



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



Trabajo Final de Graduación

Práctica Dirigida para optar por la Licenciatura en Genética Humana

TÍTULO:

Identificación de variantes genéticas en los genes *CLCN1* y *SCN4A* en personas con miononías hereditarias no distróficas

Jeffry Roig Fernández (A24355)

PROFESOR TUTOR: Dr. Fernando Morales Montero

LECTORA: Dra. Gabriela Chavarría Soley

LECTORA: M.Sc. Melissa Vásquez Cerdas

2017

DEDICATORIA

A mi esposa y familia que con tanta
paciencia me apoyaron y me ayudaron en este proceso

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la constancia y la paciencia para llegar al término de esta práctica.

A mi comité asesor conformado por el Dr. Fernando Morales, la M.Sc. Melissa Vásquez y la Dra. Gabriela Chavarría, que con su consejo me ayudaron a mejorar como profesional, me dieron su confianza y motivación para poder crecer como investigador.

A Don William Araya y Dayana Vargas porque estuvieron allí con su apoyo y guía durante las horas de laboratorio.

A la Dra. Patricia Cuenca, Andrey Sequeira, Rebeca Vindas y Melissa Abarca por toda la ayuda brindada

A todo el personal del INISA por su apoyo.

A mi esposa y familia por tenerme paciencia en este proceso y por motivarme.

**APROBACIÓN DE PROPUESTA DE ANTEPROYECTO
DEL COMITÉ ASESOR**

Dr. Fernando Morales Montero

Tutor

Dra. Gabriela Chavarría Soley

Lectora

MSc. Melissa Vásquez Cerdas

Lectora

Contenido

Índice de figuras	6
Índice de cuadros	6
ANTECEDENTES.....	7
1.1. Canales iónicos.....	7
1.2 Miotonías hereditarias	8
1.3 Características clínicas de las miotonías no distróficas.....	9
1.3.1 Características clínicas propias de la canalopatía de cloruro	10
1.3.2 Características clínicas propias de las canalopatías de sodio	12
1.3.1 Características genéticas de la canalopatía de cloruro	13
1.3.2 Características genéticas de la canalopatía de sodio.	16
1.4 Justificación.....	17
1.5 Objetivos	18
1.5.1 Objetivo General:	18
1.5.2 Objetivos Específicos:	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1 Población en estudio.....	20
2.2 Extracción del ADN	20
2.3 Análisis molecular de las muestras	20
RESULTADOS y DISCUSIÓN	28
LIMITACIONES DE LA PRÁCTICA	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS.....	45
ANEXO	54

Índice de figuras

Fig.	Descripción	Pág.
1	Modelo del canal CIC-1	14
2	Representación de la ubicación de mutaciones encontradas en Nav1.4	16
3	Electroferogramas correspondientes a la secuenciación de los exones ocho y nueve del gen <i>CLCN1</i> para la muestra CR1	28
4	Resultados de la digestión con la enzima <i>AvaI</i> para el estudio de la mutación p.G355R.	29
5	Resultado de la digestión con la enzima <i>AvaII</i> para el estudio de la mutación p.W322X, tamizaje de 100 muestras.	30
6	Electroferogramas correspondientes a la secuenciación del exón ocho del gen <i>CLCN1</i> para la muestra CR2	31
7	Resultados de la digestión con la enzima <i>AvaII</i> para el estudio de la mutación p.G355R.	31
8	Árbol genealógico de los probandos CR2 y CR3	32
9	Electroferogramas correspondientes a la secuenciación de los exones doce y veinticuatro del gen <i>SCN4A</i> , para la muestra CR3	34
10	Resultados de la digestión con la enzima <i>XmnI</i> para la muestra CR3.	35
11	Resultados de la digestión con la enzima <i>SacII</i> para la muestra CR3	35
12	Resultados de la digestión con la enzima <i>XmnI</i> para 100 muestras control	36
13	Electroferogramas correspondientes a la secuenciación del exón 22 del gen <i>SCN4A</i>	37
14	Resultados de la digestión con la enzima <i>BccI</i> para la muestra CR4	38
15	Resultados de alineamiento de secuencias en los programas T-Coffee y Clustal W Omega	39
16	Representación esquemática de la intensidad de sondas relativa obtenida por el análisis de MLPA para el gen <i>SCN4A</i>	41
17	Representación esquemática de la intensidad de sondas relativa obtenida por el análisis de MLPA para el gen <i>CLCN1</i>	42

Índice de cuadros

Cuadro	Descripción	Página
1	Iniciadores empleados para amplificar la región codificante del gen <i>SCN4A</i> junto con sus condiciones	21
2	Iniciadores empleados para amplificar el gen de <i>CLCN1</i> , junto con sus condiciones	23
3	Mutaciones encontradas junto con los iniciadores diseñados para aplicar la técnica.	26

ANTECEDENTES

1.1. Canales iónicos

Los seres vivos están constituidos por células, algunas de las cuales son excitables y otras no. Las células excitables utilizan impulsos eléctricos para comunicarse y transmitir señales, esto gracias al desequilibrio iónico que existe entre el exterior y el interior de la membrana celular (gracias a una permeabilidad iónica de la membrana), estableciéndose así lo que se conoce como el potencial de membrana de cada célula.

Los iones pueden ingresar o salir de la célula gracias a diferentes mecanismos de transporte, como los pasivos a través de poros hidrofílicos (por ejemplo), también llamados canales iónicos (Tamargo, 2004). Existen diversos tipos de canales clasificados según su permeabilidad y selectividad, como: 1- canales iónicos dependientes de voltaje (canales de calcio, potasio, cloro y sodio); 2- canales relacionados con ligandos extracelulares (canal de sodio ligando al receptor nicotínico); 3- canales asociados a segundos mensajeros (canal de calcio ligando al inositol-trifosfato) (Armijo *et al.* 2000). Una de las señales que usan algunas células para su comunicación es el potencial de acción, el cual requiere proteínas especializadas y canales iónicos para su ejecución (Calderón 2012).

Un potencial de acción se da cuando la célula excitable cambia su permeabilidad iónica por medio de un estímulo. En el tejido nervioso y muscular durante el potencial de acción se activan los canales de Na⁺ dependientes del voltaje, el Na⁺ ingresa a la célula, provocando un exceso de cargas positivas en el interior de la célula, elevando el potencial de -70mV a +30mV y con esto se genera un potencial de acción (Brodal 2010, Zao *et al.* 2012). Al llegar a ese punto otros canales, como el de K⁺ y cloruro, se empiezan a abrir propagándose el potencial de acción por toda la célula (Macarulla & Goñi 1994, Moyes y Schultes 2007). Los iones ingresarán a la célula hasta que las concentraciones interna y externa sean equivalentes (potencial de equilibrio) (Struyk & Cannon 2005).

Una vez alcanzado el potencial de equilibrio los canales de sodio se inactivan y permanecen en este estado por un periodo de tiempo conocido como el periodo refractario, en el cual no podrá generarse un nuevo potencial debido a la imposibilidad de que ocurra un flujo de iones (Jurkat-Rott *et al.* 2010). Finalizado el periodo refractario (comprende la repolarización y una breve hiperpolarización), la membrana retorna al potencial de membrana en reposo de -70mV y puede generar un nuevo potencial de acción (Struyk &

Cannon 2005; Jurkat-Rott *et al.* 2010). Mientras el potencial de membrana está en reposo en el músculo esquelético, hay muchos canales de cloruro abiertos que sirven de buffer eléctrico contra pequeñas corrientes despolarizantes, así como de regulador de la excitabilidad eléctrica (Push *et al.* 1995, Dutzler *et al.* 2003). Eventualmente, el potencial de acción viaja hasta regiones especializadas del músculo esquelético ocasionando la liberación de calcio del retículo endoplasmático, lo que llevará al acoplamiento de la contracción-relajación del músculo esquelético (Cannon, 2010).

Así, estos canales son de suma importancia para un buen funcionamiento del tejido en donde funcionan, por lo que defectos en estos canales podrían ocasionar diferentes tipos de patologías (Martínez, 2004). Mutaciones en los genes que codifican para algún canal iónicos pueden afectar la estructura y función de los canales, llevando a un funcionamiento anormal y con ello la disminución en la conducción (Herranz, 2002; Ruggieri & Arberas, 2002); también los canales pueden tener un funcionamiento anormal debido a factores externos (toxinas, anticuerpos). Estos defectos han sido descritos por estar asociados con diversas patologías, algunas esporádicas y otras hereditarias (Martínez, 2004; Cannon, 2006). Al conjunto de patologías asociadas a defectos en canales iónicos se les ha denominado como canalopatías (Martínez, 2004). Las canalopatías pueden afectar el funcionamiento del cerebro provocando epilepsias (defectos en los canales de Na^+ , K^+ o Ca^{2+} , por mutaciones en los genes *SCN1A*, *SCN1B*, *KCNQ2*, *CACNA1H*); ataxias (defectos en los canales de K^+ y Ca^{2+} , concretamente en los genes *KCNA*, *KCNC3* y *CACNA1A*); y también pueden afectar el tejido muscular provocando miotonías hereditarias (mutaciones en el gen *CLCN1* y *SCN4A*) (Kullmann 2010).

1.2 Miotonías hereditarias

Las miotonías hereditarias son un grupo heterogéneo de enfermedades del músculo esquelético caracterizadas por presentar una incapacidad transitoria de realizar movimientos antagónicos, lo que lleva a una rigidez discapacitante o respuesta tónica lenta. Esta incapacidad se puede deber a una alteración o aumento en el tiempo de relajación de un músculo contraído voluntariamente, o a un estímulo mecánico (revisado en Heatwole & Moxley 2007, Morales *et al.* 2003). Este signo clínico es denominado miotonía. Electrofisiológicamente, la miotonía resulta de una excitabilidad incrementada

(hiperexcitabilidad) de la membrana de la fibra muscular, de tal forma que un único estímulo eléctrico ocasiona una serie repetitiva de potenciales de acción, impidiendo a la célula lograr el equilibrio iónico (Matthews *et al.*, 2010).

Este grupo de enfermedades se ha dividido en dos grandes subgrupos según sus características clínicas: las miotonías distróficas y las miotonías no distróficas (Morales *et al.* 2008). El grupo de las miotonías distróficas abarca las distrofias miotónicas tipo 1 (DM1) y 2 (DM2), y están asociadas con la expansión de secuencias repetidas en tándem en regiones no codificantes en los genes *DMPK* (para la DM1) y *ZNF9* (para la DM2), respectivamente (Brook *et al.* 1992; Meola 2000, Liquori *et al.* 2001).

El grupo de las miotonías no distróficas comprende enfermedades causadas por mutaciones en canales iónicos del músculo esquelético, concretamente en los genes *CLCN1* y *SCN4A* (Dupre *et al.* 2009), por lo que, se les ha dado el nombre de canalopatías miotónicas. Existen canalopatías producidas por alteraciones en los canales de potasio y calcio, pero no se tomaron en cuenta en esta investigación debido a que afectan principalmente al sistema nervioso (Carrizosa 2006, Solís *et al.* 2008). Otras diferencias con las miotonías distróficas son la ausencia de debilidad progresiva y algunas características sistémicas (Matthews *et al.* 2010, Statland *et al.* 2011).

Algunos investigadores consideran a las canalopatías como trastornos benignos debido a la debilidad episódica y la falta de efectos en otros sistemas; incluso son catalogadas como enfermedades no progresivas (Heatwole & Moxley 2007), o sea, enfermedades que con el tiempo no se vuelven más severas. En contra de esta postura, existen investigadores que no las consideran benignas, pues en algunos casos se ha demostrado que la calidad de vida de los pacientes se deteriora debido a la enfermedad (Sansone *et al.* 2012).

1.3 Características clínicas de las miotonías no distróficas

Los pacientes con miotonías no distróficas o canalopatías miotónicas presentan, a nivel clínico, rigidez y debilidad muscular, la cual ocurre cuando una porción de las fibras musculares parecen eléctricamente no excitables (Burge & Hanna 2012). La miotonía es evaluada por medio de contracciones del músculo y percusión, además del uso del electromiograma (Lehmann-Horn *et al.* 2008). En la primera prueba mencionada el

paciente toma un objeto fuertemente y cuando se le pide que lo suelte es incapaz de hacerlo; en la segunda prueba, el músculo del paciente es estimulado mecánicamente, por ejemplo golpeándolo con un martillo de reflejo. Otros síntomas son: hipertrofia muscular, contracción anormal del músculo, dolor, debilidad y fatiga (revisado en Morales y Cuenca 2004; Matthews *et al.* 2010), aunque el dolor en algunos casos no se presenta (Herrera 2012).

La miotonía puede desencadenarse por diversos factores: frío, ejercicio, carga oral de potasio, uso de fármacos, comidas ricas en carbohidratos y estrés emocional (revisado en Morales y Cuenca 2004, Burge & Hanna 2012). Con respecto al ejercicio, es importante aclarar que en los momentos iniciales del mismo se desencadena la miotonía manifestada como rigidez, pero dura pocos segundos si se continúa con la actividad física, en otras palabras la exposición repetida al ejercicio se convierte en un atenuador de la rigidez (fenómeno conocido como calentamiento o *warm up*) (Meola *et al.* 2009).

1.3.1 Características clínicas propias de la canalopatía de cloruro

La canalopatía de cloruro o miotonía congénita (MC) es la canalopatía hereditaria más común y se debe a defectos en el canal de cloruro voltaje dependiente 1 o *CLCN1* (Koch *et al.* 1992). Está catalogada como una enfermedad no progresiva (Heatwole & Moxley 2007) que se empieza a presentar en la primera o segunda década de vida (Nagamitsu *et al.* 2000). La miotonía y la hipertrofia muscular es observada en el cuerpo, incluyendo los músculos fáciles y extraoculares (Kato *et al.* 2016) y se observa el fenómeno de *warm up*. A nivel electrofisiológico, en las electromiografías de los pacientes con esta enfermedad se puede visualizar una serie rítmica de potenciales que se incrementan o decrecen progresivamente en su amplitud y que son típicos de las miotonías hereditarias (Thomas *et al.* 2008).

La MC puede heredarse de dos formas: autosómica dominante (enfermedad de Thomsen) ó autosómica recesiva (miotonia generalizada tipo Becker) (Becker, 1977), siendo esta última la más común, con una prevalencia de 1 en 23 000 individuos (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott 1999); en cambio la forma dominante se presenta en 1 de cada 50 000 personas en la población caucásica (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott 1999, Matthews *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2000). Aunque la base de datos de la *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) fija

la prevalencia mundial en 1 por cada 100 000 individuos para ambas enfermedades (ver <http://www.omim.org/>).

La miotonía de Thomsen (OMIM # 160800) es un trastorno leve comparado con la miotonía tipo Becker. Esta condición muestra heterogeneidad clínica (Koty *et al.* 1996) y puede comenzar a manifestarse desde la infancia, pero los pacientes son conscientes de su presencia hasta la adolescencia (Ruggiere y Arberas 2002). La variabilidad clínica va desde casos donde el 90% de probandos muestran descargas en la electromiografía, pero sólo el 50% en la prueba de percusión (Cherian *et al.* 2008; Herrera 2012). Además, se observan algunos rasgos predominantes como las contracturas sin dolor y transitorias, hipertrofia generalizada, miotonía muscular con predilección de las extremidades superiores, manos y músculos faciales (Cherian *et al.* 2008, Herrera 2012, Mori *et al.* 2016).

Dentro de los síntomas poco comunes se encuentran retraso al parpadear, miotonía de la lengua, caída de los párpados (ptosis palpebral) (Mori *et al.* 2016). Los síntomas se hacen más notorios después del reposo, por lo que, los pacientes al iniciar la actividad se muestran rígidos, con movimientos torpes y lentos, pero conforme se continúa con el movimiento se va adquiriendo flexibilidad (fenómeno de calentamiento) (Vilchez, 2016). Algunos pacientes presentan debilidad muscular proximal junto con dificultades para subir escalones (Cherian *et al.* 2008).

La enfermedad de Becker (OMIM# 25570) también es clínicamente variable; la miotonía se puede presentar en todos los músculos esqueléticos (Heatwole & Moxley 2007) y los primeros síntomas aparecen a edades tempranas (3 y 12 años), afectando primeramente las piernas y luego se expresa en los brazos, por lo que, es común que los niños tiendan a caerse frecuentemente (Herrera 2012). Se ha asociado también a mutaciones en el gen *CLCN1*. La rigidez en muchos pacientes se manifiesta primero en las piernas, a los pocos años en los brazos, músculos faciales y cuello (Koch *et al.* 1993). Además, en algunos pacientes se ha observado torpeza al caminar y al tomar objetos (Deymeer *et al.* 1999, Lehmann-Horn *et al.* 2008). En el caso de los adultos, estos presentan una figura desproporcionada debido al poco desarrollo de los músculos del cuello, los hombros y las manos (Lehmann-Horn *et al.* 2008).

En términos generales, los pacientes pueden presentar una apariencia atlética sin aumentar la fuerza muscular, debido a contracciones musculares involuntarias pequeñas y continuas;

además pueden encontrarse pacientes con lordosis compensatoria (curvatura exagerada de la columna) por caminar de puntillas, esto debido al acortamiento muscular que limita el movimiento de la muñeca o del pie (Lehmann *et al* 2008). Adicionalmente, los pacientes pueden presentar hipertrofia muscular en las piernas o en los músculos de los glúteos (Lehmann-Hornn *et al.* 2008). La debilidad muscular en esta forma es transitoria y la amplitud de la miotonía es mayor en comparación con la forma dominante, por lo que es más severa (Thomas *et al.* 2008, Ruggiere y Arberas 2002).

En Costa Rica, por el momento, solo se ha reportado un caso de una familia que presenta la enfermedad de Thomsen (Morales *et al.* 2003) y otra con la enfermedad de Becker (Morales *et al.* 2008).

1.3.2 Características clínicas propias de las canalopatías de sodio

Las canalopatías de sodio son enfermedades de herencia dominante asociadas a mutaciones en el gen *SCN4A*, el cual codifica para la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.4 del músculo esquelético. Existe un espectro de enfermedades autosómicas dominantes ligadas a este canal, por lo que, la sintomatología dependerá de la enfermedad asociada. Se pueden mencionar variantes que van desde parálisis periódica con ausencia de miotonía (parálisis periódica hipocalemica tipo 2 o HOKPP2), con miotonía (parálisis periódica hipercalémica o HYPP), solo miotonía sin parálisis periódica (miotonía potasio agravado, PAM) y paramiotonía (paramiotonía congénica, PM ó PMC) (Struyk & Cannon 2005; Matthews *et al.* 2010).

La HYPP (OMIM #170500) está caracterizada por debilidad muscular, episodios de parálisis flácida asociada con una elevada cantidad de potasio en suero y rigidez muscular entre ataques (Morales y Cuenca, 2004). Esta enfermedad comienza a manifestarse en la infancia. Muchos de los síntomas pueden iniciar después de realizar ejercicio, consumir comidas ricas en potasio, ambientes fríos, estrés emocional, ayuno y durante el embarazo (Tawil, Griggs & Rose, 2000). Esta enfermedad presenta una prevalencia de 1/100 000 (Lehmann-Horn, Jurkat-Rott & Rüdell, 2002). Esta enfermedad se ha asociado con mutaciones en el canal Nav1.4 (Jurkat-Rott *et al.* 2010). Existe una variante a esta

enfermedad denominada de parálisis periódica normocalémica (normoKPP) que se ha asociado con bajos niveles de potasio en la sangre (Guo *et al.* 2004).

La PAM (OMIM # 608390) tiene estrechas semejanzas fenotípicas con la MC; ambas presentan miotonía con herencia dominante, además ausencia de debilidad después de ser expuestos al frío (Mitrovic & Lerche 2000). Se diferencian en que la primera presenta mayor incremento en la frecuencia y duración de la miotonía, esto debido al potasio sérico (Mitrovic & Lerche 2000). Los cambios de temperatura no alteran los síntomas clínicos y la miotónica varía día con día, y aumenta con el ejercicio prolongado. Su prevalencia se estima en 1/400 000 individuos (Struyk & Cannon 2005; Jurkat-Rott *et al.* 2010).

La PC o PMC (OMIM # 168300) se ha reportado que inicia en la infancia o niñez temprana. La sintomatología se diferencia de las demás miotonías pues la miotonía empeora debido a la repetición del movimiento o por un esfuerzo continuo, de ahí el término de paramiotonía. La miotonía se ve reflejada principalmente en los músculos de la cara, lengua y manos, en tanto que los miembros inferiores están ligeramente afectados (Morales y Cuenca, 2004). La miotonía puede durar segundos o minutos pero la debilidad se puede extender por largos periodos; además empeora por exposición al frío y el ejercicio, donde se pueden dar episodios de parálisis flácida. Su prevalencia es de 1/200 000 individuos (Struyk & Cannon 2005; Jurkat-Rott *et al.* 2010, Matthews *et al.* 2010).

1.3.1 Características genéticas de la canalopatía de cloruro

La MC está asociada con mutaciones en el gen *CLCN1* localizado en 7q35 (Koch *et al.* 1992). Este gen está organizado en 23 exones y codifican para el canal con el mismo nombre (CLC-1), el cual está constituido por 988 aminoácidos, formando 18 dominios alfa-hélice, de los cuales 12 son dominios transmembrana (Figura 1)(Dutzler *et al.* 2002, Sun *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2000). El canal CLC-1 es un canal de aniones dependiente de voltaje, pertenece a la familia CLC (Dutzler 2004) la cual es altamente conservada desde procariotas hasta eucariotas (Duran *et al.* 2010).

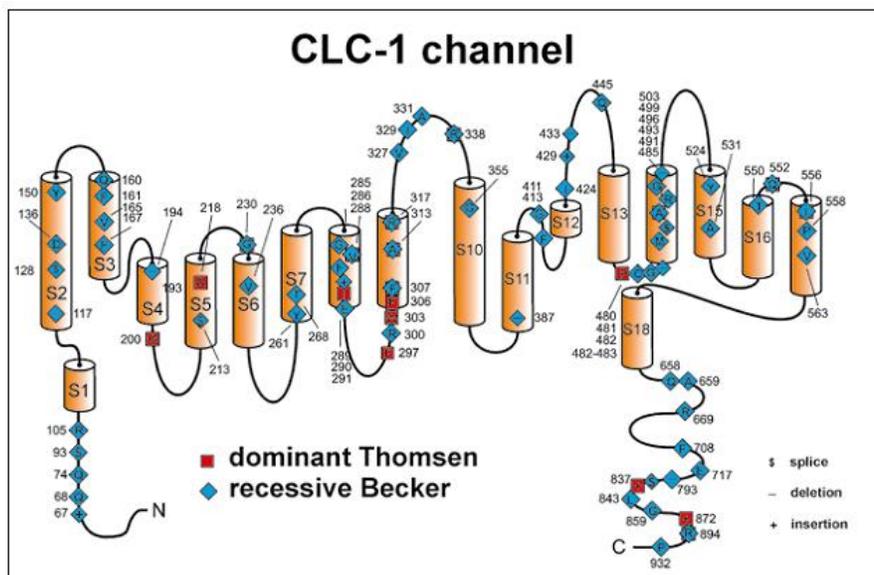


Figura 1. Modelo del canal CLC-1. El canal funcional es un homodímero. La imagen indica varias de las mutaciones (usualmente mutaciones de sentido equivocado) asociadas a la miotonía congénita de Becker o Thomsen. Imagen tomada de Lehmann *et al.* 2008.

Hasta el momento, se han descrito poco más de 100 mutaciones diferentes en el gen *CLCN1* (ver <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>). Entre las más comunes, según Human Gene Mutation Database (HGMD) y la literatura, son las de sentido equivocado o cambio de sentido (*missense*) y sin sentido (*nonsense*) (110 registradas); mutaciones en los sitios de splicing (12 reportadas) y pequeñas deleciones (9 registradas) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Estas mutaciones se distribuyen alrededor de todo el gen, siendo el exón 8 donde se han encontrado más mutaciones (Fialho *et al.* 2007). El canal de cloruro se forma gracias a la unión de dos proteínas CLC-1, formando un homodímero. Si una subunidad normal se une con una defectuosa, esto llevará a una alteración de la conformación estructural de la subunidad normal (Struyk & Cannon 2006), ocasionando una reducción en la conductancia del cloruro o inactivación del canal (Kwiecinski *et al.* 1988, Meola *et al.* 2009), esto mediante el mecanismo de dominancia negativa, lo cual explica la herencia dominante de esta condición. Así, para el caso de la Enfermedad de Thomsen, los individuos afectados por esta condición son portadores de una mutación en el canal CLC-1, la cual actúa de forma dominante mediante el mecanismo de dominancia negativa. Las mutaciones que tienen un efecto negativo dominante son menos frecuentes que las mutaciones de pérdida de función, de ahí que las mutaciones asociadas

con la enfermedad de Thomsen sean menos frecuentes que las asociadas con la miotonía tipo Becker (Colding-Jorgensen, 2005; Cannon, 2015).

La mayoría de las mutaciones encontradas en *CLCN1* se han asociado con la forma recesiva de la enfermedad y causan una pérdida de función del canal. Así, para el caso de la enfermedad de Becker, la mayoría de los individuos afectados presentan una mutación en estado homocigota, lo cual causa una pérdida de función del canal CIC-1. Sin embargo, se han reportado individuos portadores de alguna de estas mutaciones, que son asintomáticos (sin miotonía física), pero que presentan leves descargas miotónicas en las electromiografías, fenómeno que se le ha llamado miotonía latente (Steinmeyer *et al.* 1994, Deymeer *et al.* 1999, Cannon 2006, Jorde 2011, Zielonka *et al.* 2012).

Adicionalmente, en la MC se ha descrito que el mismo individuo puede presentar dos diferentes mutaciones en el gen *CLCN1*, generando lo que se conoce como heterocigotos compuestos (Kubisch *et al.* 1998). Estas dos mutaciones se han descrito como recesivas y por consiguiente deberían estar asociadas con un fenotipo de la miotonía tipo Becker, sin embargo, no siempre ocurre así, pues se han descrito heterocigotos compuestos en *CLCN1* con fenotipos más similares a la enfermedad de Thomsen ó a miotonías de sodio que a la miotonía tipo Becker (Koty *et al.* 1996, Kubisch *et al.* 1998).

Así, para el caso de mutaciones en el gen *CLCN1*, se podría decir que existen mutaciones que describen una herencia dominante y otra recesiva. Incluso, se han reportado varios casos donde la misma mutación se puede comportar como dominante o recesiva en diferentes familias, como por ejemplo las mutaciones p.A313T y p.G190S (Plassart *et al.* 1998, Shalata *et al.* 2009). Por último, se han encontrado algunos pacientes con síntomas asociados a la MC pero que no tienen las mutaciones típicas encontradas en el gen *CLCN1*.

Mediante el análisis de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*), el cual detecta inserciones o deleciones génicas, aún en regiones no transcritas, se ha logrado confirmar que algunos de estos pacientes portaban duplicaciones o deleciones de algunas regiones del gen *CLCN1*, las cuales probablemente contribuyen con el desarrollo de la enfermedad en estos pacientes (Raja *et al.* 2012).

1.3.2 Características genéticas de la canalopatía de sodio.

Las canalopatías de sodio son causadas por mutaciones en el gen *SCN4A* localizado en el cromosoma 17q23.1-25.3. Este gen está constituido por 24 exones y codifica para la subunidad alfa del canal de sodio (1851 aminoácidos) voltaje dependiente del músculo esquelético (Nav1.4) (Catterall, 1986). La proteína formadora del poro es una única unidad proteica que posee cuatro largos dominios homólogos (ver figura 2), cada uno con seis segmentos transmembrana (S1-S6), siendo los segmentos del S1 al S4 los que conforman los sensores de voltaje. El segmento S4 se reorienta cuando hay una despolarización, ocasionando un cambio conformacional de la proteína que resulta en la apertura del poro conductor de iones y con esto la activación del canal. Los segmentos S5 y S6 forman la puerta de inactivación y el sitio de acoplamiento respectivamente (Jukatt *et al.* 2010). Entre el dominio 3 y el 4 existe una asa citoplasmática conformada por un grupo de tres aminoácidos hidrofóbicos muy conservados: isoleucina, fenilalanina y metionina (IFM), que sirven como una partícula que ocluye el canal, produciendo una inactivación rápida. En términos generales, las partes de la proteína donde se han encontrado la mayoría de las mutaciones (figura 2) asociadas con estas enfermedades son: 1- el asa o *loop* que une los dominios tres y cuatro, 2- el cuarto segmento transmembrana (S4) de cada dominio, el cual corresponde al sensor de voltaje y 3- los segmentos S5 y S6 del canal de Nav1.4 (Struyk & Cannon, 2006).

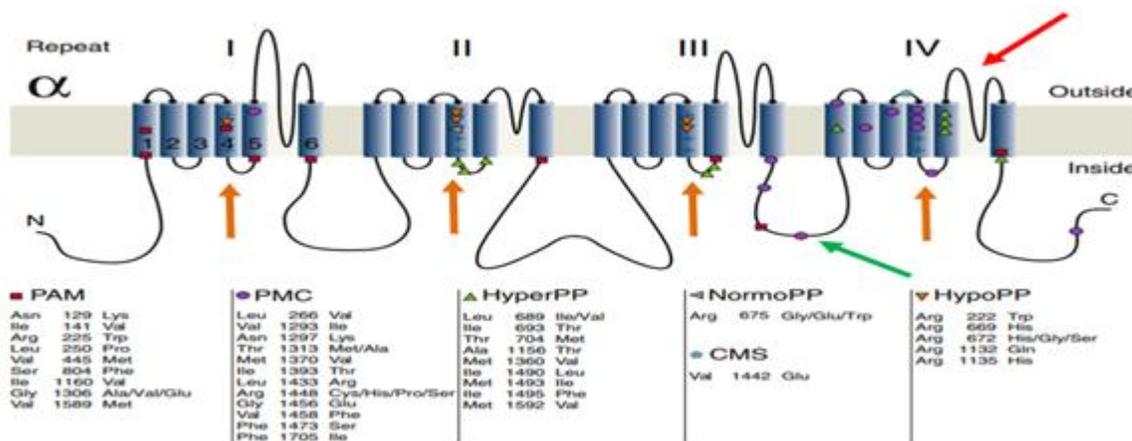


Figura 2. Representación de la ubicación de las mutaciones encontradas en Nav1.4. Se indican en la figura los principales puntos de mutaciones. Flecha verde el asa de unión entre el dominio tres y cuatro, las flechas anaranjadas los segmentos S4 de cada dominio y con la flecha roja los segmentos S5 y S6 del dominio IV.

Todas las mutaciones descritas hasta el momento ocasionan una ganancia de función de la proteína, por ende, son de herencia dominante. Estas mutaciones pueden modificar el canal Nav 1.4 de diferentes formas: 1- produciendo alteraciones en la compuerta (el más común); 2- en la conducción (defecto muy raro en el músculo esquelético); 3- afectando la formación de los poros (Cannon, 2010). Los exones en donde se han encontrado la mayor cantidad de mutaciones han sido los exones 22 y 24 (Heidari, et al. 2015).

Estas mutaciones en este canal pueden llevar a una conducción lenta (que lleva al desarrollo de miotonía) o incompleta (que ocasiona debilidad) de los iones sodio, además de alterar el estado de reposo (en donde se mantiene un flujo en la entrada de Na⁺) que induce parálisis, esto al alterar la inactivación o al acrecentar la activación del canal (Cannon 2010).

Para el caso de la HYPP, las mutaciones se ubican principalmente en las partes interiores de los segmentos transmembrana y en el *loop* que conecta el segmento S5 con el S6 del Dominio II. Estas mutaciones producen cambios tridimensionales que alteran la inactivación rápida del canal (Struyk & Cannon 2005; Jurkat-Rott *et al.* 2010).

Las mayoría de mutaciones que producen la PAM se sitúan en los N terminales de los *loops* que conectan los dominios, principalmente el de la puerta de inactivación (Struyk & Cannon 2005; Jurkat-Rott *et al.* 2010), a nivel de expresión funcional, producen varios efectos que van desde una miotonía leve (miotonía *fluctuans*) hasta más severas, en donde existe una lenta inactivación rápida y se acelera la recuperación del estado inactivo (Jurkat-Rott, 2010). Las mutaciones en la PMC se encuentran principalmente en el sitio de las partículas oclusivas IFM (Struyk & Cannon 2005; Jurkat-Rott *et al.* 2010, Matthews *et al.* 2010).

1.4 Justificación

Desde el año 1998 se han llevado a cabo una serie de investigaciones a nivel genético en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) con el fin de confirmar el diagnóstico clínico presuntivo de miotonías hereditarias en un grupo de pacientes costarricenses. Dentro de los resultados obtenidos, se ha encontrado un subgrupo de pacientes negativos para la distrofia miotónica tipo 1. Como consecuencia de esto, en el 2003 se inició la búsqueda de mutaciones en los genes que codifican para los canales voltaje dependiente de cloruro (*CLCNI*) y de sodio (*SCN4A*) del músculo esquelético, genes asociados con otras miotonías

hereditarias. Las técnicas utilizadas principalmente para esta búsqueda fueron PCR (reacción en cadena de la polimerasa), SSCP (*single stranded conformation polymorfism*, traducido como polimorfismo de conformación de cadena simple) y secuenciación automática para confirmar las mutaciones ó polimorfismos. Como resultado de esta búsqueda se han encontrado mutaciones ya reportadas en la literatura para la enfermedad de Becker o Thomsen, así como variantes nuevas, (Morales *et al.* 2003 y 2008). Sin embargo, todavía queda un grupo de 14 muestras de pacientes diagnosticados a los cuales no se les ha encontrado la causa genética de la miotonía por medio de las técnicas empleadas (SSCP y PCR), pero se cree que podría ser alguna mutación en los genes que codifican para el canal de cloruro (CLC-1) o sodio (Nav 1.4).

El tamizaje de los genes para buscar estas mutaciones se ha realizado por medio del ensayo SSCP, el cual se usa ampliamente a nivel mundial por sus capacidades de discriminar diferencias de hasta una única base en el ADN (Hayashi & Yandell 2005). Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como que algunas variantes pueden no ser detectadas (falsos negativos) debido a variables como la temperatura de la corrida, concentración de iones, solventes y tamaño de los fragmentos (Hayashi 2013). Así, se hace necesario completar, mediante el análisis de secuenciación, la identificación de las mutaciones. Mediante el ensayo de secuenciación automática de los genes *CLCN1* y *SCN4A*, este proyecto pretende identificar mutaciones responsables de los síntomas de un grupo de pacientes, que han resultado negativos para el diagnóstico de la distrofia miotónica tipo 1, esto con el fin de servir de ayuda para clasificar clínicamente mejor al grupo de pacientes en estudio y darles oportunidad a los médicos tratantes de ofrecer un mejor manejo clínico a los pacientes.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General:

Identificar variantes genéticas en los genes *CLCN1* y *SCN4A* responsables de la enfermedad de un conjunto de 14 individuos con sospecha de padecer una condición miotónica hereditaria con el fin de clasificarlos clínicamente.

1.5.2 Objetivos Específicos:

- 1- Buscar variantes genéticas en los exones de los genes *CLCN1* y el *SCN4A* en un grupo de pacientes con miotonías hereditarias no distróficas por medio de análisis de secuenciación.

- 2- Determinar si las variantes encontradas han sido previamente reportadas, o en su defecto, implementar una metodología para determinar si son variantes causantes de la enfermedad o variantes no patogénicas.

- 3- Utilizar herramientas bioinformáticas para determinar conservación y posibles efectos funcionales de las variantes

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Población en estudio

La población de estudio estuvo constituida por 14 pacientes costarricenses con sospecha de estar afectados por una miotonía hereditaria, los cuales habían resultado negativos para la mutación responsable de la distrofia miotónica tipo 1. Esta investigación se enmarcó dentro del proyecto 742-A3-304 “*Caracterización molecular de las Canalopatías en Costa Rica*”, el cual fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Costa Rica, al igual que su consentimiento informado. Todos los pacientes dieron previamente su consentimiento informado para participar en este proyecto de investigación. El proyecto fue financiado por la Universidad de Costa Rica y por el CONICIT.

2.2 Extracción del ADN

Las muestras (probandos y controles) que se emplearon forman parte de un banco de muestras de ADN del INISA. El ADN se aisló a partir de leucocitos de sangre periférica, por medio del método de proteinasa K-fenol-cloroformo (Sambrook and Russell 2001).

2.3 Análisis molecular de las muestras

El análisis de las muestras se realizó por medio de secuenciación de Sanger. Para esto, se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo procedimientos ya descritos (Lehmann-Horn *et al.* 1995) y optimizados en el laboratorio del INISA (Morales 2008). Mediante la PCR se amplificaron los 23 exones del gen *CLCN1* y los 24 exones del gen *SCN4A*, para cada una de las 14 muestras. En breve, se usaron 10-100ng de ADN, 50pmol de cada iniciador, 1,5mM MgCl₂, 0,5 unidades de enzima (taq polimerasa), 5ul de buffer 5x, 0,5ul de mix de dNTPs y agua para un volumen total de 25ul. A las muestras se les agregó aceite para evitar la evaporación. Para amplificar la región de interés se usó un termociclador Biometra siguiendo el siguiente perfil: Desnaturalización 96°C por 10min, luego 35 ciclos de 94°C por 30s, entre 51°C y 65°C (esto varía según la temperatura de

alineación de cada iniciador) por 45s y 72°C por 1 min, finalmente, un periodo de elongación de 72°C por 5min.

Las secuencias de los iniciadores usados para amplificar las regiones codificantes (exones) de los genes *CLCN1* y *SCN4a* se detallan en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Iniciadores empleados para amplificar la región codificante del gen *SCN4A* junto con sus condiciones

Iniciador	Primer F	Primer R	TA	TF
SCN4A-1a	5'-AGCAGGAGGTGAGGAGTGG-3'	5'-GTCACTTCGTGGCTTCCGTT-3'	55,5	294
SCN4A-1b	5'-TCACTGGCAGCCATAGAACA-3'	5'-TGGATGGCAGACAGACAGAG-3'	55,5	245
SCN4A-2	5'-CATCCATCTGTCTGCCTGT-3'	5'-CATCTCGCCCATCCCTAAC-3'	59,3	229
SCN4A -3	5'-ACCTCCCATCCTAGCTGCTT-3'	5'-TCAGGGAGCAGGGAGACTT-3'	60	157
SCN4A-4	5'GTTGCCACACTGACCCCTAC-3'	5'-ACCCAGCCTCAGGATGTC-3'	59,3	226
SCN4A-5	5'-CCCAATTTCTGGGAATCCT-3'	5'-TCTCTCAGCTCAGGCAGAGG-3'	51,1	240
SCN4A-6a	5'-GCCAATATCCTTGCCCTCTC-3'	5'-CGTTGGCATAACCATGAGT-3'	59,3	290
SCN4A-6b	5'-TTCAACGACACCAACACCAC-3'	5'-CGTCACCCTCCCCATTCTT-3'	55,5	199
SCN4A-7	5'-TGTGTCCATGTGGGTGACTT-3'	5'-TAATCAGCTCCCACCTTCCA-3'	59,3	176
SCN4A-8	5'AGCCCCCTGTCCTATTCCTA-3'	5'-TGAAGAGGCTGCAGGGATG-3'	59,3	230
SCN4A-9	5'-CACTCCCTCTCCCTCCACTC-3'	5'CCCTGGGTCTCTATCTCCT-3'	59,3	270
SCN4A-10	5'-CTCTGGCTCAGAGCTGGACT-3'	5'-AGGCTCCACCCCTACCTAAG-3'	59,3	249
SCN4A-11	5'ACCTGCTACCACCCCTCTC-3'	5'-CCTGCCATGAATGATCC-3'	62,1	300
SCN4A-12	5'-CTCTGTGACAGGGCTCAT-3'	5'-CCCTGGGGCTTTTGTGTA-3'	62,1	224
SCN4A-13a	5'-CTGGGCCTCATTACCCCTT-3'	5'-GACGATGAGGAAGGAGTGG-3'	59,3	280
SCN4A-13b	5'-AGCTACAAGGAGTGCGTGTG-3'	5'-GAGAGGATGTGTTGGGGA-3'	52,9	302
SCN4A-14a	5'-TGTGCTGGCTGAAGGTGG-3'	5'-CAGCAGCCCCAGGAGGAA-3'	64	228
SCN4A-14b	5'-GATGAGGATGGCGAGATG-3'	5'-CCCATGTGGTTCAGGATGT-3'	51,1	254
SCN4A-14c2	5'-GGAGGACCTGAAGAAGGACA-3'	5'-GAGAATTTGAAGCCGGGTCT-3'	55	254
SCN4A-15	5'-GATGTCATGTGACCCTGTGG-3'	5'-GCTTTTGGTCCTGGTGTAGC-3'	53	248

SCN4A-16	5'-CATGATGTGGTGCCTGTCC-3'	5'-CCCTCCTGTGTGTGGAGAC-3'	59,3	286
SCN4A-17	5'-GAACCAGCAGCATAGAGCAG-3'	5'-TGACAGCCTCTGGATGTAGC-3'	65,0	308
SCN4A-18	5'-GCTGTGAGTCCAGGAAGA-3'	5'-GAGTATAGACATGCACCCTCCA-3'	59,3	298
SCN4A-19a	5'-GTGGCGTAGAGATGTGGAG-3'	5'-TGTTGTTGACCTCGGAGATG-3'	59,3	247
SCN4A-19b	5'-CATCAACACCACCACCTCT-3'	5'-TGACACTGGGGTTGGGTA-3'	59,3	240
SCN4A-20	5'-CTCCCCAACCACACTCTCTC-3'	5'-GCCAAGTCTCCCTCCTGTCT-3'	62,1	150
SCN4A-21	5'-AGAAGCCAGCGTGCAAACC-3'	5'-ACAAAGGAGGCAGGAGGGAG-3'	63,9	248
SCN4A-22	5'-GGGAAGTGCACCTCAACCT-3'	5'-ATCAGTCCCCTAGGCAGGAG-3'	65,0	207
SCN4A-23a	5'-CCAACTCCTCCACATCCACT-3'	5'-ACAGGATGTCCACCTTGAGC-3'	59,3	175
SCN4A-23b	5'-CCAGCTCAAGGTGGACAT-3'	5'-AGGATGGGTCTTCCCGAGT-3'	59,0	219
SCN4A-24a	5'-GCAGCGTCTCACTAGCTTC-3'	5'-ATGCCCGACTCCTTCTTGAC-3'	59,3	279
SCN4A-24b	5'-TCCTCCTCTCCTGGTCA-3'	5'-AAGCAGATGCCGATGGAG-3'	55,5	271
SCN4A-24c	5'-CCCAGACTGTGACCCCAA-3'	5'-TGGCACCATGGGCAAGTC-3'	59,3	361
SCN4A-24d	5'-GATTGCCAAGCCCAACAAGA-3'	5'-CGGTAGGCCCTCTGGATCTT-3'	59,3	261
SCN4A-24e	5'-GTGTCCTACGAGCCCATCAC-3'	5'-GGCATCAGCCCCATAGTG-3'	63,0	261
SCN4A-24F	5'-CGAGAATGGGAACAGCAG-3'	5'-AGTGTGGCCAAATCCTGT-3'	52,9	308
SCN4A-24g	5'-TGAGGGAGGAGGGCTTTG-3'	5'-GGCAACTGATCCCTCCAC-3'	59,3	302
SCN4A-24h	5'-GAATCTCTGCCCTCACT-3'	5'-GGTTTTGAGGCTTTGAGG-3'	55,5	295
SCN4A-24i	5'-CCAGGCCAGCTCAGGAAT-3'	5'-AGGCCATGTGCAGCGATC-3'	55,5	285
SCN4A-24j	5'-TTTTCTAGGAAGCACGGGG-3'	5'-CCCCAGGGTCGAAATATCTA-3'	55,5	309
SCN4A-24k	5'-ACCTTTCCACCTCTCTC-3'	5'-CACAGCTATACACACAGG-3'	55,0	306
SCN4A-24l	5'-GGCTGTGTGTCTGCTTGT-3'	5'-CACCTTACCACATGCGTT-3'	51,0	295
SCN4A-24m	5'-TGTGCTGTGAGTGTGTGG-3'	5'-AGAGGGGAGTGAGAGAGA-3'	55,0	298
SCN4A-24n	5'-ATGCTCTCTCACCTGCTC-3'	5'-AATGTGCCAGGAAGGGGAGA-3'	65,0	212
SCN4A-24o	5'-TTTCGTCTAATGGGGCAGT-3'	5'-CATAACCAGAGGCACCAAGGA-3'	55,0	309

Fuente: tomado del protocolo establecido en el INISA; TA: temperatura de alineamiento; TF: tamaño del fragmento.

Cuadro 2. Iniciadores empleados para amplificar el gen *CLCN1*, junto con sus condiciones

Iniciador	Primer F	Primer R	TA	TF
CLCN1-1	5'-GGG GCT CGG GGG GAG GGA AT-3'	5'-CCT CAT TTT CAC CAG TCT CT-3'	56	272
CLCN1-2	5'-CTT CCA CAA GGC AGA CAC TG-3'	5'-ATG CCC AAG TTA TTC TCC TA-3'	51	234
CLCN1-3	5'-TTT TCC CTC ATC TCT TCC TA-3'	5'-CCA TAA CAC ACC CTG CTT AC-3'	53	256
CLCN1-4	5'-CGG TGG ACA CGG CTG CTC AG-3'	5'-GCC GAG TCT GGT GGC AAG TT-3'	59	211
CLCN1-5	5'-TAA TCT TTC AAC GCT TTT AG-3'	5'-ATC CAC TTC CAC TCC CAG AG-3'	53	248
CLCN1-6	5'-CCT CTG TGT AAC TCC CGT AT-3'	5'-ATT TCA CTG TCT CAA CCT TA-3'	53	227
CLCN1-7	5'-ACC CAC CCT GTT TCT CTG TC-3'	5'-GCT ATT CTC GTA AGT AAC CT-3'	51	227
CLCN1-8	5'-TGC CCC CAA CCA CAC TTC TG-3'	5'-GCC CAT TAT TCC TTT TCT GA-3'	55	259
CLCN1-9	5'-ACT GGC CTT TCC ATC CTA CA-3'	5'-GCC TCA CTC CAC ACC CTG CT-3'	54	157
CLCN1-10	5'-TCC AAG AGA TGA GGA TTT CA-3'	5'-GAC AAA AAG GGA GGA ACT CT-3'	52.5	229
CLCN1-11	5'-ATT TAC TGT GAG TTG GCT GA-3'	5'-GTG CTG TTT CCT CTT TAC CA-3'	52	178
CLCN1-12	5'-GAC CAC CTT CTG CTT CTT CC-3'	5'-TGG AGG TTT AGG GTG TTG CT-3'	54.5	214
CLCN1-13	5'-CAG AGT TGA AAG GGT ATT CC-3'	5'-CCT TAT GTT TCC TGT ATC CT-3'	51	176
CLCN1-14	5'-ATC TCG TAA CAC CTT CCT TC-3'	5'-ATG GGA GAG TTT AAG TGT GG-3'	51	221
CLCN1-15	5'-CAG GCG TAT TCC TGT GTC AT-3'	5'-ATT CCG TCT AGT GCC CCT GA-3'	56	260
CLCN1-16	5'-GGC TAA CCC ACC ATG CTT CT-3'	5'-ATT CAG GTC ACT AGC TCT GG-3'	55	209
CLCN1-17	5'-GCC TCT CCT GTT CCT TCT CA-3'	5'-AGA CGA COC TTT CCC TTG CT-3'	59	389
CLCN1-18	5'-CCA GGC TGA GAC TTC TTA CT-3'	5'-AGG GGT GAG TTG GGG TGC AT-3'	55	179
CLCN1-19	5'-CAT CCA CTC ACC TGT CCT CT-3'	5'-GGG TCT CTG CCT TCC TGA TT-3'	54.5	197
CLCN1-20	5'-GGA AGA AAA GGG AAA GAA CT-3'	5'-GAC AAC ACA ATA AAG AAG GT-3'	47	171
CLCN1-21	5'-TGA TTT TCG TGA CTT TCC TC-3'	5'-CCC CAC AGC CCT GAG CAG TC-3'	54	172
CLCN1-22	5'-ACC TGT GCT CTT CAT CCT CA-3'	5'-CCC TCC TGC TGC TCA AAT GG-3'	55	144
CLCN1-23A	5'-TTT CCA ACT TTT TAC CCT CT-3'	5'-TGG GGA GGC AGC AAT CAC AT-3'	55	229
CLCN1-23B	5'-ACT GGA ACA GGG GAT GTG AT-3'	5'-TTT ATG AGG AGG TCG TGG GA-3'	58	244

Fuente: cuadro realizado a partir de Lehmann-Horn *et al.* 1995. TA: temperatura de alineamiento; TF: tamaño del fragmento.

Los productos de PCR fueron purificados usando el Kit QIAquick PCR purification de Qiagen (Alemania) siguiendo el protocolo que establece la casa comercial. Los productos purificados se enviaron a secuenciar a la compañía Macrogen, en Korea. Los resultados de las secuenciaciones se analizaron usando los programas 4Peaks de Mek & Tosj (mekentosj.com) y *Chromas 2.6.1* de Technesium Pty Ltd. Las variantes genéticas encontradas se buscaron en la literatura o en diversas bases de datos como *Ensembl*, *Human Gene Mutation Database*, *ExAC Browser* (<http://exac.broadinstitute.org/>) y NCBI para verificar si estaban o no reportadas en estas enfermedades.

Una vez identificadas las variantes genéticas por secuenciación se diseñó un ensayo para confirmar la presencia de las mismas en el ADN genómico del probando y en los familiares de los probandos (cuando estaban disponibles). Los ensayos realizados corresponden al de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism* o RFLP) y PCR enzima específico, esto por cuanto estas variantes pueden crear o eliminar un sitio de restricción.

Para identificar la presencia y genotipos de las variantes encontradas se utilizaron enzimas de restricción (cortan el ADN dependiendo si el probando presentaba o no la mutación). Para encontrar la enzima de restricción que identificara la presencia de la mutación se empleó el programa *Restriction Mapper V. 3.0*. (<http://www.restrictionmapper.org/>). En caso que la variante no creara o eliminara un sitio de restricción para una enzima conocida se procedió a diseñar iniciadores que crearan un sitio de restricción para una enzima específica, la cual se identificó utilizando el programa *Restriction mapper*. Los iniciadores se elaboraron por medio del Primer 3 Oligo. En el cuadro 3 se indican los iniciadores, enzimas y tamaño de fragmento esperado para el análisis de las variantes.

Para el análisis de restricción de los fragmentos de PCR, se usaron 4ul del producto de PCR, cinco unidades de la enzima de restricción, buffer 1X en un volumen de 20ul. La reacción de digestión se incubó toda la noche a la temperatura indicada por el fabricante (cuadro 3).

Los productos de PCR obtenidos se observaron en un gel de agarosa (TopVision LEGQ/Fermentas) al 1,5% teñido con gel red, en buffer TBE 0,5X. Para esto, 2 µL del producto de PCR se mezclaron con 3 µL de azul de bromofenol y se agregaron en el gel colocado en la cámara de electroforesis y se corrieron durante 1h a 80V, 250W y 150 mA.

Para analizar la digestión de los productos de PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 3% (2% agarosa Topvision y 1% Nusieve), teñido con gel red, en buffer TBE 0,5X. Para esto, 10 µL del producto de digestión se mezclaron con 5µL de azul de bromofenol y se agregaron en el gel colocado en la cámara de electroforesis y se corrieron durante 2h a 80V, 250W y 150mA. Los productos de PCR y digestión se observaron en un transiluminador.

En caso de encontrarse una variante genética no reportada, se procedió a analizar 100 individuos (200 cromosomas) no relacionados y no afectados con una canalopatía miotónica con el fin de obtener evidencia si la variante encontrada corresponde más probablemente a una mutación ó a un polimorfismo. Este número de controles se escogió porque es el más empleado por los investigadores (Lehmann *et al.* 1995, Dupre *et al.* 2009, Vindas-Smith *et al.* 2015) para determinar si la variante puede ser causante de la enfermedad o es una variante neutra. Se clasificó como variante no causante de la enfermedad o benigna (polimorfismo) cuando en los controles sanos (cromosomas), la variante se encontraba en más de 1%, si la variante se encontraba en menos de 1% se clasificaba como variante causante de la enfermedad o mutación.

Adicionalmente, para las mutaciones nuevas o no reportadas, se utilizaron los programas Poly Phen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) y SNPdryad (<http://snps.ccb.utoronto.ca:8080/SNPdryad/#content>) para verificar si las variantes encontradas podrían afectar la función normal de la proteína respectiva. También, se usaron los programas ClustalW Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>) para estudiar el grado de conservación de las proteínas mediante un alineamiento de aminoácidos con secuencias de otras especies (humano, orca, vaca, chimpancé, ratón, perro y gato).

Cuadro 3. Iniciadores y condiciones para el análisis de las variantes encontradas en esta práctica

Mutación	Gen	Iniciadores	Enzima	Fragmentos esperados
c.1053G>A; p.G355R	CLCN-1	CLCN-ex9g355rF 5'-gaactaccagcttttgctgcc-3' CLCN-ex9g355rR 5'- ttggacataactactgcagggaaac-3'	<i>AvaI</i>	22bp y 185bp Con digestión 207bp sin digestión
c.966 G>A, p.W322X	CLCN-1	CLCN -ex8-F 5'- tgccccaaccacactctg -3'- iniciador específico para la enzima CLCN -ex8-R 5'- ggttaccagcatccttgg -3'	<i>AvaII</i>	116bp, 18bp con digestión. 134bp sin digestión
c.2003 G>T, p. W642C	SCN4A	SCN4A-ex12 F 5'- ctctgtgacagggcctcat --3' SCN4A -ex12 R 5'- ccctggggctttgtgta --3'	<i>XmnI</i>	116bp y 108bp con digestión 224bp sin digestión
c. 4015 C>T, p. T1313M	SCN4A	SCN4A -ex22 F 5'-gggaactgcacctcaacct-3' SCN4A -ex22 R 5'-atcagtcacctagcaggag-3	<i>BccI</i>	207bp sin digestión 148bp y 59bp con digestión
c. 4388G>A, p. R1463H	SCN4A	SCN4A -ex24a F 5'- gcagcgtcctcactagcttc-3' SCN4A -ex24a R 5'- atgcccgactccttcttgac-3'	<i>SacII</i>	149bp y 130bp con digestión 279bp sin digestión

Fuente: elaboración propia.

Paralelo a los análisis de secuenciación, se llevó a cabo un análisis de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA *multiplex ligation-dependent probe amplificación*) para ambos genes. Este ensayo permite el estudio e identificación de mutaciones de tipo duplicación y delección. La MLPA se realizó en un total de 27 muestras (22 pacientes sintomáticos y 5 muestras control- sin síntomas de una canalopatía miotónica). Este grupo de 22 pacientes sintomáticos incluye los 14 del estudio y 8 pacientes con un fenotipo atípico (pacientes diagnosticados clínicamente positivo con una canalopatía

miotónica, donde el fenotipo encontrado no concuerda con el genotipo o no se encontraron mutaciones en los exones).

y se usaron los kits de la casa MRC-Holland para el gen *CLCN1* (SALSA MLPA 350 CLCN-1-KCNJ2) y *SCN4A* (SALSA MLPA P397 SCN4A-CACNA15) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el anexo se encuentran las sondas que hibridan en cada kit.

Para realizar el ensayo de la MLPA se usaron un total de aproximadamente 30ng de ADN. Para realizar la hibridación de las sondas, el ADN se incubó por 5 min a 98°C y posteriormente se agregó el buffer para la MLPA y el mix de sondas. La reacción se incubó por 1 min a 95°C, seguidamente se mantuvo a 60°C por 18 horas. Acabado este tiempo el termociclador se mantenía a 54°C, en espera del siguiente paso. Para la ligación, se usó la enzima ligasa el buffer A y B del kit y el ADN. La reacción se incubó a 54° C por 15 min, 98°C por 5 minutos y se mantuvo a 20°C hasta que se retirara el producto. Para la amplificación de las sondas, se usaron 8ul del producto anterior, agua, los iniciadores y la ADN polimerasa y se uso el siguiente perfil en el termociclador: 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por un minuto (x33), 72°C por 20 minutos y luego se mantenía la temperatura a 15°C hasta retirar el producto. Una vez concluidos todos los pasos, las muestras se enviaron a secuenciar a la compañía Macrogen. Los análisis de los resultados se llevaron a cabo en el INISA con el programa Coffalyser de la MRC Holland.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Luego de realizar la secuenciación del gen *CLCN1* en 14 muestras de pacientes diagnosticados presuntivamente con una canalopatía miotónica, se encontraron variantes genéticas únicamente en dos muestras (CR1 y CR2), las cuales aparentemente no están relacionadas entre sí. Las 12 muestras restantes resultaron negativas para mutaciones presentes en el gen *CLCN1*.

La muestra CR1 presentó dos variantes heterocigotas en el gen *CLCN1*, una en el exón ocho y otra en el exón nueve. La variante del exón ocho corresponde a una mutación sin sentido (*nonsense*), donde el cambio de una G por una A en la posición 966 incorpora un codón de terminación en lugar de un codón para la síntesis de triptófano en la posición 322 de la proteína CIC-1 (c.966G>A, p.W322X). La variante del exón nueve corresponde a una mutación de pérdida de sentido (*missense*), porque se da un cambio de una G por una A en la posición 1063, incorporando una arginina en la posición 355 en lugar de una glicina (c.1063G>A, p. G355R) (Figura 3).

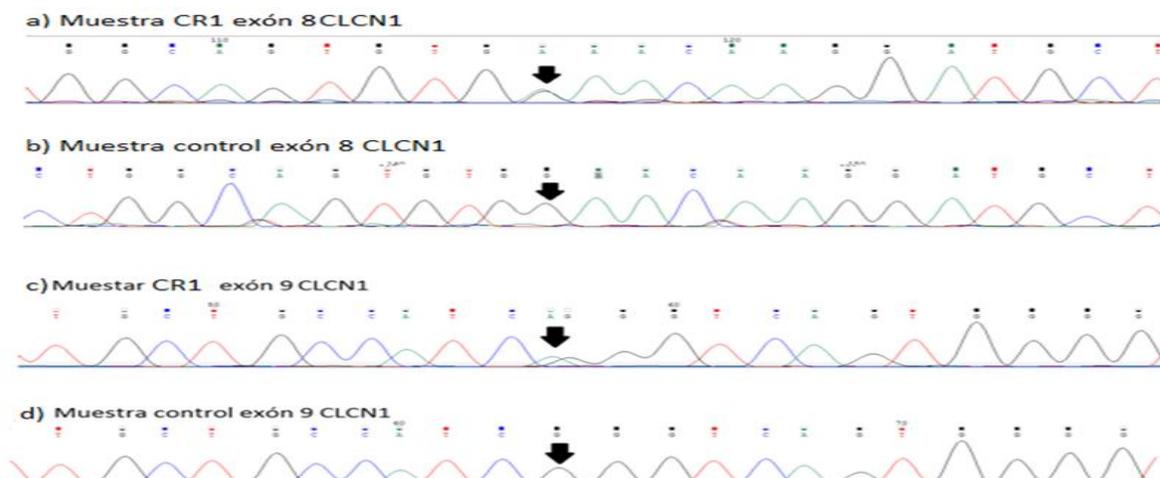


Figura 3. Electroferogramas correspondientes a la secuenciación de los exones ocho y nueve del gen *CLCN1*, para la muestra CR1. Como se observa, en esta muestra se encontró una variante heterocigota en la posición 966 donde se incorpora un codón de terminación en lugar de un codón para la síntesis de triptófano en la posición 322 de la proteína CIC-1, la cual corresponde a una mutación tipo *nonsense* (A). Este cambio no se observa en la muestra control (B). También se observó una variante heterocigota en la posición 1063 sustituyendo una G por una A, produciendo un cambio de aminoácido de glicina por arginina (C), la cual corresponde a una mutación tipo *missense*. Este cambio no se observa en la muestra control (D). Las flechas indican la posición del cambio en cada caso.

Seguidamente, se procedió a buscar estas variantes en la página de Ensembl (www.ensembl.org) para conocer si estas variantes estaban reportadas como un polimorfismo de una sola base (*single nucleotide polymorphism*-SNP) o como una mutación. En el caso de la variante p.W322X no se encontró referencia al respecto, en cambio la mutación p.G355R ya se encontraba reportada en Ensembl.org con el registro de rs767000881, en ExAC Browser se halla registrada en una frecuencia muy baja ($2,997 \times 10^{-5}$) en la población europea (no finlandés) y se encuentra reportada como mutación en el artículo de Deymeer *et al.* (1998).

Con el fin de confirmar que estas variantes no corresponden a errores en la secuenciación, se procedió a confirmar su presencia en el ADN genómico. Para realizar eso, la región del ADN de interés se amplificó usando el ensayo de la PCR y el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción apropiada para cada caso (cuadro 3). Para el caso de la mutación c.966G>A, p.W322X, la confirmación de la mutación en el ADN genómico está pendiente, pues debido a problemas técnicos, no se ha logrado amplificar esta región para esta muestra. Para la mutación c.1063G>A, p.G355R, el cambio elimina un sitio de restricción, en este caso para la enzima *AvaI*. En este caso, la presencia de la variante fue confirmada en el ADN genómico, donde el probando resultó ser heterocigoto (Figura 4), lo cual concuerda con los resultados de la secuenciación.



Fig. 4. Resultados de la digestión con la enzima *AvaI* para el estudio de la mutación G355R. En los dos primeros carriles se encuentran muestras controles. En el carril que dice CR1 se encuentra el producto de la digestión de la muestra en estudio. En la figura se aprecia que la muestra denominada CR1 presenta dos bandas, confirmando la presencia de la mutación.

En vista de que la mutación c.966G>A, p. W322X no se encontraba reportada en las bases de datos, se procedió a realizar un tamizaje de 100 muestras (200 cromosomas) no relacionadas ni afectadas con la MC para descartar que fuera un polimorfismo. Debido a que esta variante no crea ni elimina un sitio de restricción, se procedió a diseñar un iniciador que introdujera un sitio de restricción para una enzima específica, en este caso, para la enzima *AvaII*, la cual no va a digerir el ADN cuando la mutación esté presente en

este sitio específico, pero basto con los primers específicos después de una PCR secundaria para establecer los genotipos, sin necesidad de realizar la digestión. El análisis mostró que no se encontró la presencia de la mutación en ninguno de los controles (Figura 5), por lo que, es probable que la presencia de esta variante contribuya con el desarrollo de la



enfermedad.

Figura 5. Figura representativa del análisis con PCR específica para el estudio de la mutación p.W322X en 100 controles. En el primer carril se observa el producto de la PCR sin digerir (PSD) y en los restantes carriles se encuentran digestiones de los controles. Se puede apreciar que en ninguno de los controles se encontró la mutación, pues la no digestión del producto de PCR indica la presencia de la mutación.

El probando portador de estas mutaciones inicialmente había sido diagnosticado con una canalopatía miotónica, sin embargo, se tiene poca información clínica del paciente o información familiar (está pendiente el análisis de estas mutaciones en más individuos de esta familia). La mutación p.G355R es bien conocida como causante de miotonía congénita, más específicamente su forma recesiva (miotonia tipo Becker). Deymeer y colaboradores (1998) describieron esta mutación en un hombre de 33 años diagnosticado con la miotonía tipo Becker. En este paciente los síntomas se manifestaron desde los 10 años y presentaba debilidad transitoria. Así, es probable que la presencia de esta mutación en conjunto con la p.W322X sean los responsables de los síntomas del paciente, aunque no se tiene información funcional ni genética sobre la mutación p.W322X. Así, es probable que este paciente este afectado por la miotonía tipo Becker y sea un heterocigoto compuesto.

La muestra CR2 presentó solo una variante en el gen *CLCN1*, específicamente en el exón ocho, la cual corresponde a una mutación sin sentido (*nonsense*), donde el cambio de una G por una A en la posición 966 incorpora un codón de terminación en lugar de un codón para la síntesis de triptófano en la posición 322 de la proteína ClC-1 (c.966G>A, p. W322X) (Figura 6). Esta mutación es la misma que se encontró en la muestra CR1, sin embargo, en este paciente, la mutación se encontró en estado homocigota.

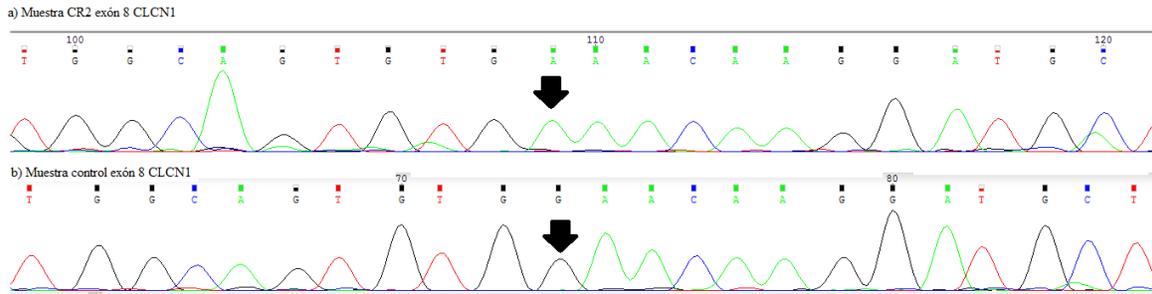


Figura 6. Electroferogramas correspondientes a la secuenciación del exón ocho del gen *CLCN1*. para la muestra CR2. Como se observa, en esta muestra se encontró una variante en la posición 966 donde se incorpora un codón de terminación en lugar de un codón para la síntesis de triptófano en la posición 322 de la proteína CIC-1, la cual corresponde a una mutación tipo *nonsense* (A). Este cambio no se observa en la muestra control (B). Las flechas indican el lugar donde se encontró la mutación.

Con el fin de confirmar que esta variante no corresponde a errores en la secuenciación, se procedió a confirmar su presencia en el ADN genómico. Para realizar eso, la región del ADN de interés se amplificó usando el ensayo de la PCR y el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción apropiada (cuadro 3), tal como se realizó anteriormente para el análisis de los 100 controles (Figura 5). En este caso, la presencia de la variante fue confirmada en el ADN genómico (Figura 7), confirmándose así que éste paciente es portador de esta mutación y en estado homocigoto. Este probando había sido tamizado anteriormente usando el ensayo de PCR y SSCP pero la mutación no se pudo encontrar. La mutación fue encontrada cuando se secuenció la región codificante de este gen.



Figura 7. Resultados de la digestión con la enzima *AvaII* para el estudio de la mutación p. W322X. En el primer carril se muestra el producto de PCR sin digerir (PSD), en el segundo carril el producto de la digestión de la muestra CR2, en el carril 3 se encuentra el producto de la digestión de la muestra CR5, familiar del probando CR2. Los carriles del cuatro al seis son muestras control. El sétimo carril es ocupado por el blanco. Se observa que la muestra CR2 no sufrió digestión, por lo que, presenta la mutación en el ADN genómico en forma homocigota, además se encuentra que la muestra CR5 presenta la mutación, pero en estado heterocigoto. Como era de esperar, las muestras control presentan una banda de menor tamaño por haber sufrido digestión y con ello se confirma que no posee la mutación.

Este probando es miembro de una familia costarricense donde el cuadro clínico era típico de la forma dominante de la MC, por lo que fue diagnosticado con la enfermedad de Thomsen (Morales *et al.* 2003). En esta familia, todos los miembros evaluados clínicamente (10 individuos) y mediante electromiografía, resultaron afectados, sugiriendo una herencia autosómica dominante. Interessantemente, el probando resultó más severamente afectado que otros miembros de su familia, probablemente debido a su condición de homocigota (Figura 8).

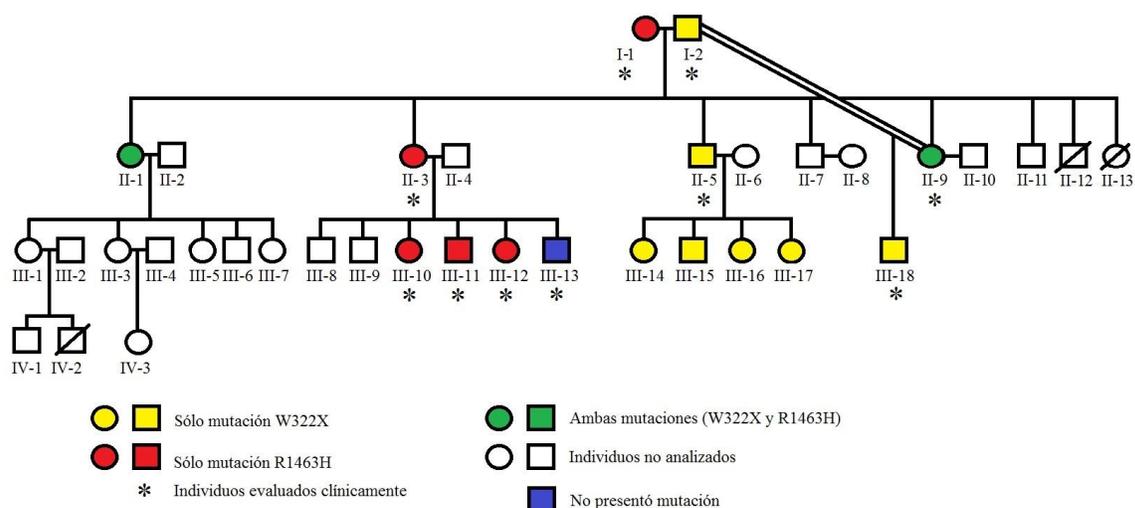


Figura 8. Arból genealógico del probando CR2 (III-18) y CR3 (I-1). En este árbol se muestra los resultados del análisis de las secuencias. En color rojo se expresan los individuos que presentaron solamente la mutación R1463H, en amarillo los individuos con la mutación W322X, en verde los individuos con ambas mutaciones y en azul los que no presentaban la mutación. El asterisco (*) indica los individuos a los cuales se les realizó el análisis clínico. En blanco los familiares no analizados.

El probando (III-18) es el resultado de un incesto, donde tanto su padre (I-2) como su madre (II-9) resultaron heterocigotos para esta mutación. Una vez identificada la mutación en esta familia y con los ensayos (secuenciación, PCR y digestión del producto de PCR) y muestras disponibles, se procedió a analizar a otros miembros de la familia (unos sin evaluarse clínicamente). En total, se analizó el ADN de 15 individuos en esta familia, de los cuales nueve presentaban esta mutación (cinco individuos sin evaluación clínica) y seis no la presentaban. Interessantemente, estos seis individuos (no portadores para esta mutación) habían sido evaluados clínicamente y habían resultado afectados y diagnosticados con la enfermedad de Thomsen (Morales *et al.* 2003). Esta observación hace pensar en la posibilidad de que estos seis individuos tengan una mutación diferente a la p.W322X y que contribuya con la enfermedad. Para descartar la posibilidad de otra mutación en el gen

CLCNI se secuenció el exoma de la abuela (I-1) del probando (CR3), sin embargo, no se encontró ninguna variante.

Otra observación interesante es la forma de herencia de la mutación, donde en la muestra CR1 esta mutación parece transmitirse de forma recesiva, mientras que en la familia de la muestra CR2 se está transmitiendo de forma dominante. Para este gen, se han descrito aproximadamente unas 16 mutaciones (Matthews *et al.* 2010) que tienen este comportamiento dual, por lo que algunas mutaciones tienen el problema de poder enmarcarlas en el esquema de dominante o recesiva, debido a que en algunas familias para la misma mutación el efecto se transmite de forma dominante o de forma recesiva. Este comportamiento se puede deber a otros factores desconocidos que estén regulando el nivel de expresión de cada alelo (Plassart *et al.* 1998, Shalata *et al.* 2009).

Dado que 12 de las 14 muestras analizadas en esta investigación resultaron negativas para mutaciones en el gen *CLCNI* (incluyendo una de las muestras de la familia de CR2, más específicamente, la abuela de CR2-que se denominará CR3- se procedió a secuenciar la región codificante del gen *SCN4A* en estas 12 muestras. La secuenciación de éste gen permitió identificar variantes genéticas en 2 de las muestras (aparentemente no relacionadas) analizadas para este gen, a saber, las muestras CR3 y CR4.

La muestra CR3 (fig. 8, I-1) presentó dos variantes heterocigotas en el gen *SCN4A*, una en el exón 12 y otra en el exón 24. Ambas variantes corresponden a una mutación de sentido equivocado (*missense*). En el primer caso se da un cambio de una G por una T en la posición 1926 de los nucleótidos de la proteína *SCN4A*, incorporando una cisteína en la posición 642 en lugar de un triptófano (c.1926 G>T, p. W642C). En el segundo caso se da un cambio de una G por una A en la posición 4388, incorporando una arginina por una histidina (c. 4388G>A, p. R1463H) (ver figura 9).

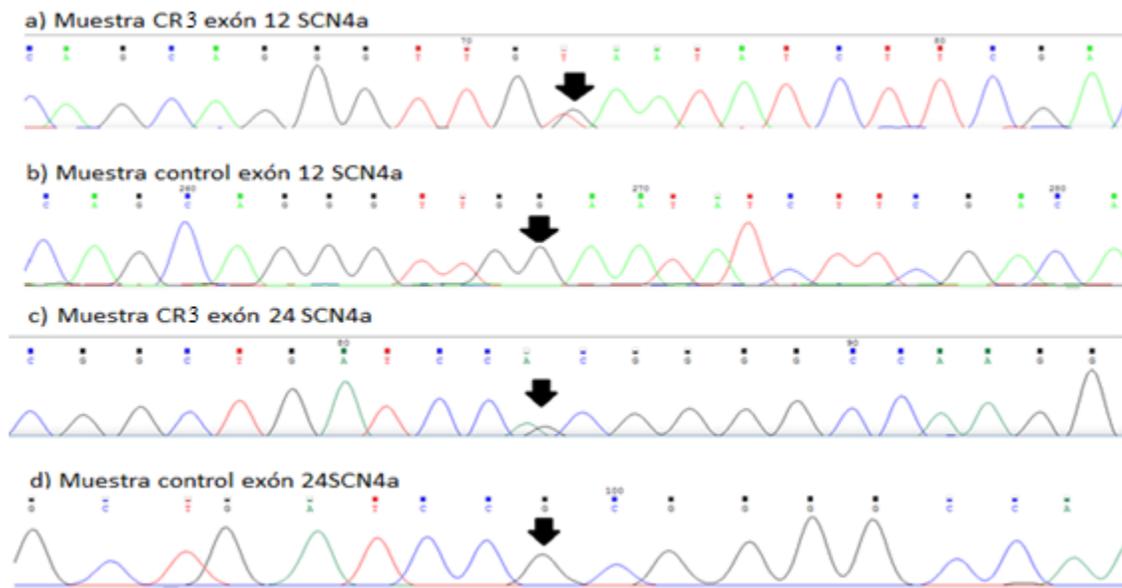


Figura 9. Electroferogramas correspondientes a la secuenciación de los exones 12 y 24 del gen *SCN4A*, para la muestra CR3. Como se observa, en esta muestra se encontró una variante en la posición 642 donde se incorpora una cisteína en lugar de un triptófano, la cual corresponde a una mutación tipo *missense* (A). Este cambio no se observa en la muestra control (B). También se observó una variante en la posición 4388 sustituyendo una G por una A, produciendo un cambio de aminoácido de arginina por histidina (C), la cual corresponde a una mutación tipo *missense*. Este cambio no se observa en la muestra control (D). Las flechas indican la posición del cambio en cada caso.

Seguidamente, se procedió a buscar estas variantes en la página de Ensembl (www.ensembl.org) para conocer si estas variantes estaban reportadas como un polimorfismo de una sola base (*single nucleotide polymorphisms-SNP*) o mutación reportada. En el caso de la variante p. W642C se encontró que poseía el número de SNP rs781412058, en ExAC browser se encontró con una frecuencia de $8,738 \times 10^{-5}$ en la población latina, aunque inicialmente no se había encontrado información sobre esta variante, por lo que, en este trabajo se consideró como una variante nueva. Con respecto a la variante p. R1463H, inicialmente se encontró reportada como una mutación, pero sin encontrar información literaria que la soporte.

Con el fin de confirmar que estas variantes no corresponden a errores en la secuenciación, se procedió a confirmar su presencia en el ADN genómico. Para realizar eso, la región del ADN de interés se amplificó usando el ensayo de la PCR y el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción apropiada para cada caso (cuadro 3). Para este caso, la

mutación c.1926 G>T, p. W642C elimina un sitio de restricción para la enzima *XmnI*. Para la mutación p. R1463H, el cambio también elimina un sitio de restricción, en este caso para la enzima *SacII*. En ambos casos, la presencia de la variante fue confirmada en el ADN genómico y para ambas variantes, el probando resultó ser heterocigoto (Figura 10 y 11), lo cual concuerda con los resultados de la secuenciación.



Figura 10. Resultados de la digestión con la enzima *XmnI* de la muestra de ADN para el estudio de la mutación p. W642C. En el primer carril se encuentran un producto sin digerir (PSD). En los carriles dos y tres se encuentran productos de digestión de muestras control. En el cuarto carril se encuentra el producto de digestión de la muestra CR3. En el quinto carril se encuentra el blanco. Se puede apreciar la diferencia entre las bandas de la muestra mutada y los controles.

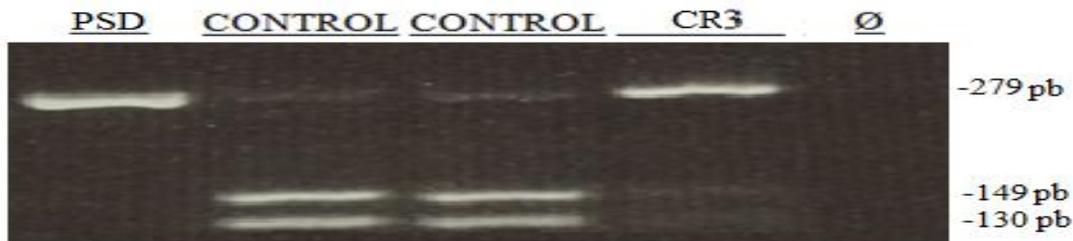


Figura 11. Resultados de la digestión con la enzima *SacII* de la muestra de ADN para el estudio de la mutación p. R1463H. En el primer carril se encuentran un producto sin digerir (PSD), el segundo y tercer carril muestran controles negativos, en el cuarto carril se encuentra la muestra CR3, finalmente en el quinto carril se encuentra el blanco. Se puede apreciar la diferencia en las bandas y con ello la confirmación de la presencia en el ADN genómico de la mutación.

Debido a que cuando se identificó la mutación p.W642C no se encontró información en las bases de datos, se procedió a analizar 100 muestras control para determinar si esta variante correspondía a un polimorfismo o una mutación. Sin embargo, al cabo de 52 muestras analizadas, la variante se encontró en seis de ellas (ver figura 12), resultando en una frecuencia de aproximadamente un 6% (6 cromosomas de un total de 104= 5.8%). Esto hace pensar que se trata de un polimorfismo y no una mutación. Por lo consiguiente, varias semanas después se volvió a revisar las bases de datos y se encontró que ya se había incorporado la información del número de SNP, en Ensembl.



Figura 12. Resultados de la digestión de ADN con la enzima *XmnI* de algunas muestras control. En el primer carril se encuentra un producto de la PCR sin digerir (PSD). En el segundo carril se encuentra el producto de la digestión de la muestra CR3, los siguientes carriles muestran controles negativos para la miotonía, se puede apreciar en el carril seis una banda a una altura semejante a los productos sin digerir. A partir de esta información se concluye que es un polimorfismo.

Así, este probando es portador únicamente de la posible mutación p.R1463H, la cual se encontró reportada para el gen de *SCN4A*. Este probando, abuela de CR2 (fig. 8, I-1) había sido uno de los individuos evaluados clínicamente en esta familia, por lo que fue diagnosticado con la enfermedad de Thomsen (Morales *et al.* 2003). Una vez identificada esta mutación en esta familia se encontró que de los 15 individuos en esta familia, siete presentaban esta mutación (un individuo sin evaluar clínicamente) y ocho no la presentaban. Al analizar la forma de transmisión de esta mutación, el patrón coincide con una forma de herencia dominante, concordando con el patrón reportado para las mutaciones en el gen *SCN4A*. Este caso ilustra que algunas mutaciones en el gen *SCN4A* producen un fenotipo semejante a la enfermedad de Thomsen, lo que puede llevar a equivocaciones hacia dónde dirigir la búsqueda de las mutaciones.

De los 15 individuos analizados en esta familia (fig. 8), II-1 y II-9 presentaban ambas mutaciones (W322X y R1463H), sin embargo, el cuadro clínico de la II-9, no era diferente al resto de los afectados que portaban solo una de estas dos mutación. El individuo III-13 evaluados clínicamente y que resultó afectado, no portaba ninguna de las dos mutaciones, lo que sugiere, la presencia de otra mutación aún no encontrada, efecto de penetrancia incompleta o que ninguna de las mutaciones produzca la enfermedad. En vista de esto, se volvió a revisar las bases de datos y al respecto se encontró que la mutación p. R1463H, se encontraba reportada en Ensembl.org como una variante *missense* y en ExAC browser con una frecuencia muy baja de $6,03 \times 10^{-5}$ en la población de Surasia y $1,511 \times 10^{-5}$ en la población europea no finlandes. Por lo tanto, queda pendiente realizar otros estudios para descartar que sea un polimorfismo.

La muestra CR4 presentó una mutación en el exón 22. La mutación corresponde a una mutación pérdida de sentido (*missense*). Consiste en el cambio de una T en lugar de una C en la posición 3938, lo cual, produce un cambio de aminoácidos en la posición 1313 de la proteína *SCN4A*, en donde una treonina es sustituida por una metionina (c. 3938 C>T, p. T1313M) (ver figura 13). El probando CR4 resultó ser heterocigoto para la mutación.

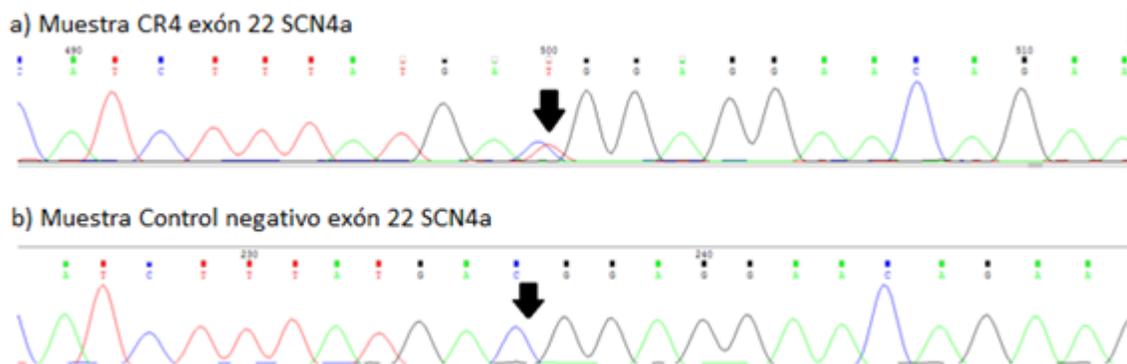


Figura 13. Electroferogramas correspondientes a la secuenciación del exón 22 del gen *SCN4A*. para la muestra CR4. Como se observa, en esta muestra se encontró una variante en la posición 3938, en donde se incorpora una T en lugar de una C, produciendo un cambio en los aminoácidos de treonina por metionina en la posición 1313, la cual corresponde a una mutación tipo *missense* (A). Este cambio no se observa en la muestra control (B). Las flechas indican el lugar donde se encontró la mutación.

Esta mutación se buscó en Ensembl.org para verificar si estaba reportada como SNP; al respecto, se encontró que estaba reportada con el número rs121908547, pero está reportada como una mutación la cual afecta una parte muy conservada del canal (Yang *et al.* 1994). Con el fin de confirmar que esta variante no corresponden a errores en la secuenciación, se procedió a confirmar su presencia en el ADN genómico. Para realizar eso, la región del ADN de interés se amplificó usando el ensayo de la PCR y el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción apropiada para cada caso (cuadro 3). Para este caso, la mutación c.4388G>A, p. T1313M crea un sitio de restricción para la enzima *BccI*. La presencia de la variante fue confirmada en el ADN genómico; el probando resultó ser heterocigoto (Figura 14), lo cual concuerda con los resultados de la secuenciación. Así, este probando resultó ser portador de la mutación en el gen *SCN4A*.

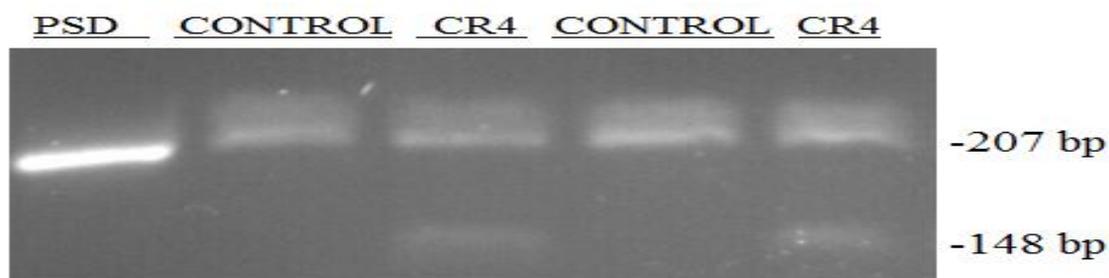


Figura 14. Resultados de la digestión con la enzima *BclI*. En el primer carril se encuentra un producto de PCR sin digerir (PSD). En los carriles dos y cuatro se encuentran controles negativos. En los carriles tres y cinco se puede apreciar la digestión de la muestra CR4. Se puede apreciar en los carriles tres y cinco una banda a la altura de 150bp, no manifestada en los otros carriles lo que comprueba la presencia de la mutación.

El paciente fue referido por presentar miotonía progresiva que empeoraba con el ejercicio, cuando sujetaba objetos con su mano no podía abrir la mano, además de que se cansaba con el ejercicio, presentaba contracturas sin dolor e insomnio, características comunes en la PMC. De hecho, la mutación p.T1313M esta reportada únicamente en la PMC. Así, una vez revisados los datos clínicos y combinados con los datos moleculares obtenidos en esta investigación, podemos decir que el paciente está afectado por la PMC.

Para las cinco variantes encontradas (p.W322X, p.G355R, p.W642C, p.R1463H y p.T1313M), se usaron los programas PolyPhen 2, SNPdrayd y SIFT con el fin de determinar *in silico*, su posible efecto en la función del canal. El análisis mostró que las cinco mutaciones se podrían clasificar como probablemente dañinas, lo que sugiere que la proteína correspondiente podría tener defectos a nivel funcional y así contribuir con la sintomatología de los pacientes.

Posteriormente, con el fin de determinar la conservación de las regiones de la proteína donde se encontraron las variantes génicas identificadas, se realizó un alineamiento de la secuencia de las proteínas codificadas por los genes *CLCN1* y *SCN4A*. Para esto, se usó la secuencia de estas proteínas en diferentes organismos (humano, chimpancé, gato, ratón, orca, perro y vaca) y se utilizaron las herramientas Clustal W Omega y T-Coffee para realizar el alineamiento. El análisis del alineamiento mostró que la ubicación en donde se encuentran todas las mutaciones identificadas en este estudio son zonas muy conservadas (Figura 15). Estos datos sugieren que este cambio podría tener efectivamente, un efecto importante a nivel del funcionamiento de la proteína, lo que podría traducirse en un efecto a

nivel fenotípico y, por consiguiente, ser el responsable de la sintomatología de los pacientes.

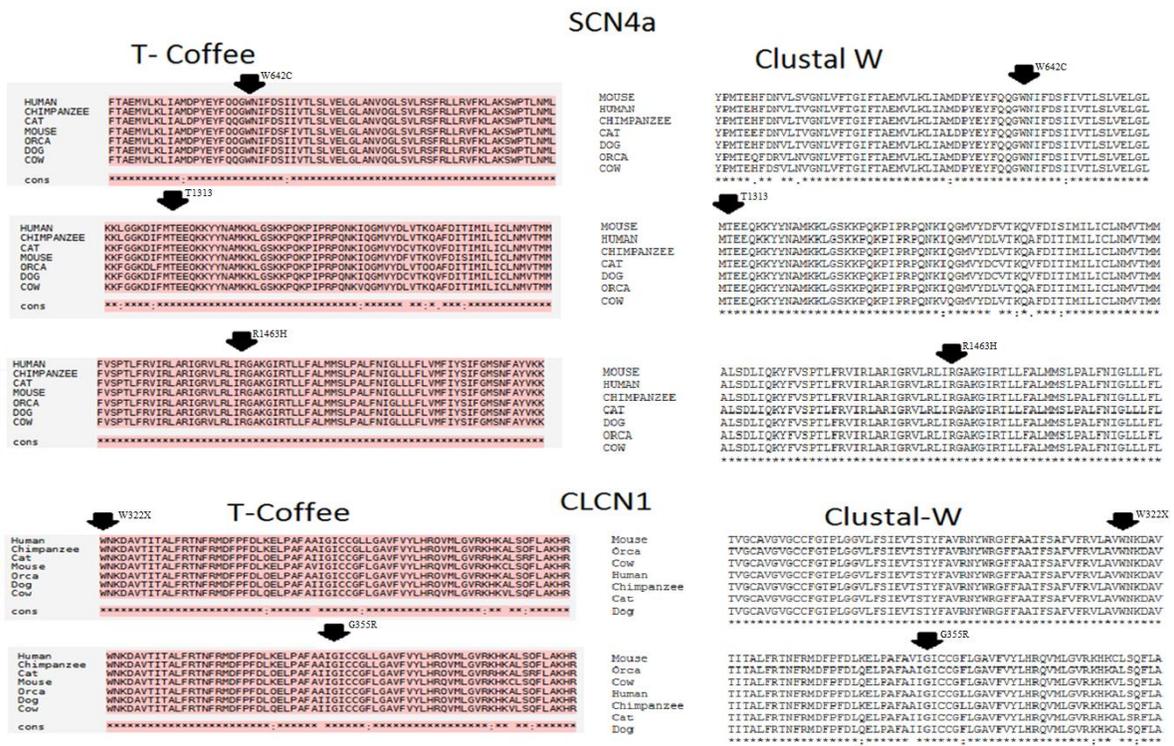


Figura. 15. Resultados de alineamiento de secuencias en los programas T-Coffee y Clustal W Omega. Las secuencias utilizadas fueron de humano, ratón, chimpancé, gato, perro, orca y vaca. Las flechas indican las variantes identificadas en este estudio. De arriba hacia abajo: p. W642C, p. T1313M, p. R1463H, p. W322X y p. G355R. Como se puede ver en todos los casos las sustituciones encontradas afectan aminoácidos muy conservados.

A pesar de encontrar mutaciones en cuatro probandos, todavía quedan 10 probandos en donde no se pudo encontrar ninguna mutación en los genes *CLCN1* y *SCN4A*. Aún así, estos probandos presentan síntomas de miotonía, lo que sugiere la necesidad de estudiar otros genes que podrían estar relacionados con el signo de miotonía; como los otros genes que participan directa o indirectamente en el potencial de acción del músculo esquelético. También, sugiere la necesidad de explorar otros tipos de mutación como duplicaciones o deleciones de los genes *CLCN1* y *SCN4A*, debido a que son un tipo de mutaciones que se han encontrado en algunos individuos afectados con estas enfermedades (Raja *et al.* 2012). Para descartar lo segundo, se procedió a realizar una MLPA en todos los 14 probandos de este estudio. Adicionalmente, se incluyeron todos los probandos (22 en total) identificados hasta el momento con un diagnóstico clínico positivo de una canalopatía miotónica,

independientemente de si la mutación ya había sido identificada o no. Esto por cuanto algunos de los pacientes presentan cuadros clínicos atípicos y este tipo de mutación podría contribuir con la forma como la enfermedad se está presentando en estos pacientes. Sin embargo, el ensayo realizado no identificó la presencia de duplicaciones ó deleciones en ninguna de las muestras en estudio, tanto para el gen *SCN4A* como para *CLCNI*. Este ensayo lo que muestra es una normalización intramuestral seguida de una normalización con referencias normales. Los resultados se expresan en coeficientes de dosificación, que se obtiene de dividir el valor de la muestra sobre el control con un intervalo de confianza, esperándose un valor medio de 1. Valores que salen del rango permitido (0,7 y 1,3) son tomados como indicadores de la presencia de copias aberrantes, por ejemplo, valores de 0,5 indican deleciones y valores superiores a 1,3 indican duplicaciones (Estrada-Juárez *et al.* 2012). La figura 16 muestra el resultado de MLPA para el gen *SCN4A* del canal de sodio donde se observa que, para todas las sondas, los valores detectados de fluorescencia y comparados con una referencia se encuentran en el rango normal permitido de entre 0,7 y 1,3 manteniéndose dentro de los intervalos de confianza permitidos, esto tanto para una de las muestras en estudio (panel superior) como para una muestra control (panel inferior). Para el caso de la sonda de referencia de 490nt, la desviación probablemente se deba a que no hubo hibridación de la sonda con el ADN genómico, esto porque reporta un valor de cero, sin embargo, esta desviación se observa tanto en el control como en la muestra CR2. Por lo tanto, para el gen del canal de sodio se puede concluir que ninguna de las muestras analizadas presenta una duplicación o deleción. La figura 17 muestra el resultado de MLPA para el gen *CLCNI* donde se observa también que, para todas las sondas, los valores detectados de intensidad de fluorescencia y comparados con una referencia se encuentra en el rango de la normal de entre 0,7 y 1,3 manteniéndose dentro de los intervalos de confianza permitidos, esto tanto para una de las muestras en estudio (panel superior) como para una muestra control (panel inferior).

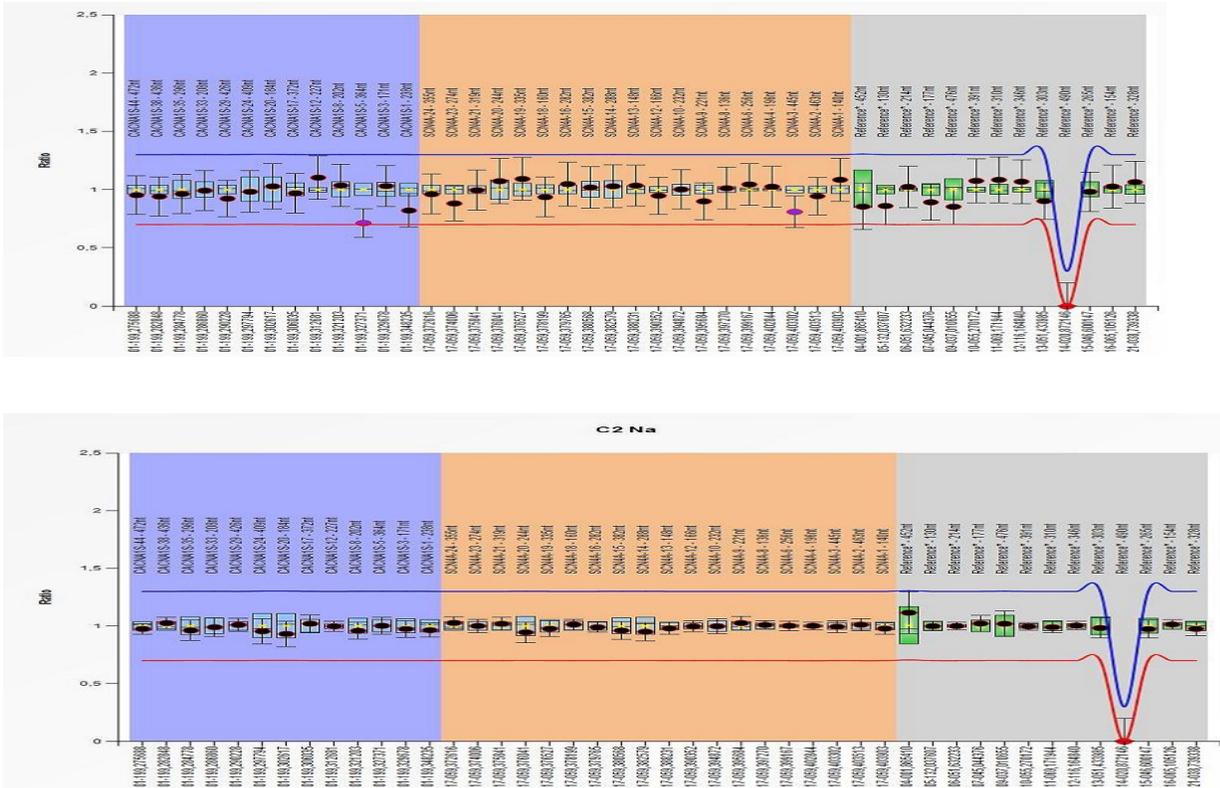


Figura 16. Representación esquemática de la intensidad de sondas relativa obtenida por el análisis de MLPA para el gen *SCN4A* en una muestra diagnosticada con una miotonía hereditaria (panel superior) y un control negativo (panel inferior). El diagrama muestra las sondas hibridadas (cada sonda hibrida una región específica del gen), los valores detectados y comparados con una referencia con un límite inferior de 0,7 (línea roja) y con uno superior de 1,3 (línea azul). La zona de color azul representa a las sondas que hibridan para el gen *CACNAIS* (canal de calcio), en la zona naranja las sondas que hibridan para el gen *SCN4A* y en la zona gris se encuentran sondas de referencia o control interno. Como se puede apreciar en ambas representaciones no hay ninguna sonda que presentara valores fuera del rango, salvo la referencia 490nt, pero esto se debió a que no hubo hidridación, por dar un valor de cero.

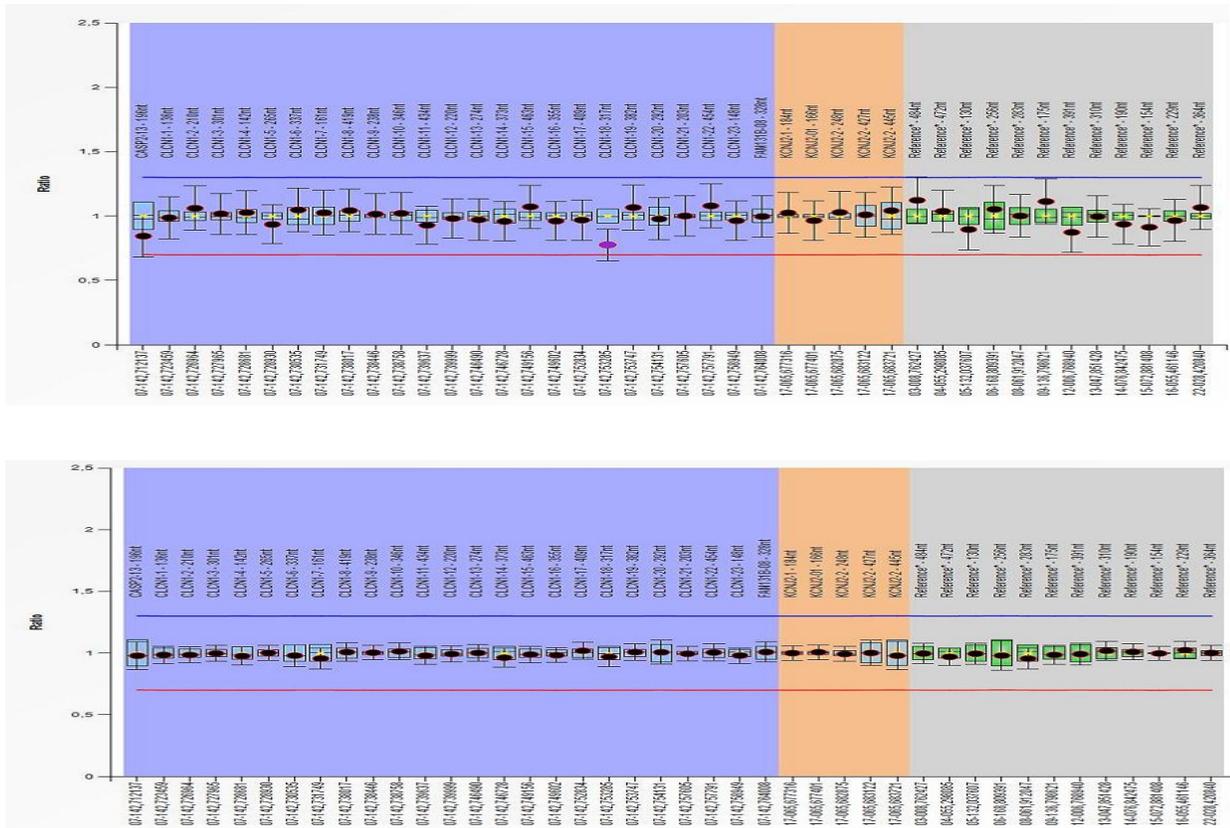


Figura 17. Representación esquemática de la intensidad de sondas relativa obtenida por el análisis de MLPA para el gen *CLCN1* en una muestra diagnosticada con una miotonía hereditaria (panel superior) y un control negativo (panel inferior). El diagrama muestra las sondas hibridadas (cada sonda hibrida una región específica del gen), los valores detectados y comparados con una referencia con un límite inferior de 0,7 (línea roja) y con uno superior de 1,3 (línea azul). La zona de color azul representa a las sondas que hibridan para el gen *CICNI*, en la zona naranja las sondas que hibridan para el gen *KCNJ2* (canal de potasio) y en la zona gris se encuentran sondas de referencia o control interno. Como se puede apreciar en ambas representaciones no hay ninguna sonda que presentara valores fuera del rango.

LIMITACIONES DE LA PRÁCTICA

La mayor limitación presentada fue que no se lograron encontrar las variantes causantes de la enfermedad en 10 probandos. Esto se pudo deber a que podrían encontrarse en otros genes o que se haya dado un mal diagnóstico clínico en algunos de los casos.

La práctica permitió identificar dos variantes (p.W322X y R1463H) que podrían ser causantes de enfermedad pero faltó el análisis a nivel funcional para conocer el efecto que podría tener sobre el canal.

Existió un faltante de información clínica que permitiera tener una mayor claridad en el tipo específico de enfermedad con que se está tratando. Además, en los probandos CR1 y CR4 no se contó con suficiente información familiar para confirmar o conocer con mayor certeza la forma de herencia, dato importante para descartar o confirmar algunas de las enfermedades.

Otra limitante encontrada fue la escasa información sobre las variantes genéticas encontradas, posiblemente por ser mutaciones muy poco comunes de efecto grande o benignas poco frecuentes y las bases de datos no siempre están actualizadas.

En el caso de la mutación W642C se encontró inicialmente en las bases de datos como variante causantes de enfermedad pero al reproducir la investigación se descubre que es una variante que no produce la enfermedad o es neutra, por tanto, se debió cambiar la descripción indicada.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se lograron los objetivos propuestos.
2. A pesar de no encontrar las mutaciones responsables de las canalopatías en algunos de los pacientes en estudio, se lograron secuenciar los exones de los canales de sodio y cloruro; descartando la presencia de mutaciones en estos genes.
3. Se encontraron pacientes portadores de variantes genéticas nuevas y ya reportadas (p.G355R, p.T1313M, p.W322X y p.R1463H) que probablemente sean las responsables de los síntomas de los pacientes, además se logró encontrar que la variante W624C es una variante genética benigna común en la población costarricense y no es causante de enfermedad.
4. La presencia de las mutaciones p. R1463H y p. W322X en una misma familia abre la oportunidad para comparar las características clínicas entre las dos formas.
5. Se recomienda realizar la secuenciación del exoma de los genes *CICN1* y *SCN4A*, cuando se lleven a cabo estudios sobre miotonía no distrófica porque mutaciones en uno de los dos genes puede modificar la expresión clínica y electrofisiológica del otro gen.
6. Es necesario realizar más pruebas en los probandos donde no se encontraron mutaciones, para intentar conocer las causas de la enfermedad. Entre las pruebas que se pueden realizar se recomiendan una reevaluación clínica, y realizar análisis genético de otros genes, ya sea dirigido o secuenciación de todo el exoma o genoma.

REFERENCIAS

- Armijo J., Cuevas I. & Adín J. 2000. Canales Iónicos y Epilepsia. NEUROL. 30: 25-41
- Becker, P.E. 1977. Myotonia Congenita and Syndromes Associated with Myotonia. Thieme, Stuttgart. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1013715/pdf/jmedgene00299-0074b.pdf>
- Brodal P. 2010. The central Nervous system. Oxford. Estados Unidos 606p.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, Sohn R, Zemelman B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, Davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE (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
- Burge J. & M. Hanna. 2012. Novel insights into the pathomechanisms of skeletal muscle channelopathies. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 12:62-69
- Cannon S. 2006. Pathomechanisms in Channelopathies of skeletal muscle and brain. Ann. Rev. neuro. 29: 387-415.
- Cannon S. 2010. Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle. J. Physiol. 588:1887-1895.
- Carrizosa J. 2006. Canalopatías epilépticas. Acta Neurol. Colomb. 22: 118-126.
- Catterall, W.A. 1986. *Molecular properties of voltaje-sensitive sodium channels*. Ann. Rev. Biochem. 55:953-985.
- Chang Y, H. Kuo, K. Hsiao & C Huang. 2007. Phenotypic variability of autosomal dominant miotonía congenital in a Taiwanese family with muscle chloride channel (CLCN1) mutation. Acta Neurol. Taiwan. 16:214-220.
- Cherian A., N. N. Baheti & A. Kuruvilla. 2008. Muscle channelopathies and electrophysiological approach. Ann. Indian. Acad. Neurol. 11:20-27.

- Colding-Jorgensen, E. 2005. Phenotypic variability in myotonia congenital. *Muscle Nerve*. 32:19-34.
- Desaphy, J.F., G. Gramegna, C. Altamura, M.M. Dinardo, P. Imbrici, A.L. George, A. Modoni, M. LoMonaco & D.C. Camerino. (2013). Functional characterization of CLC-1 mutations from patients affected by recessive myotonia congenita presenting with different clinical phenotypes. *Experimental Neurology*, 248, 530–540.
- Deymeer F, F. Lehmann-Horn, P. Serdaroglu, S. Cakirkaya, S. Benz, R. Rüdél & C. Özdemir. 1999. Electrical myotonia in heterozygous carriers of recessive myotonia congenita. *Muscle Nerve*. 21:1334-1337.
- Deymeer, F., S. Cakirkaya, P. Serdaroglu, L. Schleithoff, F. Lehmann-Horn, R. Rüdél & C. Özdemir. (1998). *Transient weakness and compound muscle action potential decrement in miotonía congenital*. *Muscle Nerve* 21: 1334–1337
- Dupre N., N. Chrestian, J. P. Bouchard, E. Rossignol., D. Brunet, D. Sternberg, B. Brais, J. Mathieu & J. Puymirat. 2009. Clinical, electrophysiologic, and genetic study of non-dystrophic myotonia in French-canadians. *Neuromuscul. Disord*. 19:330-334
- Duran C.; C. H. Thompson, Q. Xiao & H. C. Hartzell. 2010. Chloride Channels: Often enigmatic, rarely predictable. *Annu. Rev. Physiol*. 72:95-121.
- Dutzler R., E.B. Campbell, M.Cadene, B.T. Chalt & R. MacKinnon. 2002. X-Ray structure of ClC Chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. 415: 287-294.
- Dutzler R., E.B. Campbell, R. Mackinnon. 2003. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science*. 300:108-112.
- Dutzler R. 2004. The structural basis of ClC chloride channel function. *Trends Neurosci*. 27:315-320
- EEZ. S.f. Manual de secuenciación. Recuperado de <https://www.uco.es/servicios/scai/impresos/GEN/Manual%20de%20Secuenciacion.pdf>

- Estrada-Juárez, H., L. Fernández-Hernández, C. Rivera-Pedroza y P. Grether-González. 2012. MLPA (amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples) en el diagnóstico perinatal rápido de las principales aneuploidías. *Perinatol. Reprod. Hum.* 26:172-179.
- Fialho D., S. Schorge, U. Pucovska, N.P. Davies, R. Labrum, A. Haworth, E. Stanley, R. Sud, W. Wakeling, M:B. Davis, D.M. Kullmann & M.G. Hanna. 2007. Chloride channel miotonía: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions. *Brain.* 130:3265-3274.
- Fialho D., D. M. Kullmann, M.G. Hanna & S. Schorge. 2008. Non-Genomic effects of sex hormones on CLC-1 may contribute to gender differences in myotonía congenital. *Neuromuscular Disorders.* 18:869-872.
- Gao F., F. Chan, Z. Feng, C. Wei, H. Feng, Z. Zhi, Q. Xiang & k. Wen. 2010. Novel Chloride channel gene mutations in two unrelated Chinese families with myotonia congenital. *Neurology India.* 58:743-746.
- Guo XH. WP Wu, YH. Zhang, JP Jia & K. Zhu. (2004). The mutation V781I in SCN4A gene exists in Chinese patients with normokalemic periodic paralysis. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583983>.
- Hayashi K & D.W. Yandell. 2005. How sensitive is PCR-SSCP?. *Human Mutation.* 2:338-346 [ABSTRACT]
- Hayashi K. 2013. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications.* 1:34-38.
- Hayward, L.J., J:S. Kim, M.Y, Lee, H. Zhou, J.W Kim, K. Misra, M. Slajegheh, F.F.Wu, C. Matsuda, V. Reid, D. Cros, E. P. Hoffman, J.M. Renaud, S. C. Cannon & R. Brown. 2008. Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonía and potassium-sensitive weakness. *J.Clin Invest.* 118:1437-1449
- Heatwole C. R. & R.T. Moxley. 2007. The nondystrophic myotonias. *Neurotherapeutic.* 4:238-251.
- Heidari, M.M., M. Khatmi, S. Nafissi, F. Hesami-Zokai & A. Khorrami. (2015). Mutation analysis in exons 22 and 24 of SCN4a gene in Iranian patients with non-dystrophic myotonia. *Iran J. Neurol.* 14:190-194.

- Herranz J. 2002. Canalopatías: un nuevo concepto en la etiología de las epilepsias. *Bol Pediatr.* 42: 20-30.
- Herrera O. 2012. Cómo evaluar un paciente con miotonía. *Acta Med. De Camagüey.* 16:353-368
- Hsiao K.,R. Huang, P. Tang & M. Lin. 2010. Functional study of CLC-1 mutants expressed in *Xenopus Oocytes* Reveals tha a C-termial region Thr891-Ser892-Thr893 is responsible for the effects of protein Kinase Ca activator. *Cell Physiol. Biochem.* 25: 687-694.
- Jorde L. 2011. *Genética médica.* Elsevier. España. 368p.
- Jurkat-Rott K., H. Lerche & F. Lehmann-Horn. 2002. Skeletal muscle channelopathies. *J. Neurol.* 249: 1493-1502.
- Jurkat-Rott K., B. Holzherr, M. Fauler & F. Lehmann-Horn. 2010. Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Eur. J. Physiol.* 460:239-248
- Jurkat-Rott, K., Mitrovic, N., Hang, C., Kouzmekine, A., Iaizzo, P., Herzog, J., Lerche, H., Nicole, S., Vale-Santos, J., Chauveau, D., Fontaine, B., Lehmann-Horn, F. 200.Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 9549-9554.
- Kato H., Y. Kokunai, C. Dalle, T. Kubota, Y. Madokoro, H.Yuasa, Y. Uchida, T. Ikeda, H.Mochizuki, S. Nicole, B. Fontaine, M.Takhashi & S.Mitake. (2016). A case of non-dystrophic myotonia concomitant mutations in the SCN4A and CLCN1 genes. *J.Neurological Sciences.* 369:254-258.
- Klug W., M.R. Cummings y C.A. Spencer. (2006). *Conceptos de genética.* Madrid: Pearson Educacion S.A.
- Koch, MC., K Ricker, M. Otto, F. Wolf, B. Zoll, C. Lorenz, K. Steinmeyer & T.J Jentsch. 1993. Evidence for genetic homogeneity in autosomal recessive generalised myotonia (Becker). *J. Med. Genet.* 30:914-917.

- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschnik K-H, Jentsch TJ (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257: 797-800
- Koty P., E. Pegoraro, G. Hobson, H.G. Marks, A. Turel. D. Flagler, M. Cadaldini, C. Angelini & E.P. Hoffman. 1996. Myotonia and the muscle chloride channel: Dominant mutations show variable penetrance and founder effect. *Neurology* 47:963-968.
- Kubisch C., T. Schmidt-Rose, B. Fontaine, A.H: Bretag & T.J. Jentsh. 1998. CLC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Human. Molecular Genetic.* 7:1753-1760.
- Kwiecinski, H., F. Lehmann-Horn & R. Rüdell. 1988. Drug-induced myotonia in human intercostal muscle. *Muscle & nerve.* 11: 576-581
- Lehmann-Horn, F., V. Mailänder, R. Heine & A. L. George. 1995. Myotonia levior is a chloride channel disorder. 4:1397-1402.
- Lehmann-Horn F. & Jurkat-Rott K. 1999. Voltage-gated ion channel and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79:1317-72
- Mitrovic, N. & H. Lerche. 2000. Channelopathies. Ed. Lehmann-Horn F. & K. Jurkatt-Rott. Elsevier. 384 p.
- Lehmann-Horn F., K. Jurkatt-Rott & R. Rüdell. 2002. *Periodic paralysis: understanding channelopathies.* *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2:61-69.
- Lehmann-Horn F., K. Jurkatt-Rott & R. Rüdell. 2008. Diagnostic and therapy of muscle channelopathies-guidelines of the Ulm Muscle Centre. *Acta Myologica.* 27:98-113.
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293:864-867

- Martínez, M. 2004. Los canales iónicos: la biología y patología. Archivos de Cardiología de México. 74:205-210.
- Matthews, E., D. Fialho, S.V. Tan, S. L. Venance, S.C. Cannon, D. Sternberg, B. Fontaine, A.A. Amatto, R. J. Barohn, R.C. Griggs, M. G. Hanna & the CINCH Investigators. 2010. The non-dystrophic myotonias: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. Brain 133:9-22.
- McClatchey Al., D. Mc Kenna-Yassek, D. Cros, H. Worthen, R. Kunck. 1992. *Novel mutations in families with unusual and variable disorders of the skeletal muscle sodium channel*. Nat. Genet 2:148-152.
- Meola G. 2000. Myotonic dystrophies. Curr. Opin. Neurol. 13: 519-525
- Meola G., M.G. Hanna & B. Fontaine. 2009. Diagnosis and new treatment in muscle channelopathies. JNNP. 80:360-365.
- Morales, F., P. Cuenca, G. del Valle, R. Brian, M. Sittenfeld, O. Montoya, T. Ashizawa, A. Rosa y K. Johson. 2003. Miotonía congénita: caracterización clínica de una familia costarricense afectada por la enfermedad de Thomsen. Nereoje. 17:82-86.
- Morales, F. y P. Cuenca. 2004. Aspectos genéticos y moleculares de las enfermedades miotónicas. Rev. Neurol. 38: 668-674.
- Morales, F., P. Cuenca, G. del Valle, M. Vásquez, R. Brian, M. Sittenfeld, K. Jonson, X. Lin&T. Ashizawa. 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.
- Mori, Y., S.Yamashita, M. Kato, T. Masuda, K. Takamatsu, T.Kumamoto, R. Sasaki &Y. Ando. 2016. Thomsen disease with ptosis and abnormal MR findings. Neuromucular disorders. 26:805-808
- Moyes, C.D. y P.M. Schultes. 2007. Principios de fisiología animal. Pearson Education.776 p.

- Nagamitsu S., T Matsuura, M. Khajavi, R. Armstrong, C. Gooch, Y. Harati & T. Ashizawa. 2000. A “dystrophic” variant of autosomal recessive myotonia congenital caused by novel mutations in the *CLCN1* gene. *Neurology*. 55:1697-1703.
- Platt D. & R. Griggs. 2009. Skeletal muscle channelopathies: new insights into the periodic paralyses and nondystrophic miotonías. *Curr. Opin. Neurol*. 22:524-531.
- Plassart-Schiess, E., A. Gervais, B. Eymard, A. Lagueny, J. Pouget, J.M.Warter, M. Fardeau, T.J. Jentsch & B. Fontaine. 1998. Novel muscle chloride channel (*CLCN1*) mutations in miotonía congenital with various modes of heritance including complete dominance and penetrance. *Neurology*. 50:1176-1179.
- Push, M. (2002). Myotonia Caused by Mutations in the Muscle Chloride Channel Gene *CLCN1*. *Hum. Mut.* 19:423-434.
- Push, M., K. Steinmeyer, M. Koch, T.J. Jentsch. 1995. Mutations in dominant human myotonia congenital drastically alter the voltage dependence of CLC-1 chloride channel. *Neuron*. 15:1455-1463.
- Raja, D.L., A. Haworth, R. Sud, E. Matthews, D. Fialho, J. Burge, S. Portaro, S. Schorge, K. Tuin, P. Lunt, M. McEntagart, A. Toscano, M.B. Davis & M.G. Hanna. 2012. A new explanation for recessive myotonia congenital. Exon deletions and duplications in *CLCN1*. *Neurology*. 78:1953-1958.
- Ruggiere V.L. y C.L. Arberas. 2002. Canalopatías hereditarias neuromusculares: miotonías no distróficas, paramiotonías y parálisis periódicas. *Rev. Neurol*. 34:150-156
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sansone V.A., C. Ricci, M. Montanari, G. Apolone, M. Rose & G. Meola. 2012. Measuring quality of life impairment in skeletal muscle channelopathies. *Eur. J. Neurol*. 19:1470-1476.

- Sasaki, R. M.P. Takahashi, Y. kokunai, M. Hirayama, T. Ibi, H Tomimoto, H. Mochizuki & K. Sahashi. 2013. Compound heterozygous mutations in the muscle chloride channel gene (CLCN1) in a Japanese family with Thomsen's disease. *Rinsho Shinkeigaku*. 53:316-319.
- Shalata, A., H. Furman, V. Adir, N. Adir, Y. Hujeirat, S. A. Shalev & Z.U. Borochowitz. 2010. Myotonia congenit in a large consanguineous arab family: insight into the clinical spectrum of carriers and double heterozygotes of a novel mutation in the chloride channel CLCN1 gene. *Muscle & Nerve*: 41:464-469
- Solís H., E. López-Hernández y D. Cortés-García. 2008. La excitabilidad neuronal y los canales de potasio. *Arch. Neurocién*. 13:195-201.
- Statland J., Y. Wang, R. Richesson, B. Bundy, L. Herbelin, J. Gomes, J. Trivedi, S. Venance, A. Amato, M. Hanna, R. Griggs, R. Barohn & CINCH Consortium. 2011. An interactive voice response diary for patients with nondystrophic myotonia. *Muscle Nerve* 44:30-35.
- Steinmeyer K., R. Klocke, C. Ortland, M. Gonemeier, H. Jockusch, S. Gründer & T.J. Jentsch. 1991. Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 354: 304-308.
- Steinmeyer K., C. Lorenz, M. Pusch, M C. Koch & T.J. Jentsch. 1994. Multimeric structure of CLC-1 chloride channel revealed by mutations in dominat miotonía congenital (Thomsen). *EMBO*. 13:737-743.
- Struyk A. & S. Cannon. 2006. Non-dystrophic myotonias and periodic paralyses. In. Lynch D (ed) *Neurogenetics Scientific and Clinical Advances*. Taylor and Francis, NY. Pp 179-210.
- Sun C. , L. Tranebjaerg, T. Torbergesen, G. Holmgren& M. Van Ghelue. 2001. Spectrum of CLCN1 mutations in patients with miotonía congenital in Northern Scandinavia. *European J. H. Genetic*. 9: 903-909.
- Tang C. & Chen T.Y. 2011. Physiology and Pathophysiology of CLC-1: Mechanisms of a Chloride Channel Disease, Myotonia. *J.Biomed.Biotechnol*. 2011:1-10.
- Tawil R., Griggs & R, Rose. 2000. *Channelopathies*. En Pulst S, ed. *Neurogenetics*. New York: Oxford University Press.

- Thomas J., J. Tarleton & S. K. Baker. 2008. Recessive *CLCN1* mutation presenting as Thomsen disease. *Muscle Nerve*. 38:1515-1517.
- Venance, S. L., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., Tawil, R. SCN4A-associated hypokalemic periodic paralysis merits a trial of acetazolamide. *Neurology* 63: 2004.
- Vicart, S. D. Sterberg, M. Arzel-Hérode, J. Franques, S. Bendahhou, P. Lory, B. Hainque, E. Fournier, S. Nicole & B Fontaine. 2002. Hypokalemic Periodic Paralysis. *GeneReviews*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1338/>.
- Vilchez, J. 2016. *Canalopatías Musculares*. Recuperado de http://www.neuromuscularbcn.org/wp-content/uploads/2016/05/Canalopati%CC%81as-Musculares_Curso-neuromuscular_2016.pdf
- Vindas-Smith, R., M. Fiore, M. Vásquez, P. Cuenca, G. del Valle, L. Lagostena, H. Gaitán- Peñas, R. Estevez, M. Pusch y F. Morales. 2015. Identification and functional characterization of *CLCN1* mutations found in nondystrophic myotonia patients. *Human mutations*. 37:74-83.
- Yang, N., S. Ji, M. Zhou, L. Ptáček, R.L. Barchi, R. Horn & A.L. George. 1994. Sodium channel mutations in paramyotonia congenital exhibit similar biophysical phenotypes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91:12785-12789.
- Zao, P., T. Stabler, L. Smith, A. Lokuta y E. Griff. 2012. *Simulaciones de laboratorio de fisiología*. Pearson. España. 218p.
- Zhang J., S. Bendahhou, M.C. Sanguinetti, & L.J. Ptáček. 2000. Functional consequences of chloride channel gen (*CLCN1*) mutations causing myotonia congenital. *Neurology*. 54: 937-941.
- Zielonka D., K. Jurkat-Rott, P. Stachowiak, A. Bryl, J.T. Marcinkowski & F. Lehmann-Horn. 2012. A Becker myotonia patient with compound heterozygosity for *CLCN1* mutations and Prinzmetla angina pectoris. *Neuromuscular Disorders*. 22: 355-360.

ANEXO

Tabla. Probemix de SALSA MLPA P397 SCN4A-CACNA15

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	SCN4A	CACNA1S
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 00797-L13645	5q31		
136	SCN4A probe 16602-L19132		Exon 8	
141	SCN4A probe 16603-L19133		Exon 1	
148	SCN4A probe 16604-L19134		Exon 13	
154 *	Reference probe 17907-L22212	8p21		
160	SCN4A probe 16606-L19136		Exon 18	
166	SCN4A probe 16607-L19137		Exon 12	
172 ‡	CACNA1S probe 21100-L29489			Exon 3
177	Reference probe 04359-L03779	7p13		
184	CACNA1S probe 16608-L19138			Exon 20
196	SCN4A probe 16610-L19140		Exon 4	
202	CACNA1S probe 16611-L19141			Exon 8
208	CACNA1S probe 16612-L19142			Exon 33
214	Reference probe 10695-L11277	6p12		
221	SCN4A probe 16613-L19143		Exon 9	
226	CACNA1S probe 16614-L21583			Exon 12
234	SCN4A probe 16615-L22853		Exon 10	
238	CACNA1S probe 16616-L19146			Exon 1
244	SCN4A probe 16617-L19147		Exon 20	
256	SCN4A probe 16618-L19148		Exon 6	
265	Reference probe 02454-L01898	15q21		
274	SCN4A probe 16619-L19149		Exon 23	
282	SCN4A probe 16620-L19150		Exon 16	
288	SCN4A probe 16622-L21584		Exon 14	
296	CACNA1S probe 16621-L21585			Exon 35
303	Reference probe 03242-L19700	13q14		
319	SCN4A probe 16623-L19153		Exon 21	
328	Reference probe 02833-L02262	21q22		
335	SCN4A probe 16624-L19154		Exon 19	
346	Reference probe 09722-L10072	12q24		
355	SCN4A probe 17933-L22239		Exon 24	
364	CACNA1S probe 16627-L19157			Exon 5
372	CACNA1S probe 16628-L19158			Exon 17
382	SCN4A probe 16629-L19159		Exon 15	
391	Reference probe 08792-L08816	10q21		
408	CACNA1S probe 17931-L22237			Exon 24
427	CACNA1S probe 17932-L22854			Exon 29
436	CACNA1S probe 16633-L19163			Exon 38
445	SCN4A probe 16634-L19164		Exon 3	
452	Reference probe 10633-L15190	4p16		
463	SCN4A probe 16635-L19165		Exon 2	
472	CACNA1S probe 16636-L19166			Exon 44
481	Reference probe 16063-L18237	9p13		
490	Reference probe 14883-L22098	14q11		

* New in version A2 (from lot A2-0716 onwards).

‡ Changed in version A2 (from lot A2-0716 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

Fuente: Descripción de sondas del kit SALSA MLPA P397 SCN4A-CACNA15. Tomado de <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF%5CE%5Ct9bmuxqlhe/Lgqf%5Ck8Hkjuss%7C&ProductOID=ADL8MV%5Cak48%7C>

Tabla. Probemix de SALSA MLPA 350 CLCN-1–KCNJ2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	CLCN1	KCNJ2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 00797-L13645	5q31		
136	CLCN1 probe 13956-L15525		Exon 1	
142	CLCN1 probe 13959-L15528		Exon 4	
148 ◀	CLCN1 probe 13978-L15547		Exon 23	
154	Reference probe 08375-L08229	15q24		
161	CLCN1 probe 14650-L20767		Exon 7	
166 ●	KCNJ2 probe 17294-L21186		Exon 1	
175	Reference probe 10416-L12862	9q34		
184 ●	KCNJ2 probe 13979-L15548		Exon 1	
190	Reference probe 12422-L13423	14q24		
196 →	CASP2 probe 17295-L20777		upstream	
203 ±	CLCN1 probe 13976-L20768		Exon 21	
210	CLCN1 probe 13957-L15526		Exon 2	
220 ✕	CLCN1 probe 17296-SP0473-L20778		Exon 12	
229	Reference probe 15522-L17377	16q13		
238	CLCN1 probe 13964-L15533		Exon 9	
248	KCNJ2 probe 13980-L15549		Exon 2	
256	Reference probe 09380-L17664	6q27		
265 ±	CLCN1 probe 13960-L15529		Exon 5	
274	CLCN1 probe 13968-L15537		Exon 13	
283	Reference probe 06754-L06358	8q12		
292	CLCN1 probe 13975-L15544		Exon 20	
301	CLCN1 probe 13958-L15527		Exon 3	
317 ✕	CLCN1 probe 17298-SP0474-L21318		Exon 18	
328 → ◀	FAM131B probe 17297-L20779		downstream	
337	CLCN1 probe 13961-L20766		Exon 6	
346	CLCN1 probe 13965-L15534		Exon 10	
355	CLCN1 probe 13971-L15540		Exon 16	
364	Reference probe 01580-L01152	22q12		
373	CLCN1 probe 14538-L15538		Exon 14	
382	CLCN1 probe 13974-L15543		Exon 19	
391	Reference probe 12235-L13163	12p13		
409	CLCN1 probe 13972-L15541		Exon 17	
419 ±	CLCN1 probe 13963-L21284		Exon 8	
427	KCNJ2 probe 13981-L15550		Exon 2	
434	CLCN1 probe 13966-L15535		Exon 11	
445	KCNJ2 probe 17300-L20782		Exon 2	
454 ◀	CLCN1 probe 13977-L15546		Exon 22	
463	CLCN1 probe 13970-L15539		Exon 15	
472	Reference probe 12761-L13877	4q12		
484	Reference probe 09682-L10062	3p25		

± SNP rs77199385 (203 nt), c.568_569delinsTC (265 nt) and rs118066140 (419 nt) could influence the probe signal. In case of apparent deletions, it is recommended to sequence the region targeted by this probe.

◀ This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

✕ This probe consists of three parts and has two ligation sites.

→ Flanking probe. Included to facilitate the determination of the extent of a deletion/duplication. Copy number alterations of flanking and reference probes are unlikely to be related to the condition tested.

● The significance of exon 1 deletions is not clear as this exon is non-coding and alternative transcript variants using other transcription start sites are known.

Fuente: Descripción de sondas del kit SALSA MLPA 350 CLCN-1–KCNJ2. Tomado de http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=_tz2fAPIupKyMjADF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID=_aiWUKQJimDU.

Tabla Descripción de sondas para SCN4a

Length (nt)	SALSA MLPA probe	SCN4A exon	Ligation site NM_000334.4	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>78-80 (exon 1)</i>		
141	16603-L19133	Exon 1	80-81	GATGCGAGGATG-GCCAGACCATCT	0.4 kb
463	16635-L19165	Exon 2	365-366	TTCATCGTACTC-AACAAGGCAAG	0.2 kb
445	16634-L19164	Exon 3	24 nt before exon 3	CTAGCTGCTTCC-TCACTTTCCTTG	0.5 kb
196	16610-L19140	Exon 4	626-627	GGCTTCTGTGTC-GACGACTTCACA	3.7 kb
256	16618-L19148	Exon 6	1026-1027	ACGGCAATGACT-CATGGTATGCCA	1.9 kb
136	16602-L19132	Exon 8	1215-1216	TCAAGACCGGGC-GGAACCCCAACT	1.6 kb
221	16613-L19143	Exon 9	1365-1366	TCTTCGTGGTCA-TCATCTTCCTGG	0.8 kb
234	16615-L22853	Exon 10	1541-1542	GCCAAGGCCGCC-CAAGCTCTGGAA	4.5 kb
166	16607-L19137	Exon 12	2064-2065	TGGCCAACGTAC-AGGGACTGTCTG	2.1 kb
148	16604-L19134	Exon 13	2447-2448	GTCATCGGCAAT-CTTGTGGTGAGT	5.7 kb
288	16622-L21584	Exon 14	2832-2833	TCAACAACCCT-ACCTGACCATAC	2.0 kb
382	16629-L19159	Exon 15	2951-2952	CAGCCTCTCTAT-GATGGAACTCG	0.8 kb
282	16620-L19150	Exon 16	3125-3126	CGTGGGAAGAAG-TGGTGGACTCTG	1.6 kb
160	16606-L19136	Exon 18	3425-3426	GTGGCCAACCTGG-CTGGGCTACTCG	1.7 kb
335	16624-L19154	Exon 19	3685-3686	CATCTCCGAGGT-CAACAACAAGTC	0.5 kb
244	16617-L19147	Exon 20	23 nt after exon 20	TCGCTGAGATGT-GGCTGGTGAGCG	0.2 kb
319	16623-L19153	Exon 21	3866-3867	GAGGAGCAGCCG-CAGTACGAGGTG	1.8 kb
274	16619-L19149	Exon 23	4234-4235	GGACATCCTGTA-CAACATCAACAT	1.4 kb
355	17933-L22239	Exon 24	4794-4795	GCAACCCCTCCA-TCGGCATCTGCT	
		<i>stop codon</i>	<i>5586-5588 (exon 24)</i>		

The **NM_000334.4** sequence is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.

Fuente: Descripción de sondas del kit SALSA MLPA P397 SCN4A-CACNA15. Tomado de <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF%5CE%5Ct9bmuxqlhe/Lgqf%5Ck8Hkjuss%7C&ProductOID=ADL8MV%5Cak48%7C>

Tabla Descripción de sondas para CLCN1

Length (nt)	SALSA MLPA probe	CLCN1 exon	Ligation site NM_000083.2	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
196 →	17295-L20777		CASP2 gene	ACTTATCAAGGA-TCGGGAAGGTTA	11.3 kb
		<i>start codon</i>	<i>88-90 (exon 1)</i>		
136	13956-L15525	Exon 1	159-158 reverse	TCAAAGGGCATA-TACTGGTACTGG	3.5 kb
210	13957-L15526	Exon 2	291-292	CACAAAGAACAA-TTCTCAGACAGG	1.0 kb
301	13958-L15527	Exon 3	503-504	GGACTACGTCAG-TGCCAAAAGCCT	0.7 kb
142	13959-L15528	Exon 4	647-648	TCCCCAGGCTGT-TGGTGAGAACTT	0.2 kb
265 ±	13960-L15529	Exon 5	675-676	GAAATGAAGACA-ATACTTCGTGGG	1.6 kb
337	13961-L20766	Exon 6	835-834 reverse	GAACACAGACAT-GAATTTGCTGAG	1.2 kb
161	14650-L20767	Exon 7	87 nt after exon 7 reverse	AGTAACCTGGTA-ATACCAGCACTT	6.3 kb
419 ±	13963-L21284	Exon 8	999-1000	AACTACTGGAGA-GGATTCTTTGCA	0.4 kb
238	13964-L15533	Exon 9	1094-1095	GTTCAGAACCAA-TTCCGAATGGA	0.3 kb
346	13965-L15534	Exon 10	1188-1187 reverse	TGGCGATGCAGA-TACACAAATACA	0.9 kb
434	13966-L15535	Exon 11	1285-1286	TTGTTACCTTTG-TCATTGCCTCAT	0.4 kb
220 ✕	17296-SP0473-L20778	Exon 12	1425-1426; 1453-1454	CTGGGCCAGTCA-28 nt spanning oligo-TTGTCATCATCA	6.5 kb
274	13968-L15537	Exon 13	1548-1547 reverse	CCTAGCACAAAC-ACAGGCATGAAG	0.2 kb
373	14538-L15538	Exon 14	1589-1590	GGTAGGAGAAAT-CATGGCCATGCT	2.4 kb
463	13970-L15539	Exon 15	1722-1721 reverse	AATTCGAAGCAA-ATCACAGCTGTG	0.4 kb
355	13971-L15540	Exon 16	1952-1951 reverse	GCAACTCCCCAT-ATGTGTAAGAAG	3.2 kb
409	13972-L15541	Exon 17	2142-2143	TCGGAGCTGCCT-TACGACGGGAAG	0.5 kb
317 ✕	17298-SP0474-L21318	Exon 18	2289-2288; 24 nt before exon 18 reverse	GGGGCAGTAGTA-53 nt spanning oligo-AGCCTGGGAGCA	0.5 kb
382	13974-L15543	Exon 19	5 nt before exon 19 reverse	TTTGACCTGAGA-GGACAGGTGAGT	0.4 kb
292	13975-L15544	Exon 20	2488-2489	TGTCACCTGAAG-AGGTGAGTAAGG	3.5 kb
203 ±	13976-L20768	Exon 21	2537-2538	TGTCTGTTTTGA-TTCCTGCTGTAT	0.2 kb
454 *	13977-L15546	Exon 22	2635-2636	TCCACCTCGCTT-ACGTGACCAGCA	1.2 kb
148 *	13978-L15547	Exon 23	2855-2854 reverse	GGGAGGCAGCAA-TCACATCCCCTG	5.1 kb
		<i>stop codon</i>	<i>3052-3054 (exon 23)</i>		
328 → *	17297-L20779		FAM131B gene	AGAGTATCCTGA-AGCTGGTTGGGA	

± SNP rs77199385 (203 nt), c.568_569delinsTC (265 nt) and rs118066140 (419 nt) could influence the probe signal. In case of apparent deletions, it is recommended to sequence the region targeted by this probe.

* This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

✕ This probe consists of three parts and has two ligation sites.

→ Flanking probe. Included to facilitate the determination of the extent of a deletion/duplication. Copy number alterations of flanking and reference probes are unlikely to be related to the condition tested.

Fuente: Descripción de sondas del kit SALSA MLPA 350 CLCN-1-KCNJ2. Tomado de

http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe_Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= aiWUkOJimDU.