditarias en la población costarricense, la cual venimos desarrollando en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica desde el año 1998. Describimos los ensayos dirigidos a lograr la clasificación clínica correcta de muchos pacientes, al lado de estudios que han permitido examinar y entender mejor la variabilidad clínica de estas enfermedades, mediante la búsqueda de elementos modificadores de la distrofia

miotónica tipo 1 (DM1) y los análisis funcionales de nuevas mutaciones causantes de canalopatías hereditarias.

Lo anterior ha sido posible gracias al financiamiento otorgado durante todos estos años por la Universidad de Costa Rica (UCR), el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica, la Asociación Americana de Distrofias Musculares (MDA) y la Asociación Francesa contra las Miopatías (AFM-Téléthon), junto con colaboradores nacionales e internacionales.

2. Referente teórico

Las miotonías hereditarias son un grupo heterogéneo de enfermedades del músculo esquelético caracterizadas por presentar miotonía (relajación muscular retrasada, más lenta de lo normal) como signo principal (Morales y Push, 2020). Se dividen en dos subgrupos, según las características clínicas que presentan los pacientes: las distróficas y las no distróficas. Dentro de las primeras están la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) y la distrofia miotónica tipo 2 (DM2), causadas por un daño o mutación en dos segmentos del material genético (ADN), específicamente en los genes *DMPK* y *CNBP1*, respectivamente (Brook et al., 1992; Liquori et al., 2001). El grupo de las segundas (NDM) se atribuye a mutaciones en los genes *CLCN1* y *SCN4A*, los cuales proporcionan instrucciones para producir proteínas llamadas canales iónicos (Ptacek et al., 1991; Lorenz et al., 1994), por lo que a las NDM se les ha dado el nombre de canalopatías miotónicas.

La DM1 es la enfermedad muscular hereditaria más común en adultos jóvenes y es causada por una mutación en el gen *DMPK*. Este gen guía la producción de la proteína quinasa de distrofia miotónica, la cual parece desempeñar un papel importante en las células musculares, cardíacas y cerebrales, asimismo, al interactuar con otras, participa en la comunicación intracelular y en la regulación de la actividad y las funciones de estructuras importantes dentro de las células musculares. Se trata de un trastorno de herencia dominante, o sea, una persona necesita heredar solo una copia del gen defectuoso de cualquiera de los progenitores para desarrollarlo (Harper, 1989), se caracteriza por la presencia de miotonía, debilidad y desgaste muscular progresivo y numerosas manifestaciones sistémicas, tales como alteraciones cardíacas, trastornos del sueño y digestivos, complicaciones respiratorias, problemas endocrinos y aparición de cataratas (Harper, 1989). Tanto la edad de inicio de los síntomas como el cuadro clínico son altamente variables y, de acuerdo con esos dos parámetros, los pacientes se han clasificado en diferentes subtipos clínicos: 1-

manifestación tardía; 2- clásico; 3- pediátrico y 4- congénito (Ashizawa et al., 1992; Harper, 1989; Hecht et al., 1993).

La mutación responsable de la DM1 consiste en tres bloques de construcción de ADN repetidos varias veces en el gen *DMPK*. Esta secuencia corresponde a la tripleta o trinucleótido CTG (citosina, timina, guanina). Los individuos no afectados con la enfermedad tienen de 5 a 37 repeticiones de la tripleta CTG, mientras que, en los pacientes con síntomas de DM1 la recurrencia es mayor y tienen desde aproximadamente 50 hasta varios miles (Brook et al., 1992). El tamaño de la mutación, es decir, el número de unidades de la repetición CTG, correlaciona positivamente con la severidad de la enfermedad: las personas con cantidades pequeñas o grandes manifiestan síntomas leves o graves, respectivamente. Además, correlaciona negativamente con la edad de inicio, esto es, entre mayor sea el número de repeticiones CTG, a menor edad aparecen los síntomas (Morales et al., 2020; Redman et al., 1993). En los pacientes, la expansión es altamente inestable (*i. e.* cambia de tamaño) tanto en la línea somática como en la germinal. La inestabilidad somática se refiere a la presencia de diferentes tamaños de la expansión entre distintos tejidos y dentro del mismo tejido y al aumento en el tamaño de la mutación a lo largo de la vida del paciente (Corrales et al., 2019; Lavedan et al., 1993; Morales et al., 2012; Wong et al., 1995).

Las NDM o canalopatías miotónicas son trastornos hereditarios originados por la disfunción de un canal iónico debido a diferentes mutaciones en los genes *CLCN1* o *SCN4A*, dicho en otros términos, son enfermedades con heterogeneidad alélica: diferentes mutaciones en un mismo gen producen la misma enfermedad, en muchos casos con expresión fenotípica variable. El gen *CLCN1* aporta instrucciones para producir un tipo de proteína llamada canal de cloruro, en tanto el gen *SCN4A* lo hace para crear una parte fundamental (la subunidad alfa) de los canales de sodio. Estos canales transportan, respectivamente, iones cloruro e iones sodio en las células y se encuentran en los músculos utilizados para el movimiento (músculos esqueléticos), ambos son claves en la capacidad de una célula para generar y transmitir señales eléctricas (Cannon 2017; Koch et al., 1992). En el ámbito clínico, los pacientes con una NDM presentan miotonía eléctrica y/o clínica, rigidez muscular e hipertrofia muscular ocasional, pero hay ausencia de debilidad muscular progresiva e histopatología distrófica (Morales y Push, 2020; Stunnenberg et al., 2020).

En línea con lo apuntado, las NDM se dividen en canalopatías de cloruro y canalopatías de sodio. Por un lado, la canalopatía de cloruro o miotonía congénita (MC), provocada por mutaciones en el gen *CLCN1* (Koch et al., 1992), es la canalopatía hereditaria del músculo esquelético más común. Se trata de una enfermedad no progresiva con un inicio de los síntomas en la primera o segunda década de vida (Cannon 2015; Heatwole y Moxley, 2007) y se distingue principalmente por conllevar

debilidad muscular –disminución de la fuerza de los músculos con limitación del rango de movimientos voluntarios, dificultades para iniciar la movilización, rigidez muscular generalizada y el fenómeno de calentamiento–, remisión o alivio de la rigidez cuando se realizan contracciones musculares repetidas, por ejemplo, al caminar o correr, entre otros síntomas (Cannon 2015; Heatwole y Moxley, 2007; Koch et al., 1992; Lehmann-Horn et al., 2004).

Hasta el momento, se han descrito más de 200 diferentes mutaciones en el gen *CLCN1*, las cuales se exponen en el siguiente enlace: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. La transmisión de la MC puede ser de herencia autosómica dominante (enfermedad de Thomsen) o de herencia autosómica recesiva (miotonía tipo Becker). En este último caso, una herencia recesiva significa que se deben heredar dos copias de un gen defectuoso (una de ambos progenitores) para dar paso a la enfermedad, de hecho, es la más común, con una prevalencia de 1 en 23 000 individuos; en cambio, la forma dominante se reporta en 1 de cada 50 000 personas en la población caucásica (Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999). Ambas enfermedades son clínicamente variables, pero la forma recesiva es más severa y sus síntomas empiezan a una edad más temprana que la dominante (Dupré et al., 2009; Koch et al., 1992; Koch et al., 1993).

Por su lado, las canalopatías de sodio son enfermedades de herencia dominante a raíz de las mutaciones en el gen *SCN4A* (Cannon, 2017); se han identificado más de 80 mutaciones diversas asociadas con miotonía, las cuales se pueden revisar en el enlace <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Con respecto a su prevalencia, se estima en 0.43/100 000 para el caso del Reino Unido y en 1.19/100 000 para el de Francia (Horga et al., 2013). Sus síntomas varían de un paciente a otro y son episódicos, esporádicos (Cannon, 2017) y con diferentes grados de debilidad o rigidez muscular. La miotonía de los músculos del párpado se considera una característica distintiva. La edad de inicio corresponde usualmente a la primera década y la enfermedad podría ser progresiva en algunas personas (Ptacek et al., 1994; Platt y Griggs, 2009). El cuadro clínico muestra un espectro continuo de síntomas que dependerá de la enfermedad asociada, a saber: 1- parálisis periódica hipercalémica con miotonía; 2- miotonías del canal de sodio y 3- paramiotonía congénita (Cannon, 2017).

3. Metodología

3.1 Enfoque

Este es un estudio original, descriptivo, que muestra un resumen de los hallazgos más relevantes sobre los estudios genéticos de las miotonías hereditarias en Costa Rica.

3.2 Población del estudio

La población de estudio estuvo constituida por individuos con diagnóstico clínico presuntivo de una miotonía hereditaria debido a una electromiografía positiva (EMG+) y sus familiares de primer y segundo grado de consanguinidad en riesgo genético, es decir, asintomáticos, pero con probabilidades de haber heredado la mutación responsable y, por lo tanto, de desarrollar la enfermedad. La recolección de las muestras inició en el año 1998 y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica. En total, en nuestras investigaciones han participado más de 450 personas entre pacientes y parientes asintomáticos.

3.3 Técnicas de recolección

Los primeros pacientes fueron captados a través de los registros del Hospital Nacional de Niños y en la consulta externa del Hospital San Juan de Dios. Los pacientes (y sus familiares en riesgo) fueron contactados para invitarlos a participar en los estudios y se visitaron en sus casas de habitación. El resto fueron referidos directamente al INISA por un neurólogo. Todos fueron informados en detalle sobre las características de la enfermedad y las particularidades de su herencia; de igual modo, se les realizó una entrevista, con el fin de obtener información personal y antecedentes familiares. Quienes accedieron firmaron una fórmula de consentimiento informado aprobada por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica. A cada persona se le tomó una muestra de sangre para los análisis moleculares.

3.4 Procesamiento de análisis

3.4.1 Extracción de ADN

De la muestra de sangre que se le tomó a cada individuo, se obtuvo el ADN por medio de un método de laboratorio conocido como extracción con proteinasa K-fenol-cloroformo y se siguieron los procedimientos usuales (Sambrook y Russel, 2001).

3.4.2 Diagnóstico molecular DM1

Este es un procedimiento de diagnóstico directo e incluye la aplicación de técnicas de biología molecular para, entre otras cosas, identificar las mutaciones en el ADN responsables de provocar las enfermedades y detectar riesgos. Con el objetivo de confirmar el diagnóstico presuntivo de DM1, se realizó un análisis molecular para determinar el número de tripletas CTG en los pacientes y sus familiares, basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual facilita amplificar o multiplicar copias de un determinado fragmento de ADN y/o hibridación de Southern de digestión de ADN genómico; esto detecta una secuencia específica de ADN en una muestra y es el método estándar de diagnóstico molecular para la DM1, según condiciones ya publicadas (Monckton et al., 1995; Shelbourne et al., 1993; Morales et al., 2001). En estos estudios, el tamaño de la repetición se observa como una mancha de gran tamaño en las personas que tienen la mutación causante de la enfermedad debido a la inestabilidad somática.

3.4.3 Estimación del tamaño del alelo progenitor (PAL) y cuantificación de la inestabilidad somática mediante small pool PCR (SP-PCR)

A través del método SP-PCR es posible medir el tamaño de la mutación DM1 en células individuales, al amplificar un número reducido de moléculas de ADN mediante diluciones en serie que resuelven la mancha heterogénea detectada por experimentos de PCR estándar o por la hibridación de Southern. Así, a partir de la electroforesis en gel de agarosa se resuelven los productos de la SP-PCR y con la hibridación de Southern, se detectan.

Específicamente, el tamaño de la mutación se mide utilizando el borde inferior de la distribución, el cual se asemejaría al tamaño de la mutación heredada de padres a hijos. Por tal razón, a este tamaño de la mutación le hemos denominado como el tamaño estimado del alelo progenitor (ePAL – tamaño estimado de la mutación heredada de padres a hijos). Este método también cuantifica de forma detallada el grado de variación de la longitud de la repetición en una muestra determinada. En ambos casos, los productos de PCR fueron medidos usando el programa Kodak Molecular Imaging Software 3.5.4 (Carestream Health, Inc.) o el Uvibandmap (UVITEC, UK) (Gomes-Pereira et al., 2004; Morales et al., 2012; Morales et al., 2020).

3.4.4 Análisis de polimorfismos en genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR)

Con el propósito de tratar de estudiar las bases genéticas y moleculares de la variabilidad clínica de estas enfermedades, se analizaron otras regiones del ADN que muestran diferencias de una persona a otra y pueden estar asociadas al riesgo de desarrollar alguna patología. Para ello, se recurrió al ensayo de PCR, seguido por la digestión con enzimas que cortan el ADN, más conocida como PCR-RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). De tal manera, en 199 muestras se evaluaron 13 polimorfismos en algunos de los genes del sistema MMR, 9 en MSH3 y 1 en cada uno de los genes MSH2, PMS2, MSH6 y MLH1 (Morales et al., 2016).

3.4.5 Diagnóstico molecular de canalopatías miotónicas

Algunos de los primeros pacientes negativos para la DM1 fueron reevaluados clínicamente, incluyendo exámenes físicos, electromiográficos, oculares y electrocardiogramas a algunos miembros de las familias. Quienes resultaron negativos para la mutación en el gen *DMPK* y aquellos con un diagnóstico clínico presuntivo de una canalopatía miotónica (tres pacientes), se tamizaron para la búsqueda de mutaciones en los genes *CLCN1* y *SCN4A*, empleando las técnicas de polimorfismo de conformación de hebra sencilla (PCR-SSCP) y secuenciación de Sanger (Lehmann-Horn et al., 1995; Morales et al., 2008; Orita et al., 1989).

La técnica de PCR-SSCP se utiliza cuando se conoce o se sospecha del gen responsable de una enfermedad, pero se desconoce dónde se ubica la mutación, como era el caso de estos pacientes negativos para la mutación causante de la DM1. La región de ADN a analizar se amplifica por PCR y los productos de PCR de doble hebra se desnaturalizan por calor (se separan las hebras), de seguido, se examinan las hebras simples por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Después, los geles se someten a tinción con nitrato de plata. Un cambio en la secuencia provoca cambios conformacionales en la hebra de ADN y estos se detectan porque alteran la migración electroforética en los geles. Si bien, este método no nos dice de qué tipo de alteración se trata, nos permite descartar rápidamente la presencia de variantes, lo que ahorra tiempo y recursos.

Entonces, usando la PCR, se amplificaron los 23 exones del gen *CLCN1* bajo las condiciones previamente reportadas (Lehmann-Horn et al., 1995; Orita et al., 1989) y optimizadas en el laboratorio del INISA con modificaciones menores (Morales et al., 2008). Las secuencias de los iniciadores para los 24 exones del gen *SCN4A* se diseñaron en el programa Primer3 y Oligo 7 y

fueron sintetizados por Macrogen (Corea). Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick (QIAGEN) y se secuenciaron en un ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Los resultados de las secuenciaciones se evaluaron con el programa 4Peaks (mekentosj.com). La confirmación de las variantes genéticas y su tamizaje en 100 individuos sanos no relacionados o con una enfermedad diferente a las NDM se efectuó por PCR-RFLP. Adicionalmente, a fin de descartar la presencia de inserciones o deleciones exónicas en el ADN genómico de los pacientes con una NDM, se estudió la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) con la ayuda de los kits SALSA MLPA 350 CLCN-1-KCNJ2 para el gen *CLCN1* y SALSA MLPA P397 SCN4A-CACNA15 para el gen *SCN4A* de MRC-Holland, conforme a las instrucciones del fabricante.

3.4.6 Caracterización funcional

En interés de entender cómo las mutaciones afectan la función de un canal iónico particular, se analizaron las corrientes iónicas de canales mutantes en sistemas de expresión *in vitro*. Las variantes encontradas se caracterizaron a partir de ensayos de electrofisiología en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, para determinar las propiedades biofísicas de los canales mutados. Los ovocitos se inyectaron/coinyectaron con ARNc de CIC-1, WT y mutante o fueron coinyectados con ARNc de SCN4A (WT o mutante) y beta1-ARNc y se incubaron de 48 a 72 h a 18 °C. Las corrientes se midieron aplicando la técnica de *voltage clamp* de dos electrodos a temperatura ambiente, en concordancia con protocolos publicados previamente (Estevez et al., 2003).

4. Resultados

4.1 Diagnóstico molecular de DM1

Hasta el momento, hemos tratado más de 450 muestras de ADN que provienen de 83 diferentes familias (aparentemente no relacionadas), donde hay al menos una persona afectada con un diagnóstico clínico presuntivo de miotonía hereditaria. Todas las muestras recibieron el ensayo de laboratorio para identificar la mutación en el gen *DMPK*, de esa forma, 246 (130 hombres y 116 mujeres de 65 familias) resultaron positivas a nivel molecular para la mutación DM1 y 150 individuos, parientes de los casos positivos, fueron negativos. La mayoría de los pacientes con la mutación DM1 presentaron la forma clásica de la enfermedad (tabla 1). De las restantes familias, que comprenden un total de 54 personas, 15 se reportaron negativas para la mutación DM1 y 3

tuvieron un diagnóstico clínico presuntivo de una canalopatía miotónica, sin embargo, en estas últimas se buscó la mutación DM1 y también obtuvieron resultados negativos.

4.2 Tamaño del alelo progenitor (PAL) y cuantificación de la inestabilidad somática

El tamaño de la mutación en el gen *DMPK* encontrado en los pacientes afectados con la DM1 fue de 46 a 1727 repeticiones CTG, lo cual corresponde al estimado del tamaño del PAL mutado en cada uno. Tal y como se esperaba, dichos números se correlacionan positivamente con la severidad de la enfermedad y negativamente con la edad de inicio de los primeros síntomas (Morales et al., 2012; Morales et al., 2016; Morales et al., 2020).

El uso del ePAL explicó entre un 60 % y un 70 % de la variación en la edad de inicio de la enfermedad (Morales et al., 2012; Morales et al., 2016), muy por encima de lo obtenido por medio del método estándar (menos del 50 %) (Ashizawa et al., 1992; Harley, 1993; Lavedan, 1993); además, el estudio detallado de los niveles de inestabilidad demostró la contribución de la inestabilidad somática en la edad de inicio y la severidad clínica en la DM1 (Morales et al., 2012; Morales et al., 2020).

4.3 Análisis de polimorfismos en MMR

Se logró obtener el genotipo de los 13 polimorfismos analizados en un total de 199 muestras de DM1. El examen de los polimorfismos de los genes del sistema MMR con respecto a los niveles de inestabilidad de la repetición CTG reveló un vínculo entre estos últimos y el polimorfismo rs26279 en el gen *MSH3*. Encontramos que los pacientes con el genotipo AA para ese polimorfismo tenían mayores inestabilidades que aquellos con genotipo AG o GG. En este estudio, no detectamos una correspondencia de los niveles de inestabilidad con la edad de inicio de los síntomas (Morales et al., 2012; Morales et al., 2016).

4.4 Diagnóstico molecular de canalopatías miotónicas

Luego de las reevaluaciones clínicas a algunos de los pacientes negativos para la mutación DM1 (18 individuos de 2 familias), la mayoría fue diagnosticada clínicamente con una canalopatía miotónica o con una condición similar, en concreto, con la enfermedad de Thomsen o con la miotonía tipo Becker (Morales et al., 2003; Morales et al., 2008), por tal motivo, se inició la búsqueda de la mutación en el gen *CLCN1*.

De acuerdo con lo anterior, de las 18 familias con resultados negativos para la mutación DM1, el probando de cada una de ellas, o sea, el primer familiar afectado que atrajo la atención, fue tamizado para el gen *CLCN1*. A raíz de esta búsqueda, se encontraron variantes ya reportadas en la literatura para la enfermedad de Becker o Thomsen, así como variantes nuevas (no descritas antes) (Brenes et al., 2021; Morales et al., 2008; Vindas-Smith et al., 2016), las cuales se nombraron con una nomenclatura estándar, siguiendo las directrices establecidas por la Human Genome Variation Society (HGVS) (<http://varnomen.hgvs.org/>). El primer hallazgo de una mutación nueva fue la de p.Q412P en el gen *CLCN1*, esta se encuentra en estado homocigota en los individuos afectados, concordando así con un patrón de herencia recesivo y confirmando el diagnóstico clínico de la miotonía tipo Becker (Morales et al., 2008). En total, hemos logrado determinar seis diferentes mutaciones en el gen *CLCN1* en 7 de las 18 familias (tabla 2), a pesar de eso, algunas de ellas no muestran un patrón de herencia claro o muestran un patrón opuesto a lo reportado en otros estudios, así como un fenotipo atípico (Brenes et al., 2021; Morales et al., 2008; Vindas-Smith et al., 2016).

En una de las familias donde se constató una mutación nueva, la p.W322* en *CLCN1*, identificamos parientes del probando que, pese a estar clínicamente afectados y de haber sido diagnosticados con la enfermedad de Thomsen, no presentaban dicha mutación. En vista de esto y de que los probandos de las otras 11 familias dieron negativo para una mutación en el *CLCN1*, se tamizó el gen *SCN4A* en busca de la mutación que explicara su sintomatología, lo que nos permitió distinguir en una familia una mutación en el gen *SCN4A*, ampliamente conocida y estudiada, la p.T1313M (Brenes et al., 2021). El probando de esta familia tiene un fenotipo típico de la paramiotonía congénita. Asimismo, hallamos otra mutación en el gen *SCN4A*, la p.R1463H, en la familia donde también se está transmitiendo la mutación p.W322* en el gen *CLCN1*, pero en un probando distinto (tabla 2) (Brenes et al., 2021). Este es el primer caso de una familia costarricense afectada por una canalopatía miotónica con la coexistencia de mutaciones en los genes *CLCN1* y *SCN4A*.

En cuanto a las 10 familias restantes, estas resultaron negativas para mutaciones en los genes *DMPK*, *CLCN1* y *SCN4A*, por ende, es probable que la mutación causante de la enfermedad se encuentre en otro gen. Adicionalmente y debido a que se han descrito duplicaciones o deleciones de estos genes en pacientes con miotonías hereditarias (Raja Rayan et al., 2012), realizamos el ensayo de MLPA, sin embargo, se descartó la presencia de inserciones o deleciones exónicas en el ADN genómico de los 18 probandos libres de la DM1 (datos no mostrados).

4.5 Caracterización funcional y estructural de mutaciones en los genes *CLCN1* y *SCN4A*

Dados algunos aspectos atípicos, clínicos o genéticos en unas de las familias afectadas por NDM, llevamos a cabo estudios funcionales y estructurales de algunas mutaciones en esos dos genes, con el propósito de brindar evidencia sobre cómo la disfunción del canal (originada por las mutaciones respectivas) podría contribuir a entender ciertas características inusuales en dichas familias. En virtud de estos ejercicios se comprobó que las mutaciones R1463H en *SCN4A* y p.Q412P, p.W322* y G355R en *CLCN1* modifican las propiedades biofísicas de los canales iónicos y/o alteran la expresión eficiente de la proteína (p.Q412P, p.W322*). En la mayoría de los casos, la caracterización funcional de las mutaciones justifica de mejor manera algunos de los rasgos clínicos o genéticos observados (Brenes et al., 2021; Vindas-Smith et al., 2016).

5. Discusión

Las miotonías hereditarias son enfermedades del músculo esquelético muy variables clínicamente y con síntomas que se traslapan. En diversas ocasiones, esto dificulta establecer un diagnóstico clínico certero, lo cual es crítico para el manejo y el seguimiento oportunos y adecuados (Heatwole y Moxley, 2007; Morales y Push, 2020). Muchas afecciones requieren con urgencia un método de diagnóstico, en lo posible con alta sensibilidad y especificidad. En ese sentido, en Costa Rica no existía una categoría clínica correcta para tales patologías, todas eran llamadas y consideradas a manera colectiva miotonías hereditarias; de ahí, a finales de los años 90 iniciamos con el estudio molecular, a efecto de confirmar el diagnóstico clínico y facilitar la clasificación de los pacientes. Mediante el análisis de macromoléculas como el ADN, se logra brindar gran cantidad de diagnósticos etiológicos de certeza, acortar el tiempo de estudio, ofrecer un buen asesoramiento genético, establecer correlaciones clínicas más precisas que pauten eventualmente el pronóstico y el tratamiento, identificar y agrupar pacientes para su potencial participación en protocolos clínicos particulares o para recibir tratamientos farmacológicos concretos.

Así, en el año 2001 realizamos el primer reporte enfocado en el diagnóstico molecular de la DM1 (Morales et al., 2001). Desde entonces, hemos ido identificando nuevas familias con la mutación DM1 y, al mismo tiempo, familias diagnosticadas con una miotonía hereditaria en donde esa mutación está ausente. Como consecuencia de esto, entre 2002 y 2003, implementamos el diagnóstico molecular de las canalopatías miotónicas, en especial con las enfermedades causadas por mutaciones en los canales de cloruro y de sodio. El primer reporte al respecto surgió en 2003,

con la descripción clínica de la primera familia costarricense afectada con la enfermedad de Thomsen (Morales et al., 2003); más adelante, en 2008, ofrecimos el reporte inicial que incluía no solo la parte clínica, sino también, la confirmación a nivel molecular de la primera familia costarricense afectada por la miotonía tipo Becker (Morales et al., 2008). Así, a través del diagnóstico molecular hemos estado contribuyendo a la clasificación clínica correcta de las miotonías hereditarias en Costa Rica.

Nuestro siguiente objetivo fue elaborar estudios dirigidos a mejorar las correlaciones clínicas genotipo-fenotipo y analizar las bases genético-moleculares de la variabilidad clínica en estas enfermedades. En el caso de la DM1, usamos el ensayo de la SP-PCR para medir el ePAL y cuantificar los niveles de inestabilidad somática. A diferencia del tamaño de la mutación obtenido por el método estándar de diagnóstico molecular (hibridación de Southern), nuestros estudios demostraron que el tamaño del ePAL es el principal modificador de la edad de inicio y que las correlaciones clínicas mejoran de forma significativa (Morales et al., 2012; Morales et al., 2016); esto, por cuanto se están tomando en cuenta y controlando los factores confusores, como la inestabilidad somática presente en la DM1, no considerada en estudios previos. Más importante aún, el uso del ePAL y estudios detallados sobre los niveles de inestabilidad somática en los pacientes con DM1 han demostrado que la edad de inicio es modificada adicionalmente por variación individual en los niveles de inestabilidad, *i. e.* en quienes la repetición se expande más rápido desarrollan los síntomas a edades más tempranas (Morales et al., 2012; Morales et al., 2016; Morales et al., 2020).

Por añadidura, hemos identificado otros factores genéticos modificadores de los niveles de inestabilidad en la DM1 (Morales et al., 2016), según esto, se indica lo siguiente: 1- pueden existir otros factores genéticos que contribuyen a modular el fenotipo de la DM1 y aportar más evidencia para explicar por qué las personas con ePALs similares presentan diferencias en la edad de inicio y gravedad de la enfermedad (Morales et al., 2016); 2- ahora es posible predecir con mayor grado de certeza la edad de inicio de los síntomas y tener una base acerca de la posible evolución de la enfermedad, de acuerdo con la forma como la mutación va cambiando en el tiempo (Morales et al., 2020) y 3- la inestabilidad somática en la DM1 puede ser una diana terapéutica, pues, si se lograra que sus niveles dejen de aumentar o disminuyan, podría detenerse o reducirse la progresión de la enfermedad e incluso su aparición a edades tardías.

Para el caso de las canalopatías miotónicas, nuestras investigaciones orientadas a mejorar las correlaciones clínicas no han sido tan satisfactorias. La mayoría de familias carecían de un cuadro clínico claro y definido, por lo que fueron diagnosticadas inicialmente con la DM1 (Morales et al., 2001). El esfuerzo por ejecutar las reevaluaciones clínicas a los primeros pacientes negativos para la

DM1 ayudó al diagnóstico correcto de varias de sus familias (Morales et al., 2003; Morales et al., 2008) y a determinar el espectro de síntomas, lo cual también ha facilitado en los últimos años el diagnóstico en otras familias costarricenses.

Con el estudio molecular de los pacientes y la confirmación del diagnóstico clínico en algunas familias, se precisaron tanto mutaciones nuevas como ya reportadas (Brenes et al., 2021; Morales et al., 2003; Vindas-Smith et al., 2016). No obstante, el estado homocigota o heterocigota de algunas de ellas no responde al cuadro clínico completo o al patrón de herencia observado en las familias. Con la intención de mejorar estas correlaciones, se condujeron análisis funcionales y estructurales de ciertas mutaciones encontradas en los genes *CLCN1* y/o *SCN4A* y se obtuvo que estas propician el cambio estructural responsable de los datos funcionales que relacionan la mutación con una pérdida o ganancia de función del canal y, a la vez, eso explica algunas de las características observadas en estas familias. Con todo, según los datos de otras mutaciones detectadas, las propiedades biofísicas del canal mutado no difieren del canal silvestre (sin la mutación), lo cual sugiere la presencia de factores genéticos adicionales que podrían influir en el cuadro clínico de estos pacientes (Brenes et al., 2021; Vindas-Smith et al., 2016).

Finalmente, por cuanto en 10 diferentes familias con un cuadro clínico sospechoso de una miotonía hereditaria no se localizó la mutación en los genes *DMPK*, *CLCN1* o *SCN4A*, se infiere que la mutación causante de los síntomas en los probandos se encuentra en otra región del genoma. Es decir, se abre la posibilidad de que haya (n) otro (s) gen (es) asociado (s) con miotonía, ya sea de manera directa o jugando un papel modificador; su identificación y análisis podrían contribuir a explicar algunos de los rasgos clínicos atípicos observados no solo en personas costarricenses, sino también en otras del mundo, lo cual mejoraría las correlaciones clínicas en las canalopatías miotónicas.

6. Conclusiones

Los primeros estudios sobre las miotonías hereditarias en Costa Rica (Brenes et al., 2021; Morales et al., 2001; Morales et al., 2003; Vindas-Smith et al., 2016) evidenciaron la dificultad que el personal clínico tiene para diagnosticarlas certeramente si no se cuenta con el diagnóstico molecular, a su vez, contribuyeron a identificar pacientes con rasgos clínicos atípicos y esto permitió una descripción más detallada de los síntomas referentes a cada patología.

Aunado a lo anterior, el diagnóstico molecular se convirtió en una herramienta poderosa ante estas enfermedades, pues facilitó su clasificación clínica precisa. El campo del diagnóstico molecular ha crecido considerablemente en los últimos años, transformándose en un instrumento clave en beneficio directo de los pacientes y, en este caso concreto, debe considerarse como parte fundamental del abordaje al aumentar las posibilidades de ofrecer un manejo clínico y un asesoramiento genético más apropiado, traducibles en una mejor calidad de vida de los pacientes y sus familiares.

La gran variabilidad clínica presente en estas patologías devela la necesidad de investigar y comprender las bases genéticas y moleculares de cada una, aspectos esenciales para conocer cómo se producen y para desarrollar tratamientos médicos en respuesta. Por eso, nuestra esperanza es que estos estudios motiven a otros colegas latinoamericanos a erigir propuestas similares, inclusive, a establecer colaboraciones estrechas con miras a profundizar la investigación de las miotonías hereditarias en la región.

7. Agradecimientos

A William Araya Hidalgo, Dayana Vargas Sanabria y Jeffrey Roig Fernández del INISA, por su ayuda técnica. A la Universidad de Costa Rica (UCR), el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica, la Asociación Americana de Distrofias Musculares (MDA) y la Asociación Francesa contra las Miopatías (AFM-Téléthon), por el financiamiento para realizar estos estudios.

8. Referencias

- Ashizawa, T., Dunne, C.J., Dubel, J.R., Perryman, M.B., Epstein, H.F., Boerwinkle, E. y Hejtmancik, J.F. (1992). Anticipation In Myotonic Dystrophy .1. Statistical Verification Based On Clinical and Haplotype Findings. *Neurology*, 42, 1871-77. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.10.1871>
- Brenes, O., Barbieri, R., Vásquez, M., Vindas-Smith, R., Roig, J., Romero, A., ... Morales, F. (2021). Functional and structural characterization of CLC-1 and Nav1.4 channels resulting from CLCN1 and SCN4A mutations identified alone and coexisting in myotonic patients. *Cells*, 10(2), 374. <https://doi.org/10.3390/cells10020374>

- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., ... Housman, D.E. (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*, 68, 799-808. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Cannon, S.C. (2015). Channelopathies of skeletal muscle excitability. *Compr Physiol*, 5(2), 761-90. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140062>
- Cannon S.C. (2017) Sodium Channelopathies of Skeletal Muscle. In: Chahine M, editor. Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Cham, p.309-330. https://doi.org/10.1007/164_2017_52
- Corrales, E., Vásquez, M., Zhang, B., Santamaría-Ulloa, C., Cuenca, P., Krahe, R., ... Morales, F. (2019). Analysis of mutational dynamics at the *DMPK* (CTG)_n locus identifies saliva as a suitable DNA sample source for genetic analysis in myotonic dystrophy type 1. *PLoS ONE*, 14(5), e0216407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216407>
- Dupre, N., Chrestian, N. y Bouchard, J.P. (2009). Clinical, electrophysiologic, and genetic study of non-dystrophic myotonia in French-canadians. *NeuromusculDisord*, 19, 330-34. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.01.007>
- Estevez, R., Schroeder, B., Accardi, A., Jentsch, T. y Pusch, M. (2003). Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in ClC-1. *Neuron*, 38, 47-59. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00168-5)
- Gomes-Pereira, M., Bidichandani, S.I. y Monckton, D.G. (2004). Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 277, 61-76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-804-8:061>
- Harley, H.G., Rundle, S.A., MacMillan, J.C., Myring, J., Brook, J.D., Crow, S.,... Harper, P.S. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*, 52, 1164-1174.
- Harper, P.S. (1989). Myotonic Dystrophy. 2nd ed. London: WB Saunders Company.
- Heatwole, C. y Moxley, R. (2007). The nondystrophic myotonias. *Neurotherapeutics*, 4, 238-51. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.01.012>

- Hecht, B.K., Donnelly, A., Gedeon, A.K., Byard, R.W., Haan, E.A. y Mulley, J.G. (1993). Direct molecular diagnosis of the myotonic dystrophy. *Clin Genet*, 43, 276-85. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1993.tb03819.x>
- Horga, A., Raja, R.D.L., Matthews, E., Sud, R., Fialho, D., Durran, S., ... Hanna, M.G. (2013). Prevalence study of genetically defined skeletal muscle channelopathies in England. *Neurology*, 80, 1472-75. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e31828cf8d0>
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., ... Jentsch, T.J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*, 257, 797-800. <https://doi.org/10.1126/science.1379744>
- Koch, M.C., Ricker, K., Otto, M., Wolf, F., Zoll, B., Lorenz, C., ... Jentsch, T.J. (1993). Evidence for genetic homogeneity in autosomal recessive generalised myotonia (Becker). *Journal of Medical Genetics*, 30, 914-917. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.30.11.914>
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J.P., Duros, C., Savoy, D., ... Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size and sex dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet*, 52, 875-83.
- Lehmann-Horn, F., Mailänder, V., Heine, R. y George, A.L. (1995). Myotonia levior is a chloride channel disorder. *Hum Mol Genet*, 4(8), 1397-1402. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.8.1397>
- Lehmann-Horn, F. y Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channel and hereditary disease. *Physiol Rev*, 79, 1317-72. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1317>
- Lehmann-Horn, R., Ruedel, K., y Jurkat-Rott, K. (2004). Nondystrophic myotonias and periodic paralysis. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology* (3rd ed.) New York: McGraw-Hill, p. 1257-300.
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W. y Naylor, S.L. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*, 293, 864-67. <https://doi.org/10.1126/science.1062125>
- Lorenz, C., Meyer-Kleine, C., Steinmeyer, K., Koch, M.C. y Jentsch, T.J. (1994). Genomic organization of the human muscle chloride channel CIC-1 and analysis of novel mutations leading to

Becker-type myotonia. *Human Molecular Genetics*, 3(6), 941–946. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.6.941>

Monckton, D.G., Wong, L.J., Ashizawa T. y Caskey, C.T. (1995). Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Hum Mol Genet*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.1.1>

Morales, F., Cuenca, P., Brian, R., Sittenfeld, M y del Valle, G. (2001). Diagnóstico molecular de la distrofia miotónica en Costa Rica. *AMC*, 43, 159-67.

Morales, F., Cuenca, P., del Valle, G., Brian, R., Sittenfeld, M., Montoya, O., ... Keith, J. (2003). Miotonía congénita: caracterización clínica de una familia costarricense afectada por la enfermedad de Thomsen. *Neuroeje*, 17, 82-86.

Morales, F., Cuenca, P., del Valle, G., Vásquez, M., Brian, R., Sittenfeld, M., ... Ashizawa T. (2008). Clinical and molecular diagnosis of a Costa Rican family with autosomal recessive myotonia congenita (Becker disease) carrying a new mutation in the *CLCN1* gene. *Rev Biol Trop*, 56, 1-11. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i1.5505>

Morales, F., Couto, J., Highman, C., Hogg, G., Cuenca, P., Braidá, C., ... Monckton, D.G. (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), 3558-67. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds185>

Morales, F., Vásquez, M., Santamaría, C., Cuenca, P., Corrales, E. y Monckton, D.G. (2016). A polymorphism in the MSH3 mismatch repair gene is associated with the levels of somatic instability of the expanded CTG repeat in the blood DNA of myotonic dystrophy type 1 patients. *DNA rep*, 40, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.01.001>

Morales, F., Vásquez, M., Corrales, E., Vindas-Smith, R., Santamaría-Ulloa, C., Zhang, B., ... Monckton, D.G. (2020). Longitudinal increases in somatic mosaicism of the expanded CTG repeat in myotonic dystrophy type 1 are associated with variation in age-at-onset. *Human Mol Genet*, 29(15), 2496-2507. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa123>

Morales, F. y Push, M. (2020). An Up-to-Date Overview of the Complexity of Genotype-Phenotype Relationships in Myotonic Channelopathies. *Front Neurol*, 10, 1404. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01404>

- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. y Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(8), 2766-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2766>
- Platt, D. y Griggs, R. (2009). Skeletal muscle channelopathies: new insights into the periodic paralyses and nondystrophic myotonias. *Curr Opin Neurol*, 22, 524-31. <https://doi.org/10.1097/wco.0b013e32832efa8f>
- Ptacek, L.J., Trimmer, J.S., Agnew, W.S., Roberts, J.W., Petajan, J.H., Leppert, M. (1991). Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis map to the same sodium-channel gene locus. *Am J Hum Genet*, 49, 851-4.
- Ptacek, L.J., Tawil, R., Griggs, R., Meola, G., McManis, P., Barohn, R.J., ... Leppert M.F. (1994). Sodium channel mutations in acetazolamide-responsive myotonia congenita, paramyotonia congenita, and hyperkalemic periodic paralysis. *Neurology*, 44, 1500-503. <https://doi.org/10.1212/wnl.44.8.1500>
- Raja Rayan, D.L., Haworth, A., Sud, R., Matthews, E., Fialho, D., Burge, J., ... Hanna, M.G. (2012). A new explanation for recessive myotonia congenital. Exon deletions and duplications in CLCN1. *Neurology*, 78, 1953-58. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e318259e19c>
- Redman, J.B., Fenwick, R.G., Fu, Y.H., Pizzuti, A. y Caskey, C.T. (1993). Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *JAMA*, 269, 1960-65. <https://doi.org/10.1001/jama.1993.03500150072029>
- Sambrook, J. y Russel, I.D.W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shelbourne, P., Davies, J., Buxton, J., Anvret, M., Blennow, E., Bonduelle, M., ... Johnson, K. (1993). Direct diagnosis of myotonic dystrophy with a disease-specific DNA marker. *N Engl J Med*, 328(7), 471-75. <https://doi.org/10.1056/nejm199302183280704>
- Stunnenberg, B.C., LoRusso, S., Arnold, W.D., Barohn R., Cannon, S.C., Fontaine B., ... Statland, J.M. (2020). Guidelines on clinical presentation and management of nondystrophic myotonias. *Muscle Nerve*, 62, 430- 444. <https://doi.org/10.1002/mus.26887>

Vindas-Smith, R., Fiore, M., Vásquez, M., Cuenca, P., Del Valle, G., Lagostena, L., ... Morales, F. (2016). Identification and functional characterization of CLCN1 mutations found in nondystrophic myotonia patients. *Hum Mutat*, 37(1), 74-83. <https://doi.org/10.1002/humu.22916>

Wong, L.J., Ashizawa, T., Monckton, D.G., Caskey, C.T. y Richards, C.S. (1995). Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet*, 56(1), 114-22.

9. Anexos

Tabla 1. Distribución de pacientes costarricenses con diagnóstico molecular de DM1 según la forma clínica

Forma clínica de la DM1	Número de casos	Hombres / Mujeres
Asintomática	25	14/11
Leve	20	14/6
Clásica	143	70/73
Pediátrica (Juvenil)	28	16/12
Congénita	22	13/9
Desconocida ^a	8	3/5
TOTAL	246	130/116

Nota. ^aPersonas para las cuales no se tiene el dato de edad de inicio de la enfermedad y, por lo tanto, no se pueden clasificar dentro de ninguna forma clínica.

Tabla 2. Variantes genéticas en los genes CLCN1 y SCN4A encontradas en personas con canalopatías miotónicas en Costa Rica

Familia	Probando	Variante genética	Exón	Gen	Estado de la mutación	Diagnóstico Clínico	Referencia
1	Paciente 1	c.1235A>C, p.Q412P (nueva)	11	CLCN1	Homocigot a	Becker	Morales et al., 2008
2	Paciente 2	c.1235A>C, p.Q412P (nueva)	11	CLCN1	Heterocigot a	Thomsen	Vindas-Smith et al., 2016
3	Paciente 3	c.501C>G, p.F167L	4	CLCN1	Heterocigot a	Thomsen	Vindas-Smith et al., 2016
4	Paciente 4	c.313C>T, p.R105C, c.501C>G, p.F167L	3 4	CLCN1	Heterocigot a compuesto	Thomsen	Vindas-Smith et al., 2016
5	Paciente 5	c.461A>G, p.Q154R (nueva)	4	CLCN1	Heterocigot a	Incierto	Vindas-Smith et al., 2016
6	Paciente 6	c.966G>A, p.W322* (nueva)	8	CLCN1	Heterocigot a	Becker	Brenes et al., 2021
7	Paciente 7	c.1063G>A, p.G355R	9		compuesto		
	Paciente 8	c.966G>A, p.W322* (nueva)	8	CLCN1	Homocigot a	Thomsen	Morales et al., 2003
	Paciente 9	c.4388G>A, p.R1463H	22	SCN4A	Heterocigot a	Thomsen	Brenes et al., 2021
		c.3938C>T, p.T1313M		SCN4A	Heterocigot a	Paramiotonía congénita	Brenes et al., 2021
				SCN4A	Heterocigot a		Brenes et al., 2021

Población y Salud en Mesoamérica

¿Quiere publicar en la revista?
Ingresa [aquí](#)

O escribanos:
[revista@ccp.ucr.ac.c](mailto:revista@ccp.ucr.ac.cr)



Población y Salud en Mesoamérica (PSM) es la revista electrónica que cambió el paradigma en el área de las publicaciones científicas electrónicas de la UCR. Logros tales como haber sido la primera en obtener sello editorial como revista electrónica la posicionan como una de las más visionarias.

Revista PSM es la letra delta mayúscula, el cambio y el futuro.

Indexada en los catálogos más prestigiosos. Para conocer la lista completa de índices, ingrese [aquí](#).



DOAJ

latindex



e-revist@s



Revista Población y Salud en Mesoamérica -

Centro Centroamericano de Población
Universidad de Costa Rica

