

Patogénesis de la distrofia miotónica tipo 1

Jonathan J. Magaña,^a Norberto Leyva-García^a y Bulmaro Cisneros^{b*}^aDepartamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, México D.F., México^bDepartamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 7 de mayo de 2009

Aceptado: 12 de junio de 2009

RESUMEN

La distrofia miotónica tipo 1 (DMI) es la forma más común de distrofia muscular en el adulto, presenta una incidencia mundial de 1/8000. La DMI tiene un patrón de herencia autosómico dominante, caracterizado por un cuadro clínico multisistémico que afecta principalmente el músculo esquelético, el corazón y los sistemas nervioso y endocrino. La mutación causante de la DMI se localiza en la región 3' no traducida del gen DMPK y consiste en un incremento del número de repetidos del triplete CTG; los individuos normales presentan de cinco a 37 repeticiones de este trinucleótido, mientras que los enfermos poseen más de 50 y hasta 4000 unidades repetidas del triplete CTG. La presente revisión ofrece una descripción detallada de los hallazgos científicos que han llevado a definir las bases moleculares de la DMI en el músculo y cerebro. Actualmente se sabe que el transcrito mutante del gen DMPK se acumula en el núcleo de las células musculares y nerviosas en donde se une de manera aberrante con diversas proteínas nucleares, como los reguladores del procesamiento alternativo de transcritos y factores de transcripción, formando agregados nucleares visibles mediante técnicas de inmunofluorescencia. Este evento afecta de manera indirecta la expresión de genes implicados con la diferenciación muscular y nerviosa, lo que podría explicar la sintomatología tan diversa de la enfermedad. En la parte final de la revisión se detallan los principales hallazgos científicos encaminados al desarrollo de una terapia génica para la DMI.

Palabras clave:

Distrofia miotónica, repetidos trinucleótidos, mecanismos moleculares, DMPK, ARNm

SUMMARY

Myotonic dystrophy type 1 (DMI) is the most common form of muscular dystrophy in adults, affecting 1/8000 individuals. DMI is a dominant disorder characterized by multisystemic clinical features affecting skeletal muscle, heart and the nervous and endocrine systems. DMI is caused by an expansion of CTG trinucleotide repeats within the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the DMPK gene. This repeat is polymorphic in normal individuals with alleles ranging from 5 to 37 in length. Repeats exceeding a threshold of approximately 50 and reaching up to a number of 4,000 result in disease. This review offers a detailed description of the scientific findings that have allowed the establishment of the molecular basis of the DMI in the muscle and nervous systems. Currently, it is known that mutant DMI transcript accumulates in the nucleus of muscle and neuronal cells sequestering nuclear proteins, such as splicing regulators and transcription factors to form nuclear foci that are observed under immunofluorescence techniques. This event disturbs the expression of several muscular and neuronal genes impairing cell differentiation, which may explain the multiple symptoms of the disease. Finally, the main findings towards the development of a gene therapy for DMI are discussed.

Key words:

Myotonic dystrophy, trinucleotide repeats, molecular mechanism, DMPK, mRNA

Introducción

El conocimiento de la secuencia completa del genoma humano ha revelado que los seres humanos compartimos 99.9 % de su secuencia, por lo que solo 0.1 % de la misma permite diferenciar un individuo de otro, confiriendo identidad dentro de la misma especie.¹ En la actualidad se estima que 3 % del genoma humano está constituido por elementos repetidos en tándem (*short tandem repeats* o STR),² también conocidos como ADN microsatélite. Los STR están conformados por repeticiones que pueden ir desde mononucleótidos

hasta hexanucleótidos, son altamente polimórficos y en ocasiones pueden comportarse de manera inestable presentando expansiones en el número de unidades repetidas durante los procesos de mitosis o meiosis. De manera interesante, el incremento anormal de repetidos se ha relacionado con el desarrollo de múltiples enfermedades genéticas.^{3,4} Hasta el momento se han registrado más de 30 desórdenes neurológicos y musculares atribuidos a expansiones de trinucleótidos (CTG)_n, (CGG)_n, (GAA)_n y (CAG)_n, entre los que se incluyen la distrofia miotónica tipo 1, el síndrome de X frágil, diversos tipos de ataxia espinocerebelar, ataxia tipo

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Bulmaro Cisneros-Vega. Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, 07360 México D.F., México. Tel.: (55) 5061 3339. Fax: (55) 5061 3931. Correo electrónico: bcisnero@cinvestav.mx

Friedreich y la corea de Huntington.⁵⁻⁷ Entre estas patologías, la distrofia miotónica tipo 1 (DM1), también conocida como enfermedad de Steinert, es un padecimiento neuromuscular degenerativo de gran importancia, ya que constituye la forma más común de distrofia muscular en los adultos.⁸

Distrofia miotónica tipo 1 (DM1)

La DM1 fue inicialmente descrita por el médico alemán Hans Steinert en 1909, siendo la primera entidad clínica que se definió por miotonía (prolongación involuntaria en el tiempo de relajación de un músculo que se ha contraído). La DM1 presenta un patrón de herencia autosómica dominante con expresión variable, su incidencia a nivel mundial es de 1/8000;⁸ sin embargo, esta cifra varía entre las diferentes poblaciones, por ejemplo, en algunas regiones de Norteamérica como Canadá se ha informado una incidencia de hasta 1/475.

El cuadro clínico de la DM1 es multisistémico, se caracteriza por miotonía, debilidad y atrofia progresiva del músculo esquelético, principalmente de los músculos distales de las extremidades (músculos flexores cortos de los pulgares y los flexores colaterales de los dedos), músculos faciales superficiales, músculos de la masticación y anteriores del cuello. Otros rasgos de la DM1 son la alopecia frontal, cataratas, problemas respiratorios, alteraciones del músculo cardíaco que inducen arritmias auriculares y bloqueo cardíaco, anomalías gastrointestinales, resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipogonadismo y atrofia testicular. Los pacientes presentan, además, alteraciones del sistema nervioso central y periférico, que incluyen hipersomnolencia, hipoventilación central, alteraciones de la personalidad y retraso mental.⁹⁻¹¹

Generalmente la DM1 se presenta entre la tercera o cuarta década de la vida, sin embargo, existe amplia variabilidad fenotípica de la enfermedad y diferentes edades de inicio, por lo que se ha clasificado en cuatro subtipos:

1. *Leve*: se presenta entre los 30 y 70 años de edad y se caracteriza por cataratas y ausencia de síntomas neuromusculares; los pacientes tienen una expectativa de vida normal.
2. *Clásica*: aparece entre los 12 y 60 años de edad y presenta un cuadro clínico multisistémico que incluye daño muscular, miotonía y alopecia, entre otros síntomas.

mas. Los pacientes tienen una expectativa de vida entre los 48 y 55 años de edad.

3. *Infantil*: se distingue por la aparición de síntomas antes de los 12 años de edad, los cuales incluyen daño muscular, retraso mental (deficiencia en el aprendizaje) y problemas respiratorios; la expectativa de vida se sitúa alrededor de los 45 años de edad.
4. *Congénita*: se caracteriza por la aparición de síntomas desde el útero o al nacimiento. Durante la etapa del embarazo, el feto presenta una serie de complicaciones como hiperhidramnios, movimientos reducidos, hipotonía generalizada, deformidades esqueléticas y problemas respiratorios. Este subtipo de la DM1 presenta alta tasa de mortalidad perinatal y los pacientes que sobreviven este periodo desarrollan los signos clásicos de la enfermedad antes de los 10 años de edad.^{9,10}

Genética de la DM1

En 1992 se identificó la mutación causante de la DM1, una expansión del número de repeticiones del triplete CTG que se localiza en la región 3' no traducida (3'-UTR) del gen DMPK, ubicado en el cromosoma 19q.13.3 (Figura 1).¹²⁻¹⁴ A este gen se le denominó DMPK (*dystrophy myotonic protein kinase*) ya que la proteína que codifica presenta características propias de la familia de las proteínas cinasas de serina/treonina.¹⁵⁻¹⁷

Los alelos del gen DMPK que portan de cinco a 37 repeticiones del trinucleótido CTG se encuentran en individuos sanos y se comportan de una manera estable a través de la herencia, ya que tienen una tasa de mutación relativamente baja. Por el contrario, los alelos con un número de repeticiones del triplete CTG mayor de 50 y hasta aproximadamente 4000 están presentes en los pacientes con DM1 y son inestables al heredarse.^{18,19} De manera interesante, la DM1 manifiesta el fenómeno de "anticipación", el cual consiste en que a medida que la enfermedad pasa de generación en generación la sintomatología aparece en edades más tempranas y con mayor gravedad, lo que correlaciona directamente con aumento en el número de repetidos CTG.^{20,21} Por lo tanto, la determinación del número de repetidos CTG en los pacientes o individuos asintomáticos es fundamental para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.¹⁰

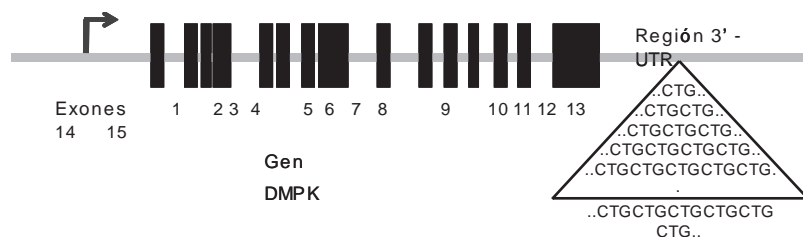


Figura 1. Estructura del gen DMPK, localizado en el cromosoma 19 humano. Los cuadros negros simbolizan los 15 exones que codifican para la proteína DMPK. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Un número mayor de 50 repetidos CTG en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen produce las manifestaciones clínicas de la DM1.

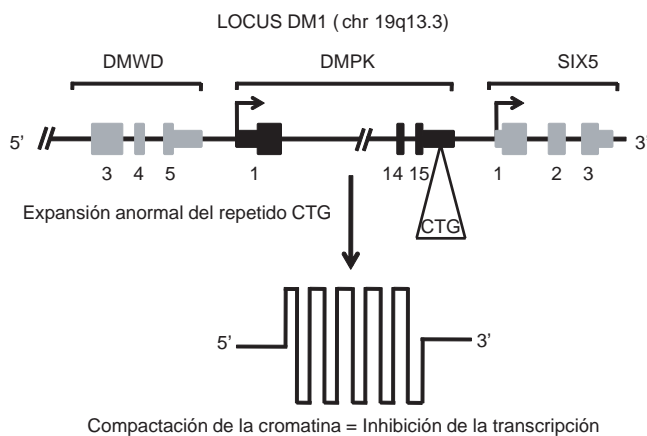


Figura 2. Haploinsuficiencia de los genes adyacentes al gen DMPK. Este modelo sugiere que la presencia de más de 50 repetidos CTG en el gen DMPK altera la formación de nucleosomas, lo que a su vez produce una compactación de la cromatina en el locus DMPK y afecta la transcripción de los genes contiguos DMWD y SIX5.

Bases moleculares de la DM1 en el tejido muscular

Por largo tiempo, la paradoja de que una mutación fuera de la región codificadora del gen DMPK causara la extensa variedad de síntomas de la DM1 se mantuvo sin resolver. Sin embargo, después de un extenso número de estudios en pacientes, ratones transgénicos y modelos celulares para la DM1, se han logrado proponer diversos modelos para explicar las bases moleculares de la DM1.

Haploinsuficiencia del gen DMPK

Debido a que los pacientes con DM1 son generalmente heterocigotos, por mucho tiempo se ha especulado que la DM1 es causada por un efecto de dosis (haploinsuficiencia), es decir, la expansión del triplete CTG dañaría la expresión del alelo mutante, ocasionando una reducción de 50 % en los niveles de la proteína DMPK. Aunque no se ha identificado la función precisa de la DMPK, se piensa que participa en la reorganización del citoesqueleto, modulando la interacción entre la miosina y la actina y de esta forma incide en la formación de las fibras de estrés y en el tráfico de proteínas desde el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática de las células musculares. Por lo tanto, una deficiencia en los niveles de la DMPK podría causar alteraciones en los procesos mencionados.^{15,22}

Los primeros estudios en células musculares de pacientes fueron consistentes con esta hipótesis, ya que la mutación se correlacionó con disminución en la expresión del gen DMPK, tanto a nivel de ARN como de proteína.^{23,24} Dereck y colaboradores propusieron que la haploinsuficiencia del gen DMPK es provocada por la vulnerabilidad del transcrito mutante hacia las nucleasas intracelulares, o a que el transcrito

mutante forma estructuras secundarias complejas que le impiden atravesar el poro nuclear para ser traducido en el citoplasma.²⁵ Sin embargo, los ratones *knockout* para el gen DMPK no presentan las características multisistémicas propias de la enfermedad, lo que sugiere que la haploinsuficiencia del gen DMPK es solo uno de los factores que contribuyen para que se genere la DM1.²⁶

Haploinsuficiencia de genes adyacentes al gen DMPK

Una hipótesis alternativa para explicar la patogénesis de la DM1 postula que la expansión de los repetidos CTG del gen DMPK afecta la expresión de genes contiguos. Respecto a ésta se ha demostrado que los repetidos CTG mutantes del gen DMPK afectan el ensamblaje de los nucleosomas, ocasionando una alteración local en la estructura de la cromatina, lo que podría perturbar la transcripción de los genes vecinos: SIX5 (gen del homeodominio asociado al locus DM) y DMWD (gen de la proteína DMR-N9) (Figura 2).^{26,27}

Los repetidos CTG del gen DMPK co-localizan con la región 5' del promotor del gen SIX5. Este gen presenta una fuerte homología con la familia de los genes murinos que regulan el desarrollo de los músculos distales, así como con el gen *sine oculis* de la mosca de la fruta, necesario para el apropiado desarrollo ocular. Con la finalidad de analizar si el gen SIX5 está relacionado con la DM1, se generó un ratón *knockout* para este gen, el cual presentó como síntoma principal cataratas,^{28,29} lo cual apoya la hipótesis de la haploinsuficiencia del gen SIX5 como componente de la patogénesis de la DM1. Por otra parte, la disminución en la expresión del gen DMWD, localizado corriente arriba del gen DMPK, podría explicar la atrofia testicular en los pacientes con DM1, ya que se expresa en el testículo y se le ha asignado un papel relevante en el desarrollo de la infertilidad masculina.^{30,31} No obstante, existen algunos informes contradictorios donde la expresión de los genes SIX5 y DMWD no difiere entre personas sanas y pacientes.²⁶

Acumulación del ARN mutante del gen DMPK en el núcleo

Existen evidencias experimentales tanto en pacientes con DM1 como en modelos celulares que demuestran que la expansión anormal de los repetidos CTG induce la formación de estructuras secundarias de tallo y burbuja en el ARNm mutante del gen DMPK (Figura 3),^{32,33} y que esta alteración estructural es la base para que se acumule en el núcleo y ejerza funciones anómalas.³⁴⁻³⁶

Mediante la técnica de hibridación *in situ* se ha evidenciado la acumulación nuclear del ARNm mutante en fibroblastos, mioblastos³⁷ y neuronas de diferentes tejidos cerebrales (corteza cerebral, hipocampo, giro dentado, tálamo, sustancia nigra y tallo cerebral)³⁸ de pacientes con DM1. Estos hallazgos se han corroborado en el tejido muscular de pacientes con DM1 mediante análisis de *Northern blot*.^{32,33} De manera interesante se ha demostrado que a medida que los transcritos mutantes portan un número más alto de repetidos CUG, su acumulación nuclear es también mayor,

lo que sugiere que la longitud de los repetidos CUG determina la formación de los agregados nucleares.³³

La acumulación del ARNm mutante en el núcleo de células musculares o nerviosas provoca su unión aberrante con proteínas que participan en la regulación de procesos nucleares, como moduladores del proceso alternativo de transcritos (*splicing*) y factores de transcripción, lo que modifica finalmente la expresión de ciertos genes, impidiendo que las proteínas para las cuales codifican lleven a cabo sus funciones.

- a) **Secuestro de factores de transcripción por el ARNm mutante de la DM1:** de manera interesante se ha identificado que los factores de transcripción Sp1 (proteína específica 1), STAT1 y STAT3 (miembros de la familia de proteínas de transducción de señales y de activación de la transcripción) y la subunidad gamma del receptor del ácido retinoico (RAR γ), son secuestrados por el ARNm mutante del gen DMPK en las células musculares de pacientes con DM1.³⁵ Se piensa que la disminución de la expresión del gen CIC-1 (canal de cloro 1) presente en el músculo esquelético de pacientes con DM1 está relacionada con el secuestro de Sp1, ya que este factor de transcripción modula positivamente su expresión.³⁵
- b) **Efecto de los tripletes CTG mutantes sobre el procesamiento alternativo de transcrito.** El ARNm mutante de la DM1 se asocia con proteínas que participan en el procesamiento alternativo de RNA (*splicing*), como la proteína de unión a regiones con repetidos CUG (CUG-BP1), la proteína de unión a regiones con repetidos CUG-2 (ETR-3), las proteínas similares a *muscleblind* (MBNL1, MBLN2 y MBLN3), las proteínas de unión a ARN con actividad cinasa PKR y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPH).³⁸⁻⁴⁰ La función de estos

reguladores de *splicing* determina la expresión tejido-específica o en alguna etapa particular del desarrollo de ciertas isoformas de proteínas.⁴¹ De este grupo de reguladoras de *splicing*, las más estudiadas son las proteínas CUG-BP1 y MBNL. De manera general se ha observado que el ARN mutante de la DM1 provoca que la actividad de MBLN se disminuya y de manera contraria que la actividad de la CUG-BP1 disminuya y se originen formas de *splicing* fetales (Figura 3).

Durante el desarrollo de la DM1 se presentan alteraciones en al menos 14 eventos de procesamiento alternativo de ARN,³⁶ de los cuales siete ocurren tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético, afectando los genes TNNT2 (gen de la troponina T cardíaca), IR (gen del receptor de insulina), MTMR1 (gen de la proteína 1 relacionada con la miotubularina), TNNT3 (gen de la troponina T de músculo esquelético), RyR (gen del receptor de rianodina), SERCA2 (gen de la ATPasa 2 Ca²⁺ del retículo endoplásmico/sarcoplasmático) y gen CIC-1.⁴²⁻⁴⁸ Por otra parte, en el cerebro de individuos con DM1 se han identificado alteraciones en el procesamiento de transcritos de los genes de la proteína tau, del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR1) y del precursor de la proteína amiloide (APP).^{38,49-53}

Mediante estudios en pacientes, modelos celulares y ratones transgénicos, se ha logrado correlacionar las alteraciones en la maduración de estos transcritos con la sintomatología de la DM1.

En los pacientes con DM1 se ha observado un ARNm del gen IR que carece del exón 11, lo que origina la síntesis de una isoforma del receptor insensible a la insulina.^{43,52} Este hecho explicaría la diabetes en los pacientes con DM1. Asimismo, se ha reportado que los pacientes miotónicos expresan transcritos inmaduros de los genes RyR y SERCA2

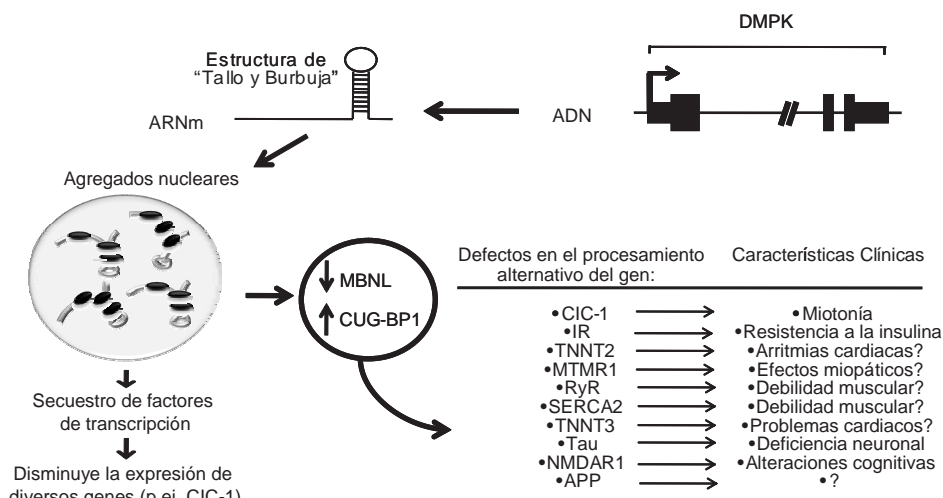


Figura 3. Modelo de la patogénesis por la acumulación nuclear del ARNm mutante. El transcrito del gen DMPK que porta un número anormal de repetidos CUG forma una estructura terciaria de "tallo y burbuja", la cual tiene la capacidad de secuestrar factores de transcripción y reguladores de *splicing* (MBNL y CUG-BP1), formando agregados nucleares. Este fenómeno origina cambios en la expresión y procesamiento alternativo de diversos genes, ocasionando el desarrollo de la DM1.

en el músculo esquelético. Se conoce que las proteínas codificadas por estos genes regulan la homeostasis del calcio durante la despolarización del sarcolema del músculo esquelético; para el inicio de la contracción muscular es necesario que el ión calcio se libere desde el retículo sarcoplasmático a través de los canales formados por la proteína RyR, mientras que la proteína SERCA2 bombea el ión de regreso al retículo sarcoplasmático para disminuir los niveles de calcio citoplasmático y generar la relajación del músculo. Por lo tanto, alteraciones en este proceso podrían estar relacionadas con la debilidad muscular de los enfermos.⁴⁶

Respecto a las investigaciones en ratones transgénicos, se reportó que un ratón que sobreexpresa la CUG-BP1 presenta alteraciones en el procesamiento alternativo del ARNm del gen TNNT2.⁴⁵ La troponina T, producto de este gen, forma parte de un complejo proteico cuya función es regular las interacciones actina-miosina durante la contracción. Tanto el ratón transgénico como los pacientes con DM1 producen un transcrito del gen TNNT2 con la inclusión del exón 5, el cual se encuentra solamente en el tejido fetal. Esta isoforma de la troponina cardíaca es menos sensible al calcio, lo que provoca menor contracción del músculo cardíaco. Con base en estos resultados se ha propuesto que el procesamiento aberrante del gen de la troponina T es la causa del desarrollo de arritmias y la pérdida de la función del miocardio en los pacientes con DM1.^{42,51} La caracterización de un segundo ratón transgénico para la sobreexpresión de la proteína CUG-BP1 demostró ARNm del gen CIC-1 con la inclusión del exón 7 en el tejido muscular. Esta alteración propicia que el transcrito tenga mayor degradación, lo que se refleja en una caída de hasta 10 % en los niveles de la proteína, componente del canal de cloro.^{47,48} La consecuencia funcional de esta alteración transcripcional es la disminución de la conductancia transmembranal de los iones cloro en las fibras musculares, lo cual se ha correlacionado con el desarrollo del signo clínico más característico de la DM1, la miotonía. Por otra parte, ratones homocigotos noqueados para el gen de las proteínas MBLN (Mbn11^{Δ3/Δ3}) desarrollan miotonía, cataratas y alteraciones en el procesamiento alternativo de los genes TNNT2, TNNT3 y CIC-1.⁵⁴⁻⁵⁶

Finalmente, el desarrollo de modelos celulares para la DM1 ha permitido la identificación de los mecanismos moleculares que permiten el desarrollo de esta patología. Mediante el uso de las células musculares de ratón C2C12 se demostró que el secuestro de CUG-BP1 por el transcrito mutante de la DM1 afecta la traducción de las proteínas reguladoras de la miogénesis MEF2A (factor potenciador 2A miocito-específico), MyoD (miogenina D) y p21 (inhibidor de Cdk1A), lo que causa inhibición del programa de diferenciación muscular.⁴⁵

La DM1 en el sistema nervioso

Aun cuando el cerebro es el segundo órgano afectado por la DM1, las bases moleculares de la enfermedad en el sistema nervioso no se han elucidado.

Una de las características distintivas del daño cerebral en los pacientes con DM1 es la presencia de agregados de la proteína tau hiperfosforilada en la neurocorteza.^{38,57} La proteína tau se expresa abundantemente en el sistema nervioso central y periférico, está enriquecida en los axones de neuronas en crecimiento y maduras, donde se asocia con los microtúbulos para conferirles estabilidad. La fosforilación anormal de tau afecta negativamente esta función y se ha relacionado en forma directa con la enfermedad de Alzheimer.⁵⁸ En el cerebro humano se expresan seis isoformas de tau por procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10. Los pacientes con DM1 expresan isoformas de tau con la exclusión preferencial de los exones 2/3 y 10.^{38,59} El exón 2 codifica para el dominio N-terminal de tau, el cual interactúa con la membrana axonal, mientras que el exón 10 codifica para un dominio de unión a microtúbulos. Por lo tanto, es probable que la ausencia de estos dominios en la proteína tau afecte su función como molécula estabilizadora de los microtúbulos y finalmente se dañe la actividad de las neuronas.⁶⁰

Como se mencionó, se han observado alteraciones en la maduración de los transcritos del gen NMDAR1 en el cerebro de pacientes con DM1,³⁸ específicamente en las neuronas corticales y subcorticales, lo que podría estar relacionado con la sintomatología neuronal de esta enfermedad. El receptor NMDAR1 regula la transmisión sináptica excitadora en el hipocampo, participando en la potenciación a largo plazo y el aprendizaje.⁶¹ El gen NMDAR1 produce ocho isoformas de procesamiento alternativo, sin embargo, los pacientes con DM1 presentan prioritariamente una isoforma que incluye el exón 5, lo cual cambia las características farmacológicas y la distribución celular del receptor. Por lo tanto, la presencia de esta isoforma podría estar relacionada con el daño en la memoria de los pacientes.^{38,62,63}

El desarrollo de modelos musculares para la DM1 basados en líneas celulares ha permitido evaluar los eventos moleculares que desencadenan la enfermedad en el tejido muscular. Por lo tanto, siguiendo esta vertiente exitosa nuestro grupo de trabajo estableció un modelo neuronal para DM1 basado en la línea celular PC12.⁶⁴ Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para estudios de diferenciación neuronal, ya que bajo el estímulo del factor de crecimiento neuronal (NGF) las células desarrollan neuritas, se excitan eléctricamente y secretan neurotransmisores.⁶⁴ Generamos líneas celulares que expresan la región 3'UTR del gen DMPK3 con cinco, 30 o 90 repetidos CUG.⁶⁴ De manera interesante, demostramos que la expresión del transcrito mutante que porta 90 repetidos CUG inhibe la diferenciación neuronal de las células PC12.⁵⁷ Concomitantemente, el transcrito mutante provoca la hiperfosforilación de tau, la disminución de la expresión de proteínas que se asocian a los microtúbulos (MAP2, MAP6 y MAP1b) y alteraciones en los canales de Ca²⁺.^{57,65} Tomando en consideración que el ensamble de microtúbulos es un paso necesario para la extensión de las neuritas,⁶⁶⁻⁶⁸ nuestros resultados sugieren que el transcrito mutante afecta la diferenciación neuronal de las células PC12 mediante el efecto negativo que ejerce sobre las proteínas MAP.

Perspectivas en el estudio de la DM1

El cuadro clínico multisistémico de la DM1 ha complicado de sobremanera el diseño y aplicación de terapias para esta enfermedad. Las evidencias experimentales obtenidas a la fecha indican que la DM1 es el resultado de la función aberrante que adquiere el ARNm mutante del gen DMPK, secuestrando factores de transcripción y moduladores de *splicing*, lo que finalmente daña el programa genético de la diferenciación muscular y nerviosa.

Debido a que la DM1 afecta una gran cantidad de genes, es difícil elegir un blanco para el desarrollo de una terapia génica. La aproximación más obvia basada en la eliminación del transcrito mutante se ha abordado experimentalmente con cierto éxito. Mediante el uso de una ribozima que corta sitios accesibles en la región 3'-UTR del gen DMPK para la posterior degradación del ARNm, se logró reducir el número de agregados nucleares y se restableció el patrón normal de *splicing* del gen del receptor de la insulina en mioblastos de pacientes;⁶⁹ sin embargo, el tratamiento elimina también de manera irremediable el transcrito proveniente del alelo normal, lo que afecta la síntesis de la proteína DMPK, necesaria para el funcionamiento muscular.⁷⁰ Tomando este punto en consideración, se han desarrollado estrategias alternativas para reducir el número de repetidos CTG del gen de la DMPK sin dañar la región codificadora. Mediante el uso de agentes quimioterapéuticos como la mitomicina C y el etil-metano-sulfonato se logró inducir eliminaciones de los repetidos CTG en linfoblastos derivados de pacientes.⁷¹ Asimismo, por medio de moléculas artificiales que inducen *trans-splicing* se corrigió el número anormal de repetidos CUG del transcrito mutante en células de miosarcoma.⁷²

Dado que uno de los eventos primarios para el desarrollo de la patología es la acumulación del transcrito mutante en el núcleo, es probable que la liberación del transcrito se transporte hacia el citoplasma y evite la progresión de la enfermedad. En apoyo a esta hipótesis, la eliminación de la expresión de la proteína HnRNP, una de las proteínas con las que se asocia el transcrito mutante, suprimió su retención nuclear.⁷³

El establecimiento de una terapia génica para la DM1 se ve todavía lejano, consideramos que es necesario obtener un inventario de los genes afectados por la DM1 para lograr identificar vías metabólicas y cascadas de señalización involucradas con la patología. De esta manera se podría desarrollar ARN interferentes o ribozimas dirigidas a blancos específicos que no alteren la fisiología normal del organismo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el ICyTDF, proyecto PIFUTP08-164.

Referencias

- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-1351.
- Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 2000;24:400-402.
- Fan H, Chu JY. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. *Geno Prot Bioinfo* 2007;5:7-14.
- Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 2007;16:115-123.
- Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 2005;6:743-755.
- Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:575-621.
- Magaña JJ, Vergara MD, Sierra-Martínez M, García-Jiménez E, Rodríguez-Antonio F, Gómez MR, et al. Molecular analysis of the CAG repeat among patients with Type-2 spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Gac Med Mex* 2008;144:413-418.
- Harper PS, van Engelen BG, Eymard B, Rogers M, Wilcox D. 99th ENMC International Workshop: myotonic dystrophy: present management, future therapy. 9-11 November 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2002;12:596-599.
- D'Angelo MG, Bresolin N. Cognitive impairment in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 2006;34:16-33.
- Bird TD. Myotonic dystrophy type I. Gene clinics: clinical genetic information resource [data base on line]. University of Washington, Seattle. Disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=myotonic-d
- Day JW, Ricker K, Jacobsen JF, Rasmussen LJ, Dick KA, Kress W, et al. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 2003;60:657-664.
- Cho DH, Tapscott SJ. Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochimica Biophysica Acta* 2007;1772:195-204.
- Tian B, White RJ, Xia T, Welle S, Turner DH, Mathews MB, et al. Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* 2000;6:79-87.
- Harper PS, Monckton, D.G. Myotonic dystrophy. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. 3rd edition. New York: McGraw Hill Professional; 2004, pp. 1039-1076.
- Kaliman P, Llagostera E. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal* 2008;20:1935-1941.
- Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992;255:1256-1258.
- Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shuttler G, Amemiya C, Jansen G, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 1992;255:1253-1255.
- Barcelo JM, Mahadevan MS, Tsilfidis C, MacKenzie AE, Korneluk RG. Intergenerational stability of the myotonic dystrophy protomutation. *Hum Mol Genet* 1993;2:705-709.
- Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2005;15:15-16.
- Kurihara T. New classification and treatment for myotonic disorders. *Intern Med* 2005;44:1027-1032.
- Sarkar PS, Chang HC, Boudi FB, Reddy S. CTG repeats show bimodal amplification in *E. coli*. *Cell* 1998;95:531-540.
- Carrasco M, Canicio J, Palacín M, Zorzano A, Kaliman P. Identification of intracellular signaling pathways that induce myotonic dystrophy protein kinase expression during myogenesis. *Endocrinology* 2002;143:3017-3025.
- Schara U, Schoer BG. Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:71-79.
- Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, et al. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 1993;36:59-61.
- Machuca-Tzili L, Brook D, Hilton-Jones D. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: A review. *Muscle Nerve* 2005;32:1-18.
- Ranum LP, Day JW. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet* 2004;74:793-804.
- Wang YH, Amirhaeri S, Kang S, Wells RD, Griffith JD. Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 1994;265:669-671.
- Kiesert TR, Cho DH, Clark JI, Maylie J, Adelman J, Snider L, et al. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2000;25:105-109.
- Sarkar PS, Appukuttan B, Han J, Ito Y, Ai C, Tsai W, et al. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 2000;25:110-114.
- Alwazzan M, Newman E, Hamshere MG, Brook JD. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 1999;8:1491-1497.
- Junghans RP, Ebralidze A, Tiwari B. Does (CUG)_n repeat in DMPK mRNA paint chromosome 19 to suppress distant genes to create the diverse phenotype of myotonic dystrophy?: a new hypothesis of long-range cis autosomal inactivation. *Neurogenetics* 2001;3:59-67.
- Taneja KL, McCurrach M, Schalling M, Housman D, Singer RH. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 1995;128:995-1002.
- Davis BM, McCurrach M, Taneja KL, Singer RH, Housman DE. Expansion of 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.
34. **Amack JD, Paguio AP, Mahadevan MS.** Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum Mol Genet* 1999;8:1975-1984.
 35. **Ebralidze A, Wang Y, Petkova V, Ebralidze K, Junghans RP.** RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 2004;303:383-387.
 36. **Ranum LP, Cooper TA.** RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:259-277.
 37. **De León MB, Cisneros B.** Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: From the clinic to molecular mechanisms. *J Neurosci Res* 2008;86:18-26.
 38. **Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA.** Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 2004;13:3079-3088.
 39. **Mankodi A, Urbinati CR, Yuan Q-P, Moxley RT, Sansone V, Krym M, et al.** Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 2001;10:2165-2170.
 40. **Fardaei M, Rogers MT, Thorpe HM, Larkin K, Hamshere MG, Harper PS, et al.** Three proteins, MBNL, MBL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 2002;11:805-814.
 41. **Kuyumcu-Martinez NM, Cooper TA.** Misregulation of alternative splicing causes pathogenesis in myotonic dystrophy. *Prog Mol Subcell Biol* 2006;44:133-159.
 42. **Philips AV, Timichenko LT, Cooper TA.** Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 1998;280:737-741.
 43. **Savkur RS, Philips AV, Cooper TA.** Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001;29:40-47.
 44. **Buj-Bello A, Furling D, Tronchere H, Laporte J, Lerouge T, Butler-Browne GS, et al.** Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet* 2002;11:2297-2307.
 45. **Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, Cooper TA.** Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 2005;14:1539-1547.
 46. **Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, et al.** Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2005;14:2189-2200.
 47. **Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, et al.** Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and Hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 2002;10:35-44.
 48. **Charlet BN, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA.** Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 2002;10:45-53.
 49. **Sergeant N, Sablonniere B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maura CA, Watez A, et al.** Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2001;10:2143-2155.
 50. **Leroy O, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Belarbi K, Delacourte A, Andreadis A, et al.** ETR-3 represses tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type 1. *J Neurosci Res* 2006;84:852-859.
 51. **Timichenko NA, Cai ZJ, Welm AL, Reddy S, Ashizawa T, Timichenko LT.** RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 2001;276:7820-7826.
 52. **Savkur RS, Philips AV, Cooper TA, Dalton JC, Moseley ML, Ranum LP, et al.** Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy 2. *Am J Hum Genet* 2004;74:1309-1313.
 53. **Copley LM, Zhao WD, Kopacz K, Herman GE, Kioschis P, Poustka A, et al.** Exclusion of mutations in the MTMR1 gene as a frequent cause of X-linked myotubular myopathy. *Am J Med Genet* 2002;107:256-258.
 54. **Artero R, Prokop A, Paricio N, Begemann G, Pueyo I, Mlodzik M, et al.** The muscleblind gene participate in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* 1998;195:131-143.
 55. **Begemann G, Paricio N, Artero R, Kiss I, Pérez-Alonso M, Mlodzik M.** Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 1997;124:4321-4331.
 56. **Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, et al.** A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 2003;302:1978-1980.
 57. **Hernández-Hernández O, Bermúdez-de-León M, Gómez P, Velázquez-Bernardino P, García-Sierra F, Cisneros B.** Myotonic dystrophy expanded CUG repeats disturb the expression and phosphorylation of tau in PC12 cells. *J Neurosci Res* 2006;84:841-851.
 58. **Buée L, Bussiére T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR.** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:95-130.
 59. **Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA.** Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO* 1989;8:393-399.
 60. **Wang Y, Wang J, Gao L, Lafyatis R, Stamm S, Andreadis A.** Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1. *J Biol Chem* 2005;280:14230-14239.
 61. **Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S.** The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996;87:1327-1338.
 62. **Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN.** Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004;re16.
 63. **Winblad S, Lindberg C, Hansen S.** Cognitive deficits and CTG repeat expansion size in classical myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Behav Brain Funct* 2006;2:16.
 64. **Quintero-Mora ML, Depardon F, Waring J, Korneluk RG, Cisneros B.** Expanded CTG repeats inhibit neuronal differentiation of the PC12 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:289-294.
 65. **Andrade A, de-León MB, Hernández-Hernández O, Cisneros B, Félix R.** Myotonic dystrophy CTG repeat expansion alters Ca^{2+} channel functional expression in PC12 cells. *FEBS Lett* 2007;581:4430-4438.
 66. **Drubin DG, Feinstein SC, Shooter EM, Kirschner MW.** Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 1985;101:1799-1807.
 67. **Black MM, Aletta JM, Greene LA.** Regulation of microtubule composition and stability during nerve growth factor-promoted neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1986;103:545-557.
 68. **Brugg B, Matus A.** PC12 cells express juvenile microtubule-associated proteins during nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1988;107:643-650.
 69. **Langlois MA, Lee NS, Rossi JJ, Puymirat J.** Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* 2003;7:670-680.
 70. **Harmon EH, Larsen TD, Paulson AF, Perryman MB.** Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Dev Dyn* 2008;237:2353-2366.
 71. **Hashem VI, Pytlos MJ, Klysiak EA, Tsuji K, Khajavi M, Ashizawa T, et al.** Chemotherapeutic deletion of CTG repeats in lymphoblast cells from DM1 patients. *Nucleic Acids Res* 2004;32:6334-6346.
 72. **Chen HY, Kathirvel P, Yee WC, Lai PS.** Correction of dystrophin myotonic type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* 2009;16:211-217.
 73. **Kim DH, Langlois MA, Lee KB, Riggs AD, Puymirat J, Rossi JJ.** HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acid Res* 2005;33:3866-3874.