



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES INFRECIENTES EN EL GEN *DMD* DE  
PACIENTES CON Distrofinopatías, A TRAVÉS DE AMPLIFICACIÓN  
MÚLTIPLE DE SONDAS LIGADAS (MLPA) Y SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CRUZ MIRANDA GABRIELA MARISOL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANGÉLICA GONZÁLEZ OLIVER**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN

**MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES INFRECIENTES EN EL GEN *DMD* DE  
PACIENTES CON DISTROFINOPATÍAS, A TRAVÉS DE AMPLIFICACIÓN  
MÚLTIPLE DE SONDAS LIGADAS (MLPA) Y SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CRUZ MIRANDA GABRIELA MARISOL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANGÉLICA GONZÁLEZ OLIVER**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

**DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN

**MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de septiembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CRUZ MIRANDA GABRIELA MARISOL** con número de cuenta **305255091**, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES INFRECÜENTES EN EL GEN *DMD* DE PACIENTES CON DISTRÓFINOPATÍAS, A TRAVÉS DE AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS LIGADAS (MLPA) Y SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA**", realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**:

Presidente: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN  
Vocal: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ  
Secretario: DRA. ANGÉLICA GONZÁLEZ OLIVER  
Suplente: DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES  
Suplente: DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 13 de octubre de 2016

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos:**

Primeramente al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad de pertenecer a la comunidad de alumnos del Posgrado y las facilidades al utilizar sus instalaciones.

Continuando el agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el apoyo proporcionado.

El presente trabajo se derivó del protocolo de investigación con número de registro 068/2015 ante los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Pediatría y se realizó con fondos provenientes de los Recursos Fiscales 2015-2016 (Programa E022 Investigación y Desarrollo Tecnológico en Salud). Modalidad A.

Agradezco finalmente el apoyo ofrecido por mi comité Tutorial, sus comentarios en cada reporte de semestre, sus ideas para con mi proyecto y sus ánimos.

## **Agradecimientos Personales**

Agradecimiento especial a las familias que voluntariamente participaron en la realización de este proyecto de investigación.

Merece un agradecimiento especial mi tutor de tesis el Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza por brindarme su tiempo y abrirme las puertas del laboratorio desde el primer momento. Por demostrarme la confianza de continuar con un proyecto que él mismo adoptó siendo estudiante y confiar en mi para llevar a cabo este trabajo. Muchas gracias Doctor Miguel, por tenerme paciencia y por guiarme por mi vida de investigadora con todas las herramientas con las que cuenta, por estar disponible siempre y por aceptarme como su alumna a pesar de las múltiples tareas y obligaciones con las que usted ya cuenta.

Muchas gracias también por identificar mis fallas y hacérmelas saber como el líder de este laboratorio que es, con el ánimo de reconocerlas y trabajar en ellas poniendo mayor atención y más entusiasmo, ojalá todo investigador novato tenga la maravillosa experiencia que tuve yo al contar con una persona tan inteligente y capaz de tutor que los guíe en su inicio a la investigación.

## **Dedicatoria**

Le dedico este trabajo de tesis a mi familia, comenzando con mis padres sin cuyo apoyo y muestras de amor constantes ninguno de mis logros, incluido éste, serían posibles. Gracias por la paciencia que han tenido conmigo a lo largo de mi vida, por el amor que me demuestran a diario, por todos los sacrificios y esfuerzos que han hecho sin pensarlo dos veces en pro de mi bienestar, una vida entera de logros no me va a alcanzar para recompensar el trabajo tan bueno que han hecho en mi, por que sin duda alguna de no ser por ustedes, mi existencia no sería posible. Especialmente gracias infinitas por el honor que me dieron de ser la hermana mayor de Ana Carolina, es el mejor regalo de vida que pudieron darme, la oportunidad de crecer a su lado y aprender juntas es invaluable, es por eso que esta tesis también tiene una especial dedicatoria a ella.

Ana, más que mi hermana y mi cómplice, siempre has sido mi compañera de vida, mi mejor amiga y mi mejor consejera, de no ser por ti habría perdido el sentido de vivir hace mucho tiempo, ser tu hermana mayor es de las mejores experiencias que he tenido y mi mayor logro hasta el momento es ser merecedora de tu cariño, de tu confianza y tu admiración. Mi mayor reto por el momento es seguir siendo una buena influencia en ti, en tu vida y es por eso que cada logro mío es compartido contigo, porque de alguna manera sutil siempre estaremos conectadas y seguiremos influyendo una en la otra a pesar de los kilómetros de distancia que nos separen, te amo.

Esta tesis también va dedicada al resto de mi familia, comenzando con mis abuelitos quienes son para toda la familia una fuente inagotable de amor y de conocimientos, en ellos mis padres han encontrado el apoyo para que esta familia sea lo que es. Quiero dedicarle esta tesis también a mis primos y primas, que sepan que cualquier objetivo puede ser alcanzado si se cuenta con la perseverancia suficiente, y que la edad no importa en absoluto cuando se busca la superación personal.



# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>5</b>
Distrofias Musculares .....	5
Estructura del músculo.....	5
Clasificación de las Distrofias Musculares .....	7
Distrofinopatías.....	11
El gen <i>DMD</i> y su producto .....	12
Génesis y tipo de mutaciones en el gen <i>DMD</i> .....	13
Diagnóstico Molecular de distrofinopatías .....	13
Importancia de las terapias moleculares basadas en genotipo en pacientes con distrofinopatías.....	16
<b>Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>20</b>
Objetivo General.....	20
Objetivos particulares .....	20
Objetivos secundarios .....	20
<b>Clasificación de la Investigación</b> .....	<b>21</b>
Población de estudio. ....	21
Criterios de Selección .....	21
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>22</b>
Preparación de las muestras de ADN.....	24
Ensayo de MLPA.....	25
Ensayo de Secuenciación automatizada tipo Sanger .....	30
<b>Resultados</b> .....	<b>36</b>
Datos clínicos y de laboratorio/gabinete de los pacientes seleccionados .....	36
Fase I del estudio molecular: Amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA) para el estudio de DPI infrecuentes y duplicaciones en el gen <i>DMD</i> .....	38
Fase II del estudio molecular: Secuenciación automatizada tipo Sanger para el estudio de variantes puntuales, microdelecciones/microinserciones en el gen <i>DMD</i> .....	52
<b>Discusión</b> .....	<b>58</b>
<b>Limitaciones del estudio.</b> .....	<b>64</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>65</b>
<b>Literatura Citada</b> .....	<b>66</b>

## Resumen

El Instituto Nacional de Pediatría (INP) es un centro de referencia para el diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de pacientes con trastornos neuromusculares; de éstos, las distrofinopatías, entidades con herencia ligada al cromosoma X, son las más frecuentes en pacientes pediátricos con una incidencia de 1 afectado en 3,600- 6,000 varones recién nacidos vivos. En el Laboratorio de Biología Molecular (LBM) de dicho Instituto se tienen captadas más de 400 familias no relacionadas (periodo 1992-2016) con diagnóstico presuntivo de distrofias musculares del tipo Duchenne/Becker (DMD/B, MIM #310200, #300376), en las cuales hasta el momento se han identificado únicamente deleciones parciales intragénicas (DPI) del gen *DMD* (Xp21.2-p21.1, MIM \*300377) en el 47.6% de ellas a través de un ensayo de PCR múltiple (mPCR) de 22 exones. Sin embargo, es necesario identificar la mutación responsable para la confirmación del diagnóstico molecular, en cerca de 220 familias que no presentaron DPI a través de ésta metodología. Además de la confirmación diagnóstica y de la predicción del fenotipo, la identificación del genotipo es imprescindible para brindar asesoramiento genético, diagnóstico prenatal y eventualmente clasificar al paciente para que acceda a alguna de las terapias moleculares basadas en genotipo [1]. Así, en México aún no se ha definido la proporción de DPI infrecuentes que ocurren fuera de los sitios con mayor frecuencia de mutaciones (e.g *hot-spots*), ni el espectro de mutaciones pequeñas heterogéneas sólo identificables a través de la secuenciación completa del gen *DMD*. Por lo tanto, con el presente proyecto a través de la amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA) y secuenciación automatizada tipo Sanger se pretende incrementar la identificación de los genotipos causales y con ello contribuir a delinear el espectro mutacional de las distrofinopatías en pacientes mexicanos.

**Objetivo:** Caracterizar el genotipo de *DMD* responsable a través de MLPA y secuenciación automatizada completa tipo Sanger en pacientes con diagnóstico presuntivo de DMD/B con estudio negativo a DPI por mPCR de 22 exones.

**Material y métodos:** Estudio descriptivo, observacional, transversal y ambispectivo. Se incluyeron a pacientes con historia clínica presuntiva de DMD/B cuyas muestras de DNA se tienen bajo resguardo en el LBM. Sólo se incluyeron a pacientes con estudio de mPCR negativos a DPI en 22 exones (Pm1, 3, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 43 al 45, 47 al 55 y 60). La búsqueda de DPI infrecuentes y duplicaciones del gen *DMD* se realizó mediante MLPA con el kit SALSA MLPA probemixes P034/P035 DMD (No. Cat. P034-50 y P035-50, MRC-Holland). Los pacientes que resultaron negativos al análisis con MLPA pasaron a la etapa de análisis por secuenciación automatizada directa de los 79 exones codificantes del gen *DMD*, a través de la generación de 78 amplicones por paciente. Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación mediante la reacción de BigDye Terminator (Applied Biosystems) a través del servicio ofrecido por la compañía MACROGEN USA Corp. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias genómica (NG\_012232.1) y de ARNm (NM\_004006.2) de referencia con el programa CodonCode Aligner®. Los cambios identificados se consultaron en la literatura y en las bases de datos del HGMD ([www.hgmd.org/](http://www.hgmd.org/)), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), LOVD ([www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)) y ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) para identificar si se encontraban descritas previamente como mutación patogénica o polimorfismo. En las familiares femeninas de primer grado de los casos afectados en quienes se identificó un genotipo *DMD* diagnóstico de distrofinopatía se realizó la búsqueda dirigida de la mutación por MLPA o secuenciación automatizada.

**Resultados:** Se incluyeron 70 pacientes en la fase de MLPA, de los cuales se eliminaron 2 por resultar con complemento sexo-cromosómico XX confirmado por la ausencia del gen *SRY* mediante PCR punto final por lo que se describen a continuación los resultados de 68 pacientes. En 5 pacientes (7.3%, n=5/68) se encontraron DPI de las cuales dos fueron de un solo exón (40%, n=2/5) y se corroboraron por PCR punto final; las otras tres (60%, n=3/5) no requirieron confirmación ya que fueron DPI de exones contiguos (DMD-386 exones 7-9, DMD-1302 exones 22-29 y DMD-1355 exones 31-43). Se identificaron duplicaciones en 11 pacientes (16.17%, n=11/68) de las cuales 6 involucraban un solo exón; 3 de ellas fueron confirmadas por PCR tiempo real (las 3 restantes se encuentran pendientes de confirmación) y un rearrreglo complejo que involucró dos duplicaciones de exones no contiguos (exones 45-50 y exones 63-79). Se identificó una aparente DPI del exón 21 por MLPA cuya corroboración por PCR punto final reveló la presencia de la variante c.2707G>T; g.32485015C>A; p.(Gly903\*) que se ubica en el sitio de ligación de la sonda de MLPA. El estudio de madres portadoras fue posible en 13 familias (4 pacientes con DPI y 9 con duplicaciones). El estado de portadora se confirmó en 9 de estas familias (69.2%) y se descartó el riesgo de recurrencia por mosaicismo germinal materno en dos hermanas de 1 familia (7.69%, n=1/13).

No se identificaron mutaciones en 47 pacientes por MLPA, por lo que se seleccionaron 10 pacientes para la etapa de secuenciación automatizada tipo Sanger, 9 de ellos mostraron un genotipo diagnóstico de DMD/B; 4 resultaron variantes puntuales (1 sin sentido, 1 de sentido erróneo y 2 en sitios canónicos de splicing), 4 microdelecciones y 1 micro-duplicación de una sola base. El estudio en mujeres relacionadas a los pacientes con resultado en el estudio de secuenciación automatizada tipo Sanger se realizó en 7 familias que contaban con muestra de la madre. Se observó que 5 variantes fueron heredadas de madre portadora (71.5%) mientras que las dos restantes se asumió se originaron como eventos *de novo* (28.5%), ya que no fueron identificadas en muestra sanguínea de la madre y en una de ellas se descartó la condición de mosaico germinal en 2 hermanas del caso índice que resultaron no portadoras.

**Conclusión:** La técnica de MLPA identificó un 26.4% (18/68) adicional a la mPCR de genotipos responsables de DMD/B. La secuenciación automatizada identificó una variante patogénica en el gen *DMD* en el 90% de los 10 casos incluidos en esta etapa. Genéricamente, las mutaciones patogénicas identificadas, se heredaron a través de madre portadoras en 2/3 partes de las familias con genotipo, en contraste sólo 1/3 se originó como evento *de novo* con lo que fue posible reclasificar a 4 de 11 familias que se ubicaban en casos únicos como casos familiares. Se descartó el riesgo de recurrencia en hermanas por mosaicismo germinal materno en el 28.5% de los casos únicos identificados (n=2/7). Con este estudio se identificó a siete pacientes candidatos a recibir terapia molecular basada en genotipo, 5 de ellos por oligonucleótidos antisentido (AON's) y los dos restantes con ataluren (25.9%, n=7/27).

## Abstract

The National Institute of Pediatrics (INP) is a referral center for the diagnosis, treatment and rehabilitation of patients with neuromuscular disorders. Dystrophinopathies are the most common in pediatric patients, affecting 1 in 3,600- 6,000 live births males and are linked to the X chromosome and are severe and progressive diseases. In the Laboratory of Molecular Biology (LBM) they have captured more than 400 families (period 1992-2016) with presumptive diagnosis of muscular dystrophies of Duchenne or Becker type (DMD / B, MIM # 310200, # 300376), in which so far they have only been identified intragenic partial deletions (DPI) of the *DMD* gene (Xp21.2-p21.1, MIM \* 300377) in 47.6% of them via multiplex PCR assay of 22 exons. However, it needs to confirm the diagnosis in about 220 families showed no DPI through this methodology. Besides, the diagnosis and prediction of the phenotype, genotype identification is essential to provide genetic counseling, prenatal diagnosis and eventually classification patient to access any of the molecular therapies based on genotype. Thus in Mexico it has not defined the proportion of rare deletions that occur outside of the *hot-spots*, and the spectrum of small mutations identifiable only through the complete sequencing of the *DMD* gene; so with this project through multiple dependent amplification of ligation probes (MLPA) and automated sequencing by Sanger type it is to increase the identification of genotypes conditions and thereby contribute to delineate the mutational spectrum in Mexican patients. **Objective:** To characterize the genotype responsible of *DMD* through MLPA and automated Sanger sequencing type in patients with presumptive diagnosis of DMD / B with negative study to deletions by mPCR of 22 exons.

**Material and Methods:** A descriptive, observational, cross-sectional and ambispective study. We included patients with clinical presumptive DMD/B whose DNA samples are taken under guard in LBM and those patients referred for the first time for the services of Pediatric Neurology and/or Genetics. Only included patients with mPCR study negative DPI in 22 exons (Pm1, 3, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 and 60). The search of rare deletions and duplications of the *DMD* gene was performed by MLPA with SALSA MLPA kit probemixes P034/P035 DMD (Cat. No. P034-50 and P035-50, MRC-Holland). Patients with negative results MLPA analysis stage were subjected to automated sequencing analysis of the 79 coding exons of the *DMD* gene, through the generation of 78 amplicons per patient. The PCR products were sent for sequencing using the BigDye Terminator kit through the service offered by the company MacroGen USA Corp. The sequences obtained were compared with the genomic (NG\_012232.1) and mRNA (NM\_004006.2) reference sequences; with codon Code Aligner® program. The identified changes were consulted in the literature and databases HGMD ([www.hgmd.org/](http://www.hgmd.org/)), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), LOVD ([www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)) and ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) to identify whether they were previously described as pathogenic mutation or polymorphism. In female first-degree relatives of affected cases in whom a diagnosis of DMD dystrophinopathy genotype was identified, search directed mutation by MLPA or automated sequencing was performed.

**Results:** A total of 70 patients were included in the MLPA phase, of which 2 were removed by complement XX result confirmed by the absence of *SRY* gene fragment in PCR so the results of 68 patients are described below. In 5 patients deletions of which two were found of a single exon (40%, n = 2/5) and corroborated by PCR endpoint; the other three

(60%, n = 3/5) did not require confirmation since they were deletions of contiguous exons (DMD-386. 7-9, DMD-1302. 22-29 and 1355 DMD. 31-43). Partial gene duplications were identified in 11 patients (16.17%, n = 11/68) of which 6 involved a single exon; 3 of them were confirmed by real-time PCR (the remaining 3 are pending confirmation) and a complex rearrangement involving two doublings of non-contiguous exons. An apparent MLPA deletion of exon 21 was discarded by PCR and automated sequencing of exon 21 that revealed the presence of variant c.2707G> T; g.32485015C> A; p. (Gly903 \*) located at the site of ligation MLPA probe. The study of first-degree relatives was possible in 13 families (4 patients with deletions and duplications 9). Carrier state of mothers was confirmed in nine of these families (69.2%) and the condition of germline mosaicism at least in index cases's sisters in one family (7.69%, n = 1/13) was discarded.

No mutations in 47 patients were identified by MLPA, so 10 patients were selected for automated Sanger sequencing stage, nine of them showed a DMD genotype diagnostic of DMD/B; 4 variants were single nucleotide (1 nonsense, missense 1 and 2 in canonical splice sites), 4 microdeletions and one microduplication. An automated Sanger sequencing could be performed in the mother from 7 DMD/DMB families. Five of the 9 variants identified through automated sequencing were inherited from carrier mother (71.5%) while the remaining two were assumed originated as events *novo* (28.5%) as they were not identified in blood sample from the mother and one of them was discarded as germinal mosaic condition at least in the index cases's sisters.

**Conclusion:** MLPA technique identified a 26.4% (18/68) in addition to the mPCR of genotypes responsible for DMD/B. Automated sequencing identified a pathogenic variant in the DMD gene in 90% of cases in this stage. The rule frameshift was fulfilled in 80% of analyzable cases. Generically, the pathogenic mutations identified, were inherited by carriers mothers in 2/3 of families with genotype 1/3 in contrast only event originated as *de novo* with what was possible to reclassify as familial cases 4 of 11 single unique cases families classified by genealogy. The condition of germinal mosaicism was ruled out in only 28.5% of cases identified (n=2/7). With this study, seven patients with molecular diagnosis were candidates for genotype-direct therapy, 5 with specific AON's and two more by ataluren (25.9%, n = 7/27).

# Introducción

## Distrofias Musculares

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades genéticas heterogéneas que causan debilidad y degeneración progresiva del tejido muscular estriado esquelético. Estos trastornos varían en la edad de inicio, gravedad y afección del grupo muscular, aunque por lo general conducen a la pérdida de la capacidad ambulatoria. Algunos tipos de distrofia muscular también comprometen la función cardíaca, la capacidad ventilatoria, la función gastrointestinal, al sistema endocrino, ocular, el sistema nervioso central, entre otros. La afección cardíaca y respiratoria, suelen ser la principal causa de muerte en los pacientes con formas de distrofias musculares severas. La clasificación de estas enfermedades se realiza con base en las características genéticas, los músculos afectados y la severidad; sin embargo, con el uso de nuevas estrategias genéticas se han identificado varios genes y proteínas implicados en el origen de distintos tipos de distrofias musculares. Las nuevas clasificaciones toman en cuenta el gen y su producto codificado alterado, lo que además ha contribuido al entendimiento de la fisiopatología molecular de estas patologías [2-4]. Todas las distrofias musculares tienen un origen monogénico e implican una mutación en genes que codifican para proteínas que son críticas para la integridad muscular. Los avances en genética han demostrado que incluso el mismo genotipo puede manifestarse en diversas formas clínicas (heterogeneidad genética alélica) y el mismo fenotipo puede deberse a diversos defectos genéticos en loci distintos (heterogeneidad genética no alélica o de locus) [2-5].

Las distrofias musculares pueden heredarse de manera autosómica dominante (AD), autosómica recesiva (AR) o recesiva ligada al cromosoma X [4] y afectan a todos los grupos poblacionales. Su incidencia puede variar de acuerdo a algunas poblaciones, particularmente para las formas autosómico recesivas, sin embargo, en el caso de las distrofinopatías, son consideradas el trastorno neuromuscular hereditario de presentación en etapa pediátrica más común del ser humano [6].

## Estructura del músculo

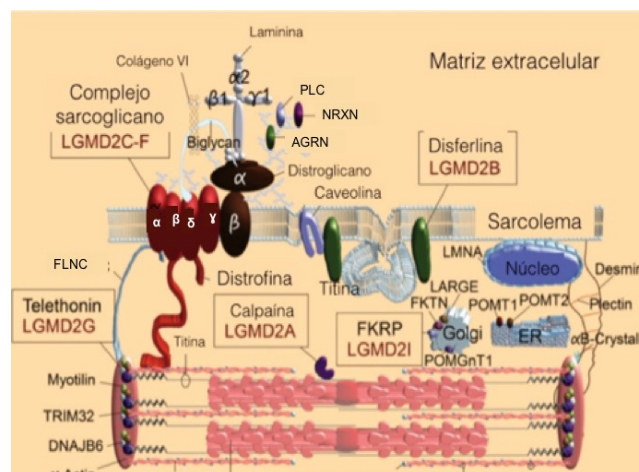
La fibra muscular es la unidad funcional del músculo esquelético y se conforma en una estructura tubular multinucleada formada por la fusión de múltiples células musculares mononucleadas (mioblastos). Los mioblastos se generan por división asimétrica de células musculares progenitoras llamadas células satélites, que se localizan entre la membrana de la célula muscular (sarcolema) y la lámina basal. Además de los organelos celulares típicos, el sarcoplasma de una fibra muscular contiene unidades contráctiles (sarcómeros) que constan de filamentos delgados que contienen actina y filamentos delgados con miosina, además de una estructura adicional de proteínas reguladoras que están acomodadas como miofibrillas. Las miofibrillas periféricas están conectadas con el sarcolema a lo largo de los discos-Z por interacciones con complejos de proteínas del subsarcolema llamados costámeros. Estas estructuras transmiten fuerzas contráctiles de los sarcómeros de una miofibra a otra. La integridad del sarcolema durante los fenómenos de contracción y relajación muscular se mantiene con la sincronización de la contracción de las miofibras a

lo largo del músculo y con la participación del citoesqueleto subsarcolémico. El sarcolema del lado extracelular está firmemente adherido a la lámina basal, que está compuesta por proteínas contráctiles específicas (ECM); si esta adhesión no se da de una manera adecuada se presenta una disrupción del sarcolema que es la causa predominante de varias formas de distrofias musculares [7, 8].

La mayoría de las distrofias musculares se producen por una disrupción del complejo distrofina–glicoproteínas (DAP). Este complejo trasmembrana se subdivide en dos: sarcoglicano-sarcospano (CSS) y distroglicano (CD) con funciones de soporte estructural y señalización a través de la membrana. Los componentes del subsarcolema son la distrofina, la sintrofina, la sintetasa del ácido nítrico neural (nNOS) y la distrobrevina (**figura 1**). La ruptura del sarcolema por la alteración de cualquier proteína del complejo transmembrana lleva a la destrucción de la fibra muscular. La deficiencia de alguno de los componentes del complejo DAP, CSS, CD y otros responsables de DM se pueden identificar a partir de estudios como biopsia muscular, inmunohistoquímica o Western blot en la biopsia muscular [7, 8].

El corte transversal de un músculo esquelético sano revela miofibras con angulaciones y diámetros similares y con múltiples núcleos en la periferia de las células musculares; sin embargo un músculo distrófico muestra centralización de núcleos y miofibras de tamaños variables con pérdida de la angulación normal y necrosis [8]. Un daño extenso en el músculo activa las células satélites que son las células que promueven la regeneración del músculo, pero este proceso es finito y concluye con una sustitución definitiva de las fibras musculares por tejido fibroconectivo y adiposo.

La disrupción del sarcolema condiciona el ingreso excesivo de calcio a las fibras musculares, las cuales además liberan al espacio extracelular la enzima *creatinín fosfocinasa* (CPK). Las concentraciones elevadas de CPK en el suero son utilizadas como un biomarcador del proceso degenerativo que se sucede en el músculo [9].



**Figura 1.** Esquema de los complejos sarcolémicos y las principales proteínas involucradas en la génesis de las distrofias musculares en el humano. Dentro de los componentes del citoplasma se ubican las proteínas distrofina y actina citoplásmica, sintrofinas, calpaina, emerina, fukutina, nebulina, miotilina y titina. Las proteínas transmembranales comprenden a los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  sarcoglicanos, así como  $\beta$  distroglicano, disferlina, caveolina-3 e integrina; y  $\alpha$ -distroglicano y  $\alpha$ -2 laminina en la matriz extracelular. Tomado y modificado de [5].

## **Clasificación de las Distrofias Musculares**

Las distrofias musculares se clasifican con base en el diagnóstico clínico y molecular, en distrofia facioescapulohumeral (DFEH), distrofias de cinturas (LGMD, del inglés *limb girdle muscular dystrophy*), distrofia de Emery-Dreifuss (DMED), distrofias musculares congénitas (DMC), distrofinopatías (DMD/B), y distrofia oculofaríngea [3, 4]. En cada uno de los grupos se han descrito diversos fenotipos lo cual hace que la evaluación clínica requiera de los estudios moleculares para contar con un diagnóstico certero. En la **tabla 1** se enlistan los distintos modos de herencia que tienen las distrofias musculares, el gen responsable y la proteína codificada.



**Tabla 1.** Clasificación de las principales Distrofias Musculares

Enfermedad		Locus	Gen	Proteína
Duchenne (DMD); Becker (DMB)	XR	Xp21.2	<i>DMD</i>	Distrofina
Emery-Dreifuss ligada a X tipo 1 (EDMD)	XR	Xq28	<i>EMD</i>	Emerina
Emery-Dreifuss ligada a X, tipo 2	XR	Xq26	<i>FHL1</i>	Cuatro dominios y medio de LIM1
Emery-Dreifuss autosómica dominante (EDMD2)	AD	1q21.2	<i>LMNA</i>	Lamina A/C
Emery-Dreifuss autosómica recesiva (EDMD3)	AR	1q21.2	<i>LMNA</i>	Lamina A/C
Emery-Dreifuss con defecto en nesprina-1	AD	6q25	<i>SYNE1</i>	Proteína con repetidos de espectrina, envoltura nuclear 1 (nesprina-1)
Emery-Dreifuss con defecto en nesprina-2	AD	4q23	<i>SYNE2</i>	Proteína con repetidos de espectrina, envoltura nuclear 2 (nesprina-2)
Facioescapulohumeral (FSHD1)	AD	4q35	<i>D4Z4</i>	Contracción el repetido D4Z4 del microsatélite en la región subtelomérica del cromosoma 4q35
Distrofia muscular con lipodistrofia generalizada	AR	17q21-q23	<i>PTRF</i>	Factor de transcripción y polimerasa I (cavina-1)
LGMD1A	AD	5q31	<i>MYOT</i>	Miotilina
LGMD1B	AD	1q11-q21	<i>LMNA</i>	Lamina A/C
LGMD1C	AD	3p25	<i>CAV3</i>	Caveolina-3
LGMD1D	AD	6q23	-	-
LGMD1E	AD	7q36.3	<i>DNAJB6-</i>	-
LGMD1F	AD	7q32.1	<i>TNPO3-</i>	-
LGMD1G	AD	4p21.22	<i>HNRNPDL</i>	-
LGMD2A	AR	15q15.1	<i>CAPN3</i>	Calpaina-3
LGMD2B	AR	2p13	<i>DYSF</i>	Disferlina
LGMD2C	AR	13q12	<i>SGCG</i>	$\gamma$ -sarcoglicano

Enfermedad		Locus	Gen	Proteína
LGMD2D	AR	17q12-q21.23	<i>SGCB</i>	$\alpha$ -sarcoglicano
LGMD2E	AR	4q12	<i>SGCC</i>	$\beta$ -sarcoglicano
LGMD2F	AR	5q33	<i>SGCD</i>	$\delta$ -sarcoglicano
LGMD2G	AR	17q12	<i>TCAP</i>	Teletonina
LGMD2H	AR	9q31-q34	<i>TRIM32</i>	Proteína de región tripartita 32 (ubiquitín-ligasa)
LGMD2I	AR	19q13.3	<i>FKRP</i>	Proteína relacionada con fukutina
LGMD2J	AR	2q31	<i>TTN</i>	Titina
LGMD2K	AR	9q34	<i>POMT1</i>	O-manosil-transferasa 1
LGMD2L	AR	11p14.3	<i>ANO5</i>	Anoctamina 5
LGMD2M	AR	9q31	<i>FKTN</i>	Fukutina
LGMD2N	AR	14q24	<i>POMT2</i>	O-manosil-transferasa 2
LGMD2O	AR	1p34	<i>POMGNT 1</i>	O-manosil-transferasa 1
<b>Distrofias musculares congénitas con modo de herencia autosómico dominante</b>				
Miopatía de Bethlem		21q22.3	<i>COL6A1</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ 1
Miopatía de Bethlem		21q22.3	<i>COL6A2</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ 2
Miopatía de Bethlem		2q37	<i>COL6A3</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ 3
DMC con dinamina		19q13.2	<i>DNM2</i>	Dinamina2
<b>Distrofias musculares congénitas con modo de herencia autosómico recesiva</b>				
DMC con deficiencia de merosina		6q2	<i>LAMA2</i>	Laminina $\alpha$ 2 cadena de merosina ( $\alpha$ -2 lamina)
DMC		1q42	-	-
DMC y anormal glucosilación de distroglicano		19q13	<i>FKRP</i>	Proteína relacionada con fukutina
DMC y anormal glucosilación de distroglicano		22q12	<i>LARGE</i>	Similar a glicosil transferasa

Enfermedad	Locus	Gen	Proteína
DMC de Fukuyama	9q31-q33	<i>FCMD</i>	Fukutina
Síndrome de Walker-Warburg	9q34	<i>POMT1</i>	Proteína O-manosil transferasa 1
Síndrome de Walker-Warburg	14q24.3	<i>POMT2</i>	Proteína O-manosil transferasa 2
Síndrome de Walker-Warburg	19q13	<i>FKRP</i>	Proteína relacionada con fukutina
Síndrome de Walker-Warburg	1p3	<i>POMGNT 1</i>	O- manosa $\beta$ 1,2-N-acetil- glucosaminil transferasa
Síndrome de Walker-Warburg	22q12	<i>LARGE</i>	Similar a glicosiltransferasa
Enfermedad músculo- ojo- cerebro	1p3	<i>POMGNT 1</i>	O- manosa $\beta$ 1,2-N- acetil- glucosaminil transferasa
Enfermedad músculo- ojo- cerebro	19q13	<i>FKRP</i>	Proteína relacionada con fukutina
Enfermedad músculo- ojo- cerebro	14q24.3	<i>POMT2</i>	Proteína O-manosil transferasa 2
Síndrome de espina rígida	1p36	<i>SEPN1</i>	Selenoproteína N1
Síndrome de Ullrich	21q22.3	<i>COL6A1</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ -1
Síndrome de Ullrich	21q22.3	<i>COL6A2</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ -2
Síndrome de Ullrich	2q37	<i>COL6A3</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ -3
Miopatía de Bethlem (recesiva)	2q37	<i>COL6A3</i>	Colágena tipo VI subunidad $\alpha$ -3
DMC con defecto de integrina	12q13	<i>ITGA7</i>	Integrina $\alpha$ 7
DMC con articulaciones hiperlaxas	3p23-21	-	-

XR: ligada al cromosoma X; AD autosómico dominante; AR: autosómico recesivo; DMC: distrofia muscular congénita. Tomado y modificado de [2, 5, 7].

## Distrofinopatías

Las distrofinopatías son trastornos que se heredan de forma recesiva ligada al cromosoma X y son ocasionadas por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la distrofina, una proteína del citoesqueleto subsarcolémico, que forma parte del complejo de unión del citoesqueleto con la matriz extracelular (**figura 1**) [9, 10].

El fenotipo más severo incluye enfermedades musculares progresivas que son clasificadas como Distrofia Muscular tipo Duchenne (DMD; Referencia online de enfermedades mendelianas en el humano [OMIM] 310200); y la Distrofia Muscular de Becker (DMB; OMIM 300376). La Cardiomiopatía Dilatada ligada al cromosoma X (CMD; OMIM 302045) es una entidad alélica de las DMD/B con afección predominante del músculo estriado cardiaco. Las distrofinopatías leves incluyen fenotipos asintomáticos con CPK elevada en suero o casos con mioglobulinuria y/o miopatía aislada en los cuádriceps [9].

La DMD afecta a 1 de cada 3,600 varones recién nacidos vivos [9]. Los pacientes muestran retraso en la adquisición de hitos motores debido a la debilidad de los músculos proximales. La mayoría son incapaces de correr, subir escaleras y saltar, además presentan problemas en la marcha (caminar en puntas, marcha basculante, hiperlordosis), así como pseudohipertrofia en los músculos gastrocnemios y signo de Gowers positivo que consiste en una dificultad del paciente para levantarse del suelo, para lo cual extienden sus piernas, y utilizan sus manos para escalar por sus muslos hasta llegar a una posición supina [4, 9]. Aunque las manifestaciones clínicas de la enfermedad se presentan al final del primer año de vida, la mayoría de los pacientes son diagnosticados alrededor de los 5 años de edad, cuando su condición física está marcadamente disminuida con respecto a la de otros niños de la misma edad. Sin tratamiento, los niños requerirán de una silla de ruedas alrededor de la primera década de vida ( $\leq 12$  a) y posteriormente surgirán complicaciones respiratorias debido a la debilidad progresiva de los músculos respiratorios y la aparición de escoliosis severa, además de anomalías cardíacas las cuales sin intervención médica pueden causar muerte prematura antes de la segunda década de vida [4, 9].

La DMB es un desorden alélico con una frecuencia menor que DMD (1 en 18,500 varones recién nacidos vivos) [11], clínicamente más heterogéneo y con una expectativa de vida variable [4, 10]. Los pacientes conservan la capacidad ambulatoria por lo general más allá de los 16 años aunque desarrollan cardiomiopatía dilatada (CDM). Algunos casos con CDM ligada al X se deben a mutaciones que afectan al promotor de la isoforma muscular y el primer exón por lo que no se producen transcritos de la isoforma Dp427 muscular, cuya función es cardinal para los cardiomiocitos, mientras que los promotores alternativos de cerebro y células de Purkinje están activos en músculo esquelético, lo cual permite la suficiente expresión de distrofina para prevenir las manifestaciones motoras [12].

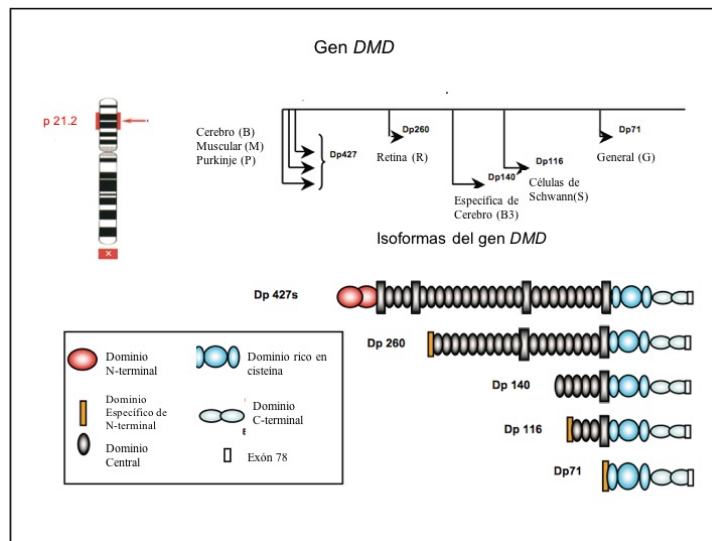
Aun cuando DMD/DMB son entidades incurables, la intervención médica oportuna puede modificar la historia natural de la enfermedad. El tratamiento con corticosteroides (prednisona o deflazacort), así como el seguimiento cardíaco, respiratorio, ortopédico y de rehabilitación ayudan a retrasar la pérdida de la función muscular, a reducir la escoliosis y preservar la función cardiorrespiratoria, por más tiempo; en la actualidad están en desarrollo

algunas terapias moleculares que se mencionarán más adelante. Actualmente un niño que es diagnosticado y tratado de forma temprana con DMD/DMB en países de primer mundo, tiene la posibilidad de tener una expectativa de vida de hasta cuatro décadas [9, 10, 13].

En la mayoría de las series, los pacientes con DMD/B suelen no referir antecedentes de la enfermedad por rama materna (casos únicos, 70-80%)[14, 15]. Las mujeres de casos familiares son consideradas como portadoras obligadas del rasgo cuando tienen un hijo afectado y otro familiar varón afectado emparentado por rama materna, o cuando tienen dos hijos varones afectados. Las mujeres portadoras de DMD/DMB normalmente no manifiestan el fenotipo grave de los varones hemicigotos para la mutación; sin embargo, alrededor del 3% de éstas, manifiestan algunos síntomas de la enfermedad como debilidad proximal discreta y elevación de la CPK alrededor de 5 a 10 veces sobre el valor normal; alteraciones cardiacas se han descrito en el 18% de las mujeres portadoras de DMD/DMB, lo cual ha enfatizado la importancia de realizar en ellas un diagnóstico temprano [9, 10, 13].

## El gen *DMD* y su producto

El gen *DMD* (Xp21.2) comprende 79 exones y 8 promotores tejido-específico distribuidos a lo largo de las 2.3 megabases (Mb) de su secuencia genómica. Codifica para tres isoformas principalmente de ARN mensajero (ARNm) de  $\approx 14$  kb traducidas en las isoformas cerebral (B), muscular (M) y de células de Purkinje (P) con un peso de 427 kilodaltones (kDa), otras isoformas codificadas por el gen son: la de retina (R) de 260 kDa, la isoforma específica de cerebro (B3) de 140 kDa, la de las células de Schwann (S) de 116 kDa y una isoforma de expresión general (G) de 71 kDa (**figura 2**) [12].



**Figura 2.** Estructura del gen *DMD* (Xp21.2). Se ilustran los promotores tejido específico y las diferentes isoformas a las que da origen.

## Génesis y tipo de mutaciones en el gen *DMD*

Las distrofinopatías se originan por un espectro mutacional heterogéneo en el gen *DMD*. Se estima tradicionalmente que dos tercios de las mutaciones en el gen *DMD* son heredadas a través de madres portadoras, mientras que el otro tercio son mutaciones originadas *de novo* [16]. Las DPI en uno o más exones de este gen se observan en el 60% al 70% de los pacientes, principalmente en dos regiones proclives o *hot spots*: la región central entre los exones 44 y 53 (70%-80%) y la región proximal, entre los exones 2 y 20 (20%- 30%); las duplicaciones de uno o más exones completos, se encuentran presentes en el 5% al 10% de los pacientes afectados y tienden a ubicarse en las mismas regiones donde ocurren las DPI. El restante 20% al 25% de los casos se explica por variantes puntuales o microinserciones/microdeleciones u otros rearrreglos complejos y muy poco frecuentes como inversiones génicas, inserciones de elementos genéticos móviles, etc. [17-19].

La correlación genotipo-fenotipo se ha establecido mediante la hipótesis que relacionan el efecto de la mutación y la posibilidad de síntesis de una distrofina con función residual y el fenotipo esperado. La hipótesis del corrimiento del marco de lectura tradicional [20] propone que una vez que ha ocurrido la mutación, la integridad del marco dependerá de la reunión de los segmentos proximales que genera dos alternativas: si se preserva el marco de lectura (*in frame*) y se conservan los dominios amino-terminal de unión con la actina y el carboxi-terminal de unión con los sarcoglicanos y distroglicanos de la membrana que permiten la síntesis de una proteína con función residual por las anomalías en los dominios tipo “bastón” o “rod-domains”, por lo general se asocia a una forma leve de la enfermedad o DMB. Por el contrario, si la deleción crea un corrimiento del marco de lectura (*out of frame*) aunque se conserve la región aminoterminal, se genera un codón de paro prematuro, que impide la síntesis de la distrofina y condiciona los fenotipos severos de DMD [12].

## Diagnóstico Molecular de distrofinopatías

El abordaje diagnóstico tradicional de las distrofinopatías se realiza con base en la evaluación de CPK, una biopsia muscular con estudio de inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular y electromiografía [6]. A partir de la caracterización de la secuencia completa del gen *DMD* y de la identificación del espectro mutacional responsable, el estudio molecular se ha posicionado como estrategia diagnóstica confirmatoria, mínimamente invasiva que debe ofrecerse a todo paciente masculino en etapa pediátrica que presente retraso en la adquisición de habilidades motoras, debilidad muscular proximal y elevación significativa de la CPK (hiperCPKemia) [21]. El resultado además de confirmar la sospecha diagnóstica, es de suma utilidad para el asesoramiento genético de la familia y el diagnóstico prenatal.

A la fecha se han descrito distintos métodos moleculares para la detección de mutaciones en el gen de la distrofina que incluyen desde los primeros ensayos de Southern blot, la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (mPCR), PCR tiempo real cuantitativo, hibridación genómica comparativa en microarreglos (array-CGH por sus siglas en inglés), amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación (MLPA por sus siglas en inglés)

para detectar DPI grandes o duplicaciones [14, 15, 18] y la secuenciación automatizada tipo Sanger o la secuenciación masiva de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) para detección de alteraciones en regiones intrónicas [22, 23].

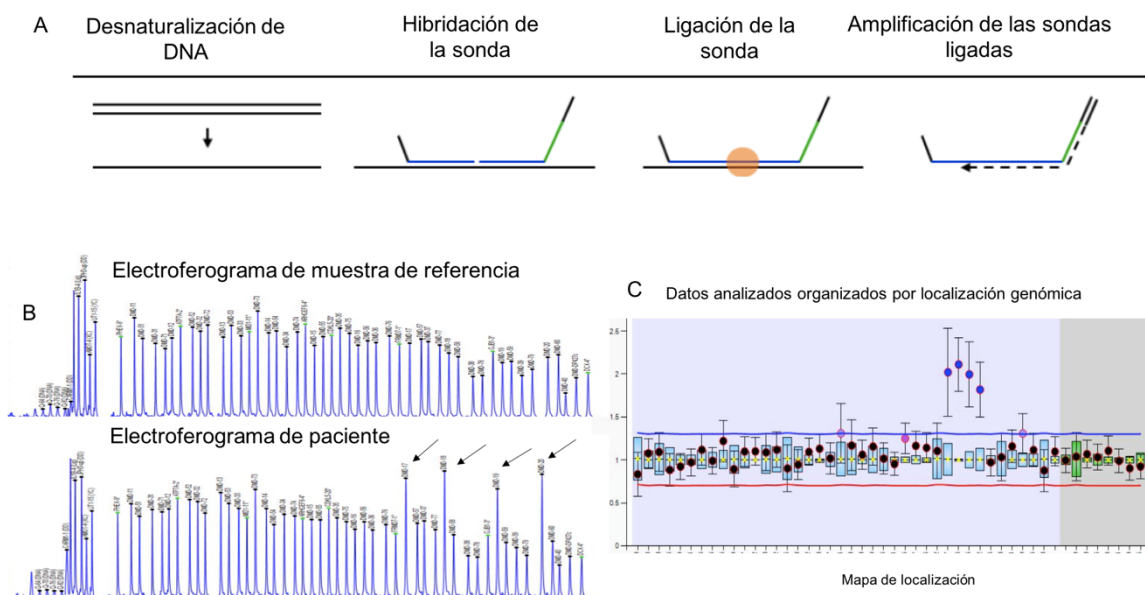
El protocolo molecular más ampliamente utilizado desde principios de la década de los 90s en el siglo pasado, fue la PCR múltiple para 18 exones del gen *DMD* que detecta cerca del 98% de las DPI identificadas por el análisis completo de la porción codificante del gen a través de Southern blot [24-26]. Debido al agrupamiento de éstas en los *hot spots* antes mencionados, la mPCR es un método eficaz, rápido y de bajo costo para el diagnóstico molecular de las distrofinopatías causadas por deleciones, sin embargo, es incapaz de detectar duplicaciones de exones y mutaciones puntuales [14, 15, 18, 27, 28].

La introducción de técnicas basadas en PCR cuantitativo, como MLPA han ampliado significativamente la detección de DPI y duplicaciones en varones afectados y mujeres portadoras hasta en el 100% [17, 29, 30] y actualmente es la técnica que debe ofrecerse como primer línea en el diagnóstico de todo paciente referido con clínica de distrofinopatía [9].

La técnica de MLPA permite determinar el número de copias de hasta ~40 exones por reacción por lo que se requiere de dos kits diferentes para analizar los 79 exones codificantes del gen *DMD*. La técnica utiliza para cada exón dos sondas (5' y 3'): ambas son complementarias al exón que se quiere estudiar (21-30 nucleótidos), a una de ellas se le añade la secuencia de un *primer* universal en el extremo 5'; la otra sonda de la pareja tiene una secuencia de tamaño variable (secuencia "stuffer") que es de distintos tamaños entre las sondas para poder distinguir inequívocamente a cada exón por peso molecular, además de poseer en su extremo 3' la secuencia de un primer universal. Ambas sondas hibridan adyacentes a una secuencia única en cada exón y se ligan a través de una ligasa termoestable. Todas las sondas ligadas son amplificadas exponencialmente utilizando un solo par de primers universales, uno de ellos marcado con un fluoróforo (6-FAM). El producto amplificado de cada sonda tiene un tamaño único (130-480 pb) gracias a la secuencia "stuffer" y se separan mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático. Las cantidades relativas de los productos de amplificación de la sonda, en comparación con una muestra de ADN control, reflejan el número de copias relativo de cada exón (**figura 3**). Junto con las sondas específicas para cada exón se incluyen sondas control intramuestra para evaluar la cantidad (4 fragmentos "Q" visibles sólo con menos de 100 ng de muestra de ADN) y la calidad (3 fragmentos "D" señales bajas indican desnaturalización del ADN incompleta) de la reacción y/o el ADN genómico empleado, además de otras sondas para identificar el sexo del paciente (específicas para el cromosoma X y el cromosoma Y) y 9 sondas ubicadas en el cromosoma X en distintas posiciones para normalización y evaluación de la dosis génica. Para la asignación de los pesos moleculares, se añade en la electroforesis capilar un marcador de pesos molecular marcado con un fluoróforo distinto (por ejemplo, G-LIZ500). Se recomienda en cada estudio incluir una muestra de un individuo sano por cada 7 muestras de pacientes.

Las ventajas que ofrece el análisis con MLPA respecto al mPCR es que la primera identifica DPI y duplicaciones para los 79 exones en un solo ensayo, además de determinar a nivel de exón, la extensión de las mismas lo cual es crítico para predecir la integridad del marco de lectura resultante y por ende el fenotipo esperado y la progresión de la enfermedad.

Así el estudio de MLPA permite la identificación de la mutación responsable en el 70-75% de los pacientes con sospecha de distrofinopatía, lo cual obviaría la realización de la biopsia muscular en la mayoría de los casos. Aproximadamente el 90% de los casos portadores de una mutación que altera el marco de lectura dará lugar al fenotipo severo de Duchenne, mientras que las mutaciones que mantienen el marco de lectura abierto, conducen generalmente al fenotipo menos severo [20]. Esta información también tiene importancia para las futuras estrategias de terapia, por ejemplo, los destinados al salto dirigido de exones específicos del gen [1]. El MLPA a diferencia del mPCR, identifica de manera certera el genotipo heterocigoto para DPI y las duplicaciones en las mujeres portadoras, pues la amplificación en la mPCR del alelo *DMD* normal en las portadoras enmascara al alelo con la DPI o duplicación [31].



**Figura 3.** Proceso experimental y de interpretación de los datos obtenidos con la técnica de MLPA. A) Se explica el fundamento de hibridación y ligación de las sondas. B) Se muestra la comparación de varios exones. C) Gráfica que muestra la dosis génica del paciente afectado con las diferencias significativas de acuerdo al promedio de los controles (línea roja y línea azul), en este caso se puede observar una duplicación de 4 exones continuos (exones 17-20).



A pesar de que la metodología de MLPA identifica el genotipo responsable en el ~75% de los casos con distrofinopatías, no es una técnica que permita la caracterización de mutaciones pequeñas y heterogéneas que ocurren a nivel de exones o en las uniones exón-intrón, que explican el 25% restante. La secuenciación automatizada tipo Sanger de la porción codificante completa del gen *DMD* y sus bordes exón-intrón, es cada día más accesible para poder caracterizar la variante patogénica de pacientes con DMD/DMB negativos al estudio de MLPA, gracias a la disminución de los costos y al análisis bioinformático más simplificado de las secuencias obtenidas. Algunos grupos han caracterizado el espectro mutacional del gen *DMD* en poblaciones de Canadá, Japón, Australia e Italia con técnicas como mPCR, MLPA y secuenciación automatizada con las cuales han tenido una eficacia de diagnóstico cercana al 100%. En México, únicamente se dispone de reportes con mPCR para determinación de la frecuencia y distribución de DPI, y recientemente con adaptaciones de la técnica de MLPA para el tamizaje de cierto grupo de mutaciones puntuales (PM-MLPA) que corresponden a los codones de paro más frecuentes que podrían justificar en el paciente la administración de fármacos de supresión de codones de paro prematuro en ensayos clínicos, pero en sí en nuestra población no ha sido posible delinear el espectro mutacional completo responsable de distrofinopatías [14, 27, 32-34].

### **Importancia de las terapias moleculares basadas en genotipo en pacientes con distrofinopatías**

El único tratamiento farmacológico que ha demostrado disminuir la progresión de la enfermedad son los corticosteroides. Retrasan la disminución de la fuerza y la función muscular en la distrofia muscular, reduce el riesgo de escoliosis y estabiliza la función pulmonar, sin embargo, no conducen a una normalización de la expectativa de vida. La caracterización precisa del genotipo responsable en los pacientes con DMD/B ha sido indispensable para la investigación de terapias moleculares basadas en el genotipo, tales como “salto dirigido de exones” o el desarrollo de fármacos supresores de codones de paro prematuro [35]. Para pacientes con DPI de exones particulares que se encuentran “fuera del marco de lectura” e imposibilitan la síntesis de la distrofina se podrían restaurar el marco de lectura del ARNm mutante a través de incluir durante el splicing un “salto dirigido de exones” con oligonucleótidos antisentido (AON, por sus siglas en inglés) [36]. Los AON's son pequeños fragmentos de ácido nucléico complementario a secuencias específicas del gen químicamente modificados para: resistir la acción de las endonucleasas, proteger el ARN contra la escisión mediada por RNAsa H, promover la unión al ARN diana y la estabilidad del dúplex. El mecanismo de acción de un AON implica la unión de secuencias altamente específicas a la secuencia de unión a estructuras parcialmente abiertas de pre-ARNm en el exón seleccionado y la interferencia con los factores y/o estructuras de regulación de empalme. El resultado del salto dirigido de exones es la inducción de un marco de lectura abierto en el transcrito de ARNm del gen *DMD* mutado. Esto permite la expresión de una proteína similar a las existentes en DMB a pesar de la mutación interna ya que conserva los dominios N- y C-terminal necesarios para su función estructural y de señalización en las membranas de las fibras musculares (**figura 4**).

Los AON's actúan de cuatro maneras distintas:

1. Excluyendo un pseudoexón debido a una mutación en el punto de empalme exón-intrón.
2. Induciendo la “eliminación” o “silenciamiento” de exones que contienen una mutación.
3. Favorecen la no inclusión de uno o más exones que flanquean una deleción de forma que se restaura el marco de lectura, aunque se pierdan aminoácidos en la proteína.
4. Forzan la selección de un sitio de splicing alternativo.



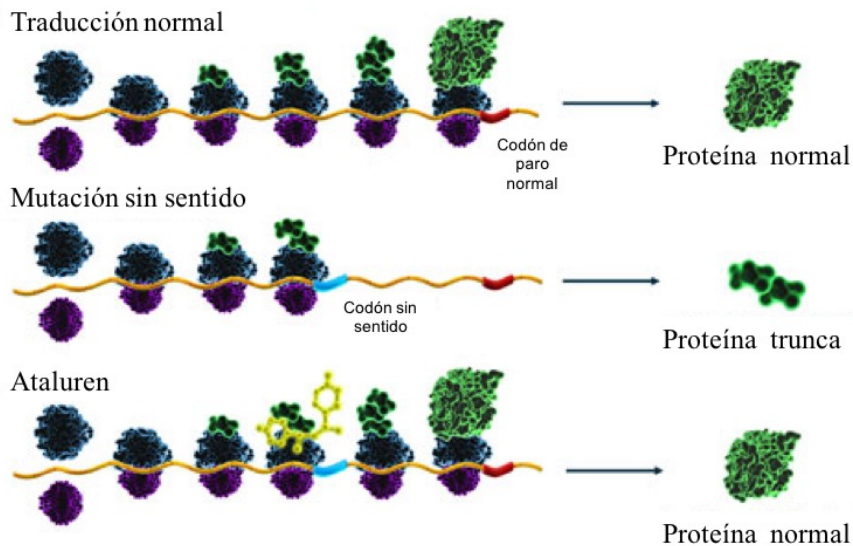
**Figura 4.** Representación esquemática de la estrategia de salto dirigido de exón. Tomado de [30]. DMD, Distrofia Muscular de Duchenne; BMD, Distrofia Muscular de Becker.

El objetivo de la expresión de distrofina mediada por los AON terapéuticos es restaurar el complejo de proteínas membranales asociadas a distrofina. En la última década, la restauración de la distrofina mediada por AON se ha demostrado en más de 100 estudios *in vitro* e *in vivo*. Éstos incluyen al menos 58 cultivos celulares de pacientes con DMD con una variedad de mutaciones distribuidas sobre el dominio central de la distrofina [37]. En todos los estudios *in vitro* se logró el salto de exones específicos y la expresión de la distrofina. En los casos *in vivo* se ha logrado el salto dirigido de exones en múltiples modelos de ratón *mdx* y de perros con DMD. Actualmente existen dos fármacos candidatos que se encuentran en fase clínica: el drisapersen (20-mer 2OMePs AON) se encuentra en estudios de fase III y el eteplirsen (30-mer PMO AON) se encuentra en estudios de fase II. Sus características fisicoquímicas específicas tienen ventajas y desventajas con respecto a la seguridad y a la farmacocinética. Ambos demostraron ser capaces de omitir el exón 51 para aumentar la expresión de distrofina muscular en un subgrupo de los pacientes con DMD (algunas de las deleciones corregibles por AON que induce salto del exón 51 son: exones 50, 49-50, 45-50 entre otras) y ambos mostraron efectos prometedores en las distancias que caminan los pacientes con DMD en 6 minutos.

Sin embargo los oligonucleótidos presentan inestabilidad debida a la rápida degradación por nucleasas. Este problema se ha ido superando con la aparición de oligonucleótidos modificados, como los derivados del morfolino, que son muy estables “*in vivo*”, muestran gran afinidad hacia las dianas y potente actividad biológica. La liberación de los oligonucleótidos antisentido requiere sistemas de transporte que sean capaces de liberarlos

intracelularmente, donde deben hacer su función. Algunos de ellos, como los péptidos, pueden provocar una respuesta inmune que debe evitarse. Hay que considerar el posible efecto tóxico de liberar oligonucleótidos en dosis altas y repetidas a largo plazo, ya que los pacientes deben tratarse durante toda su vida.

Las mutaciones sin sentido generan codones de paro (UGA, UAA, UAG) y cambios de una sola base pueden dar lugar a éstos, generando una señal de terminación anormal. El enfoque terapéutico denominado ‘omisión de codón de paro’ se encuentra en fase clínica 2b, y consiste en la inducción de la producción de distrofia en pacientes con DMD con este tipo de mutación. Esta terapia se lleva a cabo mediante la acción de un fármaco denominado PTC124 (Ataluren), que tiene la ventaja de administrarse de manera oral y de actuar selectivamente sobre codones de paro anormales. Ataluren es un compuesto químico destinado a restaurar la lectura del ARN mensajero, y está diseñado para permitir que el ribosoma ignore la señal de paro prematura y continúe la traducción del ARNm, lo que resulta en la formación de una proteína funcional. Una de las principales limitaciones es que el contexto de la secuencia de la mutación interfiere con el efecto del compuesto, y la secuencia UGA se omite preferentemente con respecto a otras secuencias de codón de paro. Debido a la frecuencia de mutaciones sin sentido en pacientes con DMD, se considera que menos del 15% de los pacientes serían candidatos a esta terapia (**figura 5**).



**Figura 5.** Mecanismo de acción del fármaco Ataluren en la supresión de PTC.

## Justificación

El Instituto Nacional de Pediatría es considerado un centro nacional de referencia para el diagnóstico, tratamiento y la rehabilitación de pacientes con trastornos neuromusculares. En el Laboratorio de Biología Molecular de dicho Instituto se tienen captadas más de 400 familias con diagnóstico presuntivo de DMD/B de las cuales hasta el momento sólo se han identificado DPI parciales intragénicas del gen *DMD* en el 50% de ellas a través de un ensayo de mPCR de 22 exones representativos de ambos *hot-spots* [14, 33, 38]. Sin embargo falta confirmar el diagnóstico de distrofinopatía en cerca de 200 familias que resultaron sin DPI a través de esta técnica y en las cuales aún no se tiene caracterizada la mutación responsable de la *DMD*, a pesar de que una proporción importante tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X e historia clínica compatible con el diagnóstico de distrofinopatía.

De acuerdo a los lineamientos internacionales [13], la implementación de un abordaje de diagnóstico molecular no invasivo que permita la identificación de ~100% de las alteraciones moleculares responsables de distrofinopatías en nuestra población, es imprescindible para la confirmación de la sospecha clínica y para el otorgamiento de asesoramiento genético de certeza de la familia, además de que eventualmente a las mujeres portadoras, se les podría brindar la posibilidad de diagnóstico prenatal, pues algunas de ellas se encuentran en etapa reproductiva.

En México varios grupos desde la década de los 90's han reportado la prevalencia de DPI responsables de distrofinopatías identificadas a través de mPCR [32], sin embargo, aún no se ha definido la proporción de DPI infrecuentes que ocurren fuera de los *hot-spots*, así como posibles duplicaciones parciales intragénicas, ni el espectro de mutaciones pequeñas heterogéneas identificables a través de la secuenciación automatizada tipo Sanger en la región codificante completa del gen *DMD*. Por lo tanto, con el presente proyecto se pretende utilizar metodologías moleculares como MLPA y secuenciación automatizada tipo Sanger para incrementar la identificación de genotipos condicionantes de distrofinopatías en nuestra población y con ello contribuir a establecer el espectro mutacional en pacientes mexicanos. Sin duda, esta información podrá ser de utilidad para que los pacientes puedan eventualmente en un futuro, ser elegibles para recibir una de las terapias moleculares basadas en el genotipo que se encuentran actualmente en desarrollo.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

- o Caracterizar el genotipo de *DMD* responsable en pacientes con diagnóstico presuntivo de DMD/B con estudio negativo a DPI por mPCR de 22 exones.

### **Objetivos particulares**

- o Caracterizar DPI infrecuentes y duplicaciones por MLPA en el gen *DMD* de pacientes con diagnóstico presuntivo de distrofinopatías.
- o Caracterizar mutaciones puntuales o heterogéneas de otro tipo por secuenciación automatizada tipo Sanger en pacientes negativos a DPI y duplicación por MLPA.
- o Relacionar el fenotipo DMD/DMB con el genotipo *DMD*.
- o Realizar el diagnóstico de portadora en mujeres emparentadas al caso índice a través del estudio dirigido de MLPA o secuenciación automatizada.
- o Identificar la proporción de mutaciones heredadas de madre portadora y de las originadas *de novo*.

### **Objetivos secundarios**

- o Brindar asesoramiento genético a las familiares.

## Clasificación de la Investigación

Estudio descriptivo, observacional, transversal y ambispectivo.

### Población de estudio.

#### Población Objetivo:

- Pacientes en etapa pediátrica que acuden al Instituto Nacional de Pediatría en quienes los servicios de Genética y/o Neurología Pediátrica emitan un diagnóstico presuntivo de distrofinopatía (DMD/DMB) con base en datos clínicos, de laboratorio, gabinete e histopatológicos.
- Pacientes en etapa pediátrica con trastornos neuromusculares compatibles con distrofinopatías con muestra de ADN genómico disponible en el Laboratorio de Biología Molecular del INP, y que cuenten con un resultado negativo en el estudio molecular de DPI parciales intragénicas del gen *DMD*.

#### Población Elegible:

- Paciente masculinos en etapa pediátrica con un trastorno neuromuscular compatible con el diagnóstico de distrofinopatía y con muestra de ADN genómico disponible en el Laboratorio de Biología Molecular del INP, que hayan sido captados durante el periodo comprendido del año de 1992 hasta el 2016 y que cuenten con un resultado negativo para DPI parciales intragénicas a través del estudio molecular de mPCR de 22 exones del gen *DMD*.

### Criterios de Selección

#### Criterios de inclusión.

- Pacientes del sexo masculino referidos con el diagnóstico presuntivo de distrofinopatía, ya sean casos únicos o familiares (con patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X) pero con estudio molecular de 22 exones negativo a DPI parciales intragénicas del gen *DMD*.
- Que cuenten con CPK elevada, Electromiografía (EMG) con patrón miopático y biopsia muscular con inmunohistoquímica con distrofina alterada.

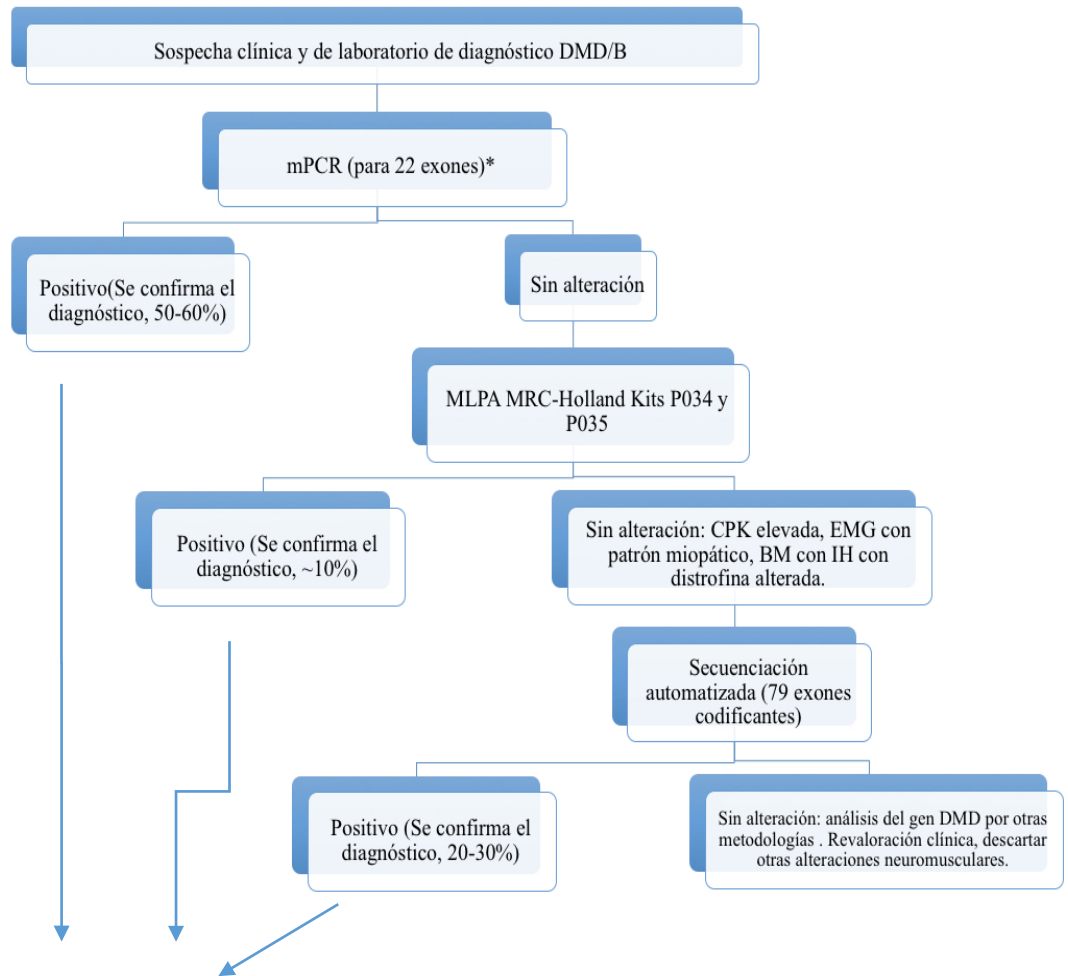
#### Criterio de exclusión.

- Pacientes en quienes no se pueda obtener una suficiente muestra de ADN genómico a partir de sangre periférica o cuya muestra de ADN bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular, fuera inadecuada y no acepten una segunda toma de muestra.
- Temporal: Pacientes trasfundidos en un periodo de 3 meses.

## Material y Métodos

Se incluyeron pacientes en edad pediátrica (intervalo de edad calculado de pacientes con expediente clínico disponible: 4a-14a) que acudieron a los servicios de Genética y/o Neurología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y en quienes se diagnosticó una probable distrofinopatía (DMD/B) con base en los antecedentes familiares, manifestaciones clínicas, estudios de laboratorio, gabinete y/o histopatológicos (**figura 6**). Se inició el estudio molecular de los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios:

- a) Con o sin antecedentes familiares de la enfermedad (casos familiares y únicos respectivamente).
- b) Con estudio negativo para DPI por mPCR de 22 exones (3, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 43 al 45, 47 al 55, 60 y el promotor de la isoforma muscular-exón 1, amplificados en 4 reacciones por separado [38]).
- c) Disponibilidad de muestra analizable de ADN genómico que es parte del banco de ADN que está bajo resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del INP.



- Relación fenotipo-genotipo
- Identificación de portadoras
- Identificación del origen de la mutación
- Asesoramiento genético
- Diagnóstico prenatal

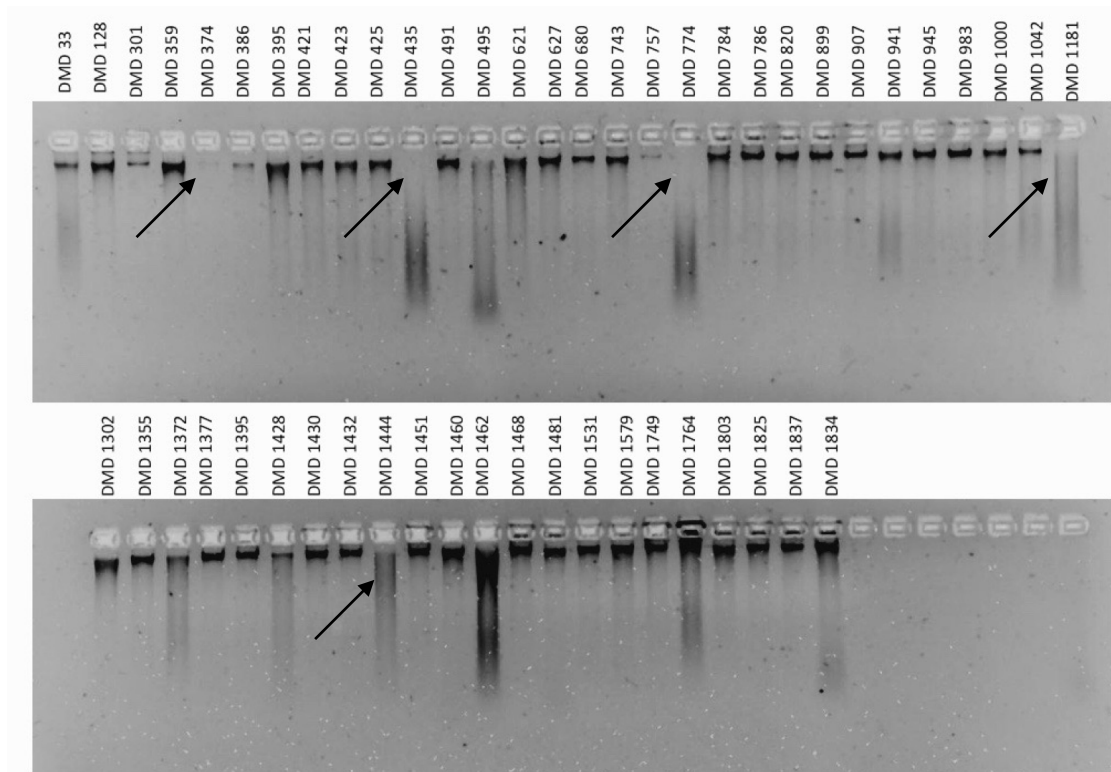
**Figura 6.** Esquema que representa el algoritmo metodológico seguido en el presente estudio.

\*El estudio de mPCR no se realizó como parte del protocolo, sólo como criterio necesario para incluir pacientes sin DPI en 22 exones.



## Preparación de las muestras de ADN

Las muestras de ADN genómico de los pacientes seleccionados fueron sometidas a una prueba de integridad en un gel de agarosa al 1% TBE 1X teñido con bromuro de etidio (**figura 7**). Posteriormente se realizó la cuantificación y valoración de pureza por espectrofotometría (Nanodrop 2000). Se consideró como muestra con pureza aceptable aquella cuyo cociente de absorbancia 260/280 o 260/230 fuera mayor a 1.6. Se hizo la preparación de alícuotas de [30 ng/μl] y se utilizaron 150 ng de ADN genómico para realizar cada reacción de MLPA. Las muestras de los pacientes seleccionados para seguir a la siguiente etapa del proyecto (Secuenciación Automatizada) se prepararon de manera similar, pero se utilizaron alícuotas de [10 ng/μl] y se utilizaron 10 ng de ADN purificado de cada exón para realizar cada reacción de PCR. Aquellas muestras que mostraron degradación total fueron retiradas del ensayo de acuerdo a los criterios de exclusión del protocolo.



**Figura 7.** Ensayo para integridad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado con UV. En cada pozo se indica la clave de la muestra. Se señala con flechas aquellas que se eliminaron del ensayo debido a degradación y/o cantidad insuficiente para el ensayo de MLPA y/o secuenciación automatizada tipo Sanger.

## Ensayo de MLPA

Se utilizó el kit SALSA MLPA con las sondas P034-B1/P035-B1 DMD/Becker (MRC Holland®, Amsterdam, Netherlands) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La técnica analiza la dosis génica (en varones 0 copias= DPI, 2 copias=duplicación e incluso 3 copias: triplicación; en mujeres 1 copia: portadora de DPI, 2 copias: dosis normal, no portadora de duplicación o delección; 3 copias= portadora de duplicación) de los 79 exones de la isoforma muscular y el primer exón de la isoforma neuronal (total: 80 exones). Los amplicones generados y marcados con el fluorocromo 6-FAM se analizaron mediante electroforesis capilar en la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica. El análisis de fragmentos resultante se realizó mediante el programa Coffalyser.Net En todos los ensayos se incluyeron como controles 2 varones con dosis génica normal para todos los exones del gen *DMD* y una muestra de agua como control blanco de la reacción.

El programa Coffalyser.Net a partir del análisis de fragmentos, obtiene el promedio de la fluorescencia de los controles para cada uno de los 80 fragmentos derivados del gen *DMD*, de las sondas de referencia para la normalización intra-ensayo y de las sondas control para valorar la eficiencia de la reacción (que incluyen 9 fragmentos de control que generaron productos de 64 a 105 nt: 4 son Fragmentos de Cantidad de ADN o Fragmentos-Q, 3 son fragmentos de desnaturalización de ADN o Fragmentos-D y dos fragmentos específicos para el cromosoma X y para el cromosoma Y, (**figura 3**). Después compara cada una de las muestras problema con dicho promedio y se documentan las diferencias estadísticamente significativas con base en el número de copias de los fragmentos indicativos de delección/duplicación/triplicación de dosis.

**Tabla 2.** Sondas del kit contenidas en el kit SALSA MLPA P034-B2 DMD-1 probemix.

Tamaño (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica	
		Referencia	DMD
64-70-76-82	Fragmentos Q (visibles sólo con menos de 100ng de muestra de ADN)		
88-92-96	Fragmentos D (Señales bajas de los fragmentos de 88 o 96 nt indican desnaturalización del ADN incompleta)		
100	Fragmento- X (Específico a cromosoma X)		
105	Fragmento- Y (Específico a cromosoma Y)		
130	Sonda de referencia 13499-L02104	Xp11	
142	Sonda DMD 01353		Exón 1
149	Sonda DMD 18831		Exón 41
157	Sonda DMD 01355		Exón 21
165	Sonda DMD 01356		Exón 61
172	Sonda DMD 01357		Exón 2
178	Sonda de referencia 07655- L07361	Xp11	
187	Sonda DMD 01711		Exón 42
193	Sonda DMD 18998		Exón 22
199	Sonda DMD 01897		Exón 62
205	Sonda de referencia 07672-L26039	Xp22	
213	Sonda DMD 01361		Exón 3
220	Sonda DMD 18221		Exón 43
226	Sonda DMD 19138		Exón 23
231	Sonda de referencia 00821- L09487	Xp22	
241	Sonda DMD 01364		Exón 63
247	Sonda DMD 01365		Exón 4
254	Sonda DMD 01366		Exón 44
262	Sonda DMD 01958		Exón 24
268	Sonda DMD 01368		Exón 64
278	Sonda de referencia 05893-L08952	Xq22	
284	Sonda DMD 01954		Exón 5
291	Sonda DMD 01370		Exón 45
303	Sonda DMD 01371		Exón 25
312	Sonda DMD 19002		Exón 65
319	Sonda DMD 01373		Exón 6
325	Sonda DMD 01374		Exón 46
332	Sonda DMD 01375		Exón 26
341	Sonda DMD 01376		Exón 66
346	Sonda de referencia 03149-L14468	Xq21	
357	Sonda DMD 01713		Exón 7
364	Sonda DMD 01378		Exón 47
373	Sonda DMD 01379		Exón 27
381	Sonda DMD 01960		Exón 67
391	Sonda DMD 19004		Exón 8

**Continúa en la siguiente página**

Tamaño (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica	
		Referencia	DMD
398	Sonda DMD 01382		Exón 48
405	Sonda DMD 01716		Exón 28
413	Sonda DMD 02482		Exón 68
420	Sonda de Referencia 00820-L25090	Xq26	Exón 1
427	Sonda DMD 01385		Exón 9
436	Sonda DMD 19006		Exón 49
445	Sonda DMD 01387		Exón 29
454	Sonda DMD 19341		Exón 69
461	Sonda de Referencia 05632-L26218	Xq28	
469	Sonda DMD 01718		Exón 10
476	Sonda DMD 19340		Exón 50
483	Sonda DMD 19008		Exón 30
493	Sonda DMD 01392		Exón 70
500	Sonda de referencia 10764-L25900	Xq23	

**Tabla 3.** Sondas del kit SALSA MLPA P035-B1 DMD-2 probemix.

Tamaño (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica	
		Referencia	DMD
64-70-76-82	Fragmentos Q (visibles sólo con menos de 100 ng de muestra de ADN)		
88-92-96	Fragmentos D (Señales bajas de los fragmentos de 88 o 96 nt indican desnaturalización del ADN incompleta)		
100	Fragmento- X (Específico a cromosoma X)		
105	Fragmento- Y (Específico a cromosoma Y)		
130	Sonda de referencia 13498-L06679	Xp22	
141	Sonda DMD 01393		Exón 11
148	Sonda DMD 01394		Exón 51
157	Sonda DMD 01395		Exón 31
166	Sonda DMD 18996		Exón 71
171	Sonda DMD 18997		Exón 12
177	Sonda de referencia 03110- L22383	Xq21	
187	Sonda DMD 02059		Exón 52
193	Sonda DMD 18999		Exón 32
199	Sonda DMD 01949		Exón 72
211	Sonda DMD 19001		Exón 13
219	Sonda DMD 01892		Exón 53
226	Sonda DMD 19140		Exón 33
232	Sonda de referencia 07669-L07375	Xp22	
239	Sonda DMD 01893		Exón 73
247	Sonda DMD 19338		Exón 14
254	Sonda DMD 01894		Exón 54
263	Sonda DMD 01901		Exón 34
269	Sonda DMD 01902		Exón 74
276	Sonda de referencia 02900-L26167	Xq26	
283	Sonda DMD 19141		Exón 15
291	Sonda DMD 01411		Exón 55
297	Sonda de referencia 06476-L26037	Xp22	
303	Sonda DMD 15720		Exón 35
310	Sonda DMD 01413		Exón 75
319	Sonda DMD 02060		Exón 16
325	Sonda DMD 19003		Exón 56
332	Sonda DMD 01416		Exón 36
342	Sonda DMD 01417		Exón 76
350	Sonda de referencia 08245.L09531	Xq26	
358	Sonda DMD 01952		Exón 17
364	Sonda DMD 01419		Exón 57
372	Sonda DMD 03038		Exón 37
381	Sonda DMD 01421		Exón 77
388	Sonda DMD 01891		Exón 18

Continúa en la siguiente página

Tamaño (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posición cromosómica	
		Referencia	DMD
396	Sonda DMD 01423		Exón 58
407	Sonda DMD 19372		Exón 38
413	Sonda DMD 19342		Exón 78
422	Sonda de referencia 06187- L26204	Xq13	
427	Sonda DMD 19005		Exón 19
436	Sonda DMD 01427		Exón 59
445	Sonda DMD 19007		Exón 39
453	Sonda DMD 19142		Exón 79
466	Sonda DMD 01430		Exón 20
472	Sonda DMD 01431		Exón 60
481	Sonda DMD 19009		Exón 40
490	Sonda DMD 01433		Exón 1 de Dp427c
500	Sonda de referencia 10764-L25900	Xq23	

## Ensayo de Secuenciación automatizada tipo Sanger

Se seleccionaron 10 pacientes de 47 con MLPA normal que contaran con datos clínicos altamente sugestivos de distrofinopatía para la fase de secuenciación automatizada tipo Sanger completa del gen *DMD*. Las características de estos pacientes se enlistan en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Datos clínicos de los pacientes seleccionados para la fase de secuenciación automatizada.

<i>Paciente</i>	Dx Clínico	Antecedentes heredofamiliares	Cuadro clínico	Valor de CPK	EMG con patrón miopático	Biopsia Muscular	IH
<i>DMD-1187</i>	DMD	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente
<i>DMD-1777</i>	DMD	Único	✓	✓	✓	NR	NR
<i>DMD-1789</i>	DMD	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente
<i>DMD-1793</i>	DMD	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina con patrón irregular
<i>DMD-1801</i>	9a y deambula	Único	✓	✓	✓	NR	NR
<i>DMD-1847</i>	9a y deambula	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente
<i>DMD-1852</i>	DMD	Único	✓	✓	NR	NR	Distrofina ausente
<i>DMD-1372</i>	DMD	Familiar	✓	✓	✓	NR	NR
<i>DMD-1837</i>	11a y deambula	Familiar	✓	✓	NR	NR	NR
<i>DMD-1825</i>	11a y deambula	Familiar	✓	✓	✓	NR	NR

IH: Inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular, EMG: Electromiografía, \*NR: No realizado.

Se realizó la amplificación de los 79 exones codificantes de la isoforma muscular (Dp427m, NM\_004006.2) con un total de 78 pares de primers descritos previamente [39] (**tabla 5**). Los primers forward se sintetizaron con la secuencia universal M13-Forward (5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3') ubicada en el extremo 5' para realizar con un solo primer la secuenciación unidireccional de todos los amplicones. Las amplificaciones de estos exones fue corroborada con un gel de agarosa al 3% Tris (Tris-hidroximetil-aminometano), Ácido Bórico, EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético), (TBE) 1X teñido con bromuro de etidio (**figura 7**). El servicio de purificación enzimática (con ExoSap de Affymetrix, USA) que es una solución comercial compuesta por dos enzimas: Exonucleasa 1 que degrada fragmentos de ADN de cadena sencilla y la Fosfatasa alcalina que hidroliza los dNTPs) y de secuenciación automatizada tipo Sanger se solicitó a la compañía MacroGen USA (<https://www.macrogenusa.com/>).

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa CodonCode Aligner © V. 6.0.2 donde cada electroferograma obtenido fue alineado con las secuencias de referencia NM\_004006.2 y NG\_012232.1. Los cambios observados se anotaron de acuerdo a la evaluación del programa Mutalyzer (<https://mutalyzer.nl>) para corroborar la posición, la nomenclatura correcta y el posible efecto a nivel de proteína de cada variante identificada.

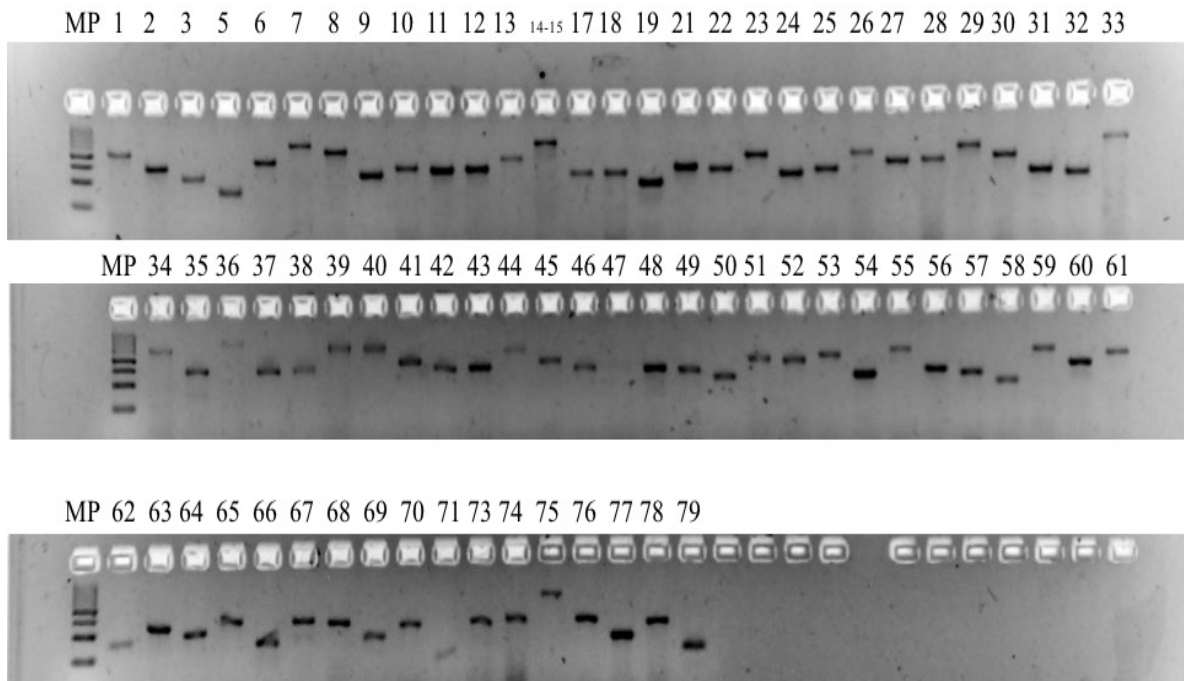


**Tabla 5.** Secuencia de los primers utilizados para la amplificación de los 79 exones del gen DMD.

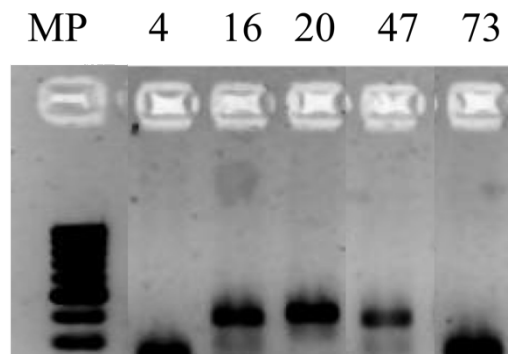
Exón	Forward	Tm	Reverse	Tm	Fragmento amplificado
1	TTGGGATCACTCACTTTCCC	57.12	AAGAAATCATGTGTTTAGTTCTATCG	56.15	483
2	CCCCAAACCAGCATCACTC	58.43	TGCACAGCTAAAATAAAATGACAC	56.75	350
3	TTTCAAAGGGGATAATCGTG	54.16	TTGCTGTTCAATCAGTACCTAGTC	59.07	288
4	GGTTTCATTTCTAGTAGATTGTCGGG	59.74	AGCCCTCACTCAAACATGAAG	58.21	211
5	TTGCAACTAGGCATTTGGTC	56.61	CACATTTGTTTCACACGTC AAG	57.00	233
6	TTGGCCCTAAAATTCTATTTATCAC	56.3	TGCAACGTTAGATCAATGTGG	56.9	427
7	TTCTGGGCTCAAAGGATCTG	57.2	GCTCCATCCATAGGGCATA C	57.59	646
8	TTTTAGGCCTCATTCTCATGTTC	56.84	TGAAGCAAAATTGAAAAGGTTTAG	55.05	522
9	TTCTACCATGTTGGAAGTAGTCC	58.2	CGAGGAGATAAAAAGGCACTG	55.95	321
10*	TTCGATTCATCATTTAATGTACTGG	55.78	CAAGGATGTAAGAGAGTAATTGAGG	56.98	358
11	CAAAACCACACCGATTTACC	55.19	GGGAACAAACTGAGAATCGTAAC	57.72	346
12*	CCCAAATGCGAACATTC	51.36	CATCAACCATGTCATCTGTGTTAC	58.13	349
13	AGAAAATTGGCTTGAATGG	54.38	TCTTTAAATCACAGCACTTCAGC	57.64	434
14-15	GTCCCTTCCAATTCTAGCG	57.99	AAAACAAAGTTGAAAATCCACC	54.21	635
16	CTATAGTGGTGTATGGAATGCAAC	57.45	AAACTAATCTGGTTGCTTCTTTTG	56.36	344
17	CTTTGCCACTCCAAGCAGTC	59.4	CCAACAAAAGTCTGTAAATGAG	56.86	316
18	ACTAATAGAGGTGTCAGGCAGG	58.97	GCACGGAGTTTACAAGCAGC	60.11	311
19	CAGAGTGAAACATCTTAAGGCTTG	58.06	CAGCTGATAAATATGAACCTATGTG	55.91	265
20	GATCATTTCCTTCAGTCTGTGGG	57.44	TGGAAATTGCCAAGAAATACC	54.69	362
21	TTAAGCTAAACTGCCTTACTGC	57.38	TACCTTCTGGATTTCCCCAC	56.51	353
22	GGAAAACATGGCAAAGTGTG	56.03	TGCTCAATGGGCAAAC TACC	58.46	333
23	CATCTACTTTGTTACATGTTGAATC	56.07	AAGATGCTGAAGGTCAAATGC	57.14	436
24	TGGGCCTGTGTTTAGACATAAC	58.32	GGGAGAGGAGAGCAAAATCC	57.66	304
25	TGCCATCAGTCCAATTTTAC	56.49	CGGTGAAGGGAGACATTAGG	57.4	326
26	TCTGATCCCCATGAGTTATTTTC	56.05	TCTTAGAAC CAGGAAAGAGCAG	57.46	437
27	TCTAACTGGGATGTTGTGAGAAAG	58.45	GCCAAAGTTGTTTGC ACTG	56.91	388
28	TGCATTTGAATTACCTGCTAC	55.34	CTCTTGGGTTGTTTCTTTGG	55.51	376
29	CAAGTTTAAAGTTCTCAGTCCGC	58.23	CAGTGTCTGGCATTGGATTG	57.07	524
30	AAAAGGTGATTGTGGAAGAGTC	56.54	CAAATCAGTGAATCAAAA CAACC	55.25	397
31	GGTGGTTGAGGAGAGTTTCTG	58.23	TGCTCTCAAATCCAATCTTGC	56.50	304
32	CCAGTTATTGTTGAAAGGCAAA	56.43	AATGAGGAAAGTCAAGGGGTA	56.24	281

33	TGCAAAAGCTAGATATTGACCAC	57.1 8	CTGAATAAGCAGAGCCTCACTG	58.8	578
34	ACAAACGATGTCATCTGCC	58.5 5	CATGGCTCTGAAAAGCACAG	57.0 0	530
35	CAGAAAGCCGTTTCATAAGC	55.3 7	TTTTCAAACACAGAATTGTTACTGG	56.9 4	344
36	TGACCAGTAACAATTCTGTGTTG	57.8 7	CTGAACGGAGTTTACATTGGG	56.9 0	623
37	GCTCACACGCTCTGTTTGG	59.4 3	AGAGTACTGCGCAACCTTCG	60.3 9	327
38	AATGCATGTGATTAGTTTAGCAAC	56.5 6	TGTGCTCTGAAAATTCAGTTGG	57.4 3	329
39	TGGGAGGAACTTATTTTGAAC	55.3 1	CCATAACTTTTAAGCAACACATCG	57.1 5	531
40	AATAACTGCAGCCAGAAGTGC	59.1 8	GAAGTCGTCCATATACCGATAAGTC	58.6 9	539
41	CTTGCAAGTCGGTTGATGTG	57.6 8	TGAGGGAAACCACTCACTTTC	57.7 9	391
42	TGGAGGAGTTTCACTGTTAGG	59.3 6	ATTTAAGTCAATTGTTCTGGCAC	56.0 0	335
43	CACCATTGCTACCTTTGGG	56.9 6	CTGAAATAAATTCTACAGTTCCTG	55.9 5	348
44	TGCAACCTTCCATTTAAATCAG	55.9 7	TTCCATCACCTTCAGAACC	57.1 2	477
45	TTTCTTGGCAGTACAACCTGC	57.2 9	TTAGTGCCTTTCACCCTGC	57.6 6	385
46	ATGTTTGTGTCCAGTTTGC	57.1 1	TAATGGGCAGAAAACCAATG	54.1 1	325
47	CAAGGTAGTTGGAATTGTGCTG	57.8 4	ACATACCAGCCTCCTCCCC	60.3 8	315
48	ATTTTGGCTTATGCCTTGAG	54.2	TGATACCAAATGAGAAAATTCAGTG	56.1 1	322
49	AAATTGATCTGCAATACATGTGG	55.8 6	TTTCACTGATTATAAATAGTCCACGTC	57.6 9	307
50	TTCACCAAATGGATTAAGATGTT	55.6 7	TTTTCTCTCACCAGTCATC	57.4 6	276
51	TTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC	57.4 3	CTGGTGGGAAATGGTCTAGG	57.2 8	402
52	AAGTGTTTTGGCTGGTCTCAC	58.9 8	AAAAGGTAACATTATGGACTGAAAAT C	56.8 5	381
53	AACATAAATGTGAGATAACGTTTGG	56.4 3	TTCAGCTTTAACGTGATTTTCTG	56.0 5	430
54	ACGAAGTATTTAAGACACTCCAAC	57.5 8	CAGTTTACCACCCATTATTAC	57.4 2	294
55	TTGTTGCTTAAAGGAAGAGCTG	57.1 6	TCCTCCTGTCCAAATACCG	56.9 3	484
56	TCCAAATTCACATTCATCGC	54.6 6	CCAGTTACTTGTGCTAAGACAATGAG	60.1 3	329
57	TTTCAATGGAATTGTTAGAATCATC	54.4 2	AAAATAGTCACTGGATTACTATGTGC	57.5 6	295
58	ACAAGTCTGAGCACCCAGG	59.8 9	TCCGTCACCACTGATCCTTC	59.1 0	256
59	AAAAGCCGTTAATCAGTAGGTTAC	57.2 7	TTGTGGGAAGATAAACACTGCAC	59.4 3	483
60	ACTGGCACTGCACCCTAAAG	60.2 5	CCTATCCTCACAAATATTACCATGAAC	58.0 0	365
61	CGAGTCTGGAATACTATATACGGTAA G	58.4	TTGGCCTTCTCTTCCCTAAC	56.8 3	437
62	TGTTGTCTTCTGTTTGGC	57.1 6	TAGGCCAGGCTAATGTGCG	59.5 5	228
63	ATTCCGAATGGTTCAAAGC	54.8 4	CACCCTTGAAACAATCTAGTGATG	57.8 1	295
64	GTTATGGCAAATCACTGGG	54.9 1	TGACAGCTGTTTCTCCCTC	59.3 1	265
65	GGACACTGAAAGGAAGTTTTAC	57.5 7	TGTACGCTAAGCCTCCTGTG	59.4 7	317
66	AAGTGTACCCTCTAGGAAAGG	57.5	TCATTTCCCATCTAGAACTAGGG	56.8 5	219

67	TTGCTACTGGAATTGAGTTGG	56.1 6	AGAAAACGAAGCTCTGTGGG	58.1 2	330
68	TGCCTTCTTTCCTTTCATCC	55.6 2	CTAACAGCAACTGGCACAGG	59.1 2	317
69	TTCTTTGGGAATTTGATTCCG	52.0 2	AAAACGAAATTTATCCCAGGTG	55.3 7	227
70	GGGCAGAAGACTGGAGTGG	59.7	GCTGAGAGGAGTTCAAATATACATC	57.3 5	274
71	TTTTGCGGCTGAGTTTGC	57.2 7	AGAACCAAGCGAGCGAATG	58.5 4	154
72	TGTATAACATAACTGTGTGGTGGG	58.5 1	GGAATCAGACAAGTTTGGGG	56.3 1	260
73	CAGGAATCTTCGATTAGGTCTTG	56.7 7	TGTGCTATCCTACCTCTAAATCCC	59.1 6	220
74	CCCAAAGCAAATAAGGGG	54.1 7	AAGATTCTGGCACTTTTCTATG	56.8 3	290
75	TTTGCTTGCTGTTCTTCGG	56.7 6	TCACTTGCAGGCACATAACC	58.4 7	516
76	AAAATTTATGAGTCCTGAGTGTGTAT C	57.8 3	ACGGCCAAATATTCATGTCC	56.1 7	300
77	AATCATGGCCCTTAATATCTG	53.9 6	GGGTAGGGAAGCGAGTGG	59.1 0	225
78	TGGTAAAAGAAGCAAATTGGTATG	56.1 6	GCTGCAAGTGGAGAGGTGAC	60.9 5	282
79	TTCCCAAATGGCAAAGAAAC	54.9 3	TCTGCTCCTTTCATCTGTC	57.1 2	176



**Figura 8.** Ensayo para verificación de amplificación de 78 fragmentos obtenidos para la posterior secuenciación automatizada. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo LUV. En la imagen se muestran los 74 fragmentos amplificados en uno de los 10 pacientes para secuenciación automatizada. En cada pozo se indica el número de exón amplificado. Los exones (4, 16, 20, 47 y 72) en este ensayo se sometieron a un programa de PCR distinto y con condiciones especiales se muestran en la **Figura 9**.

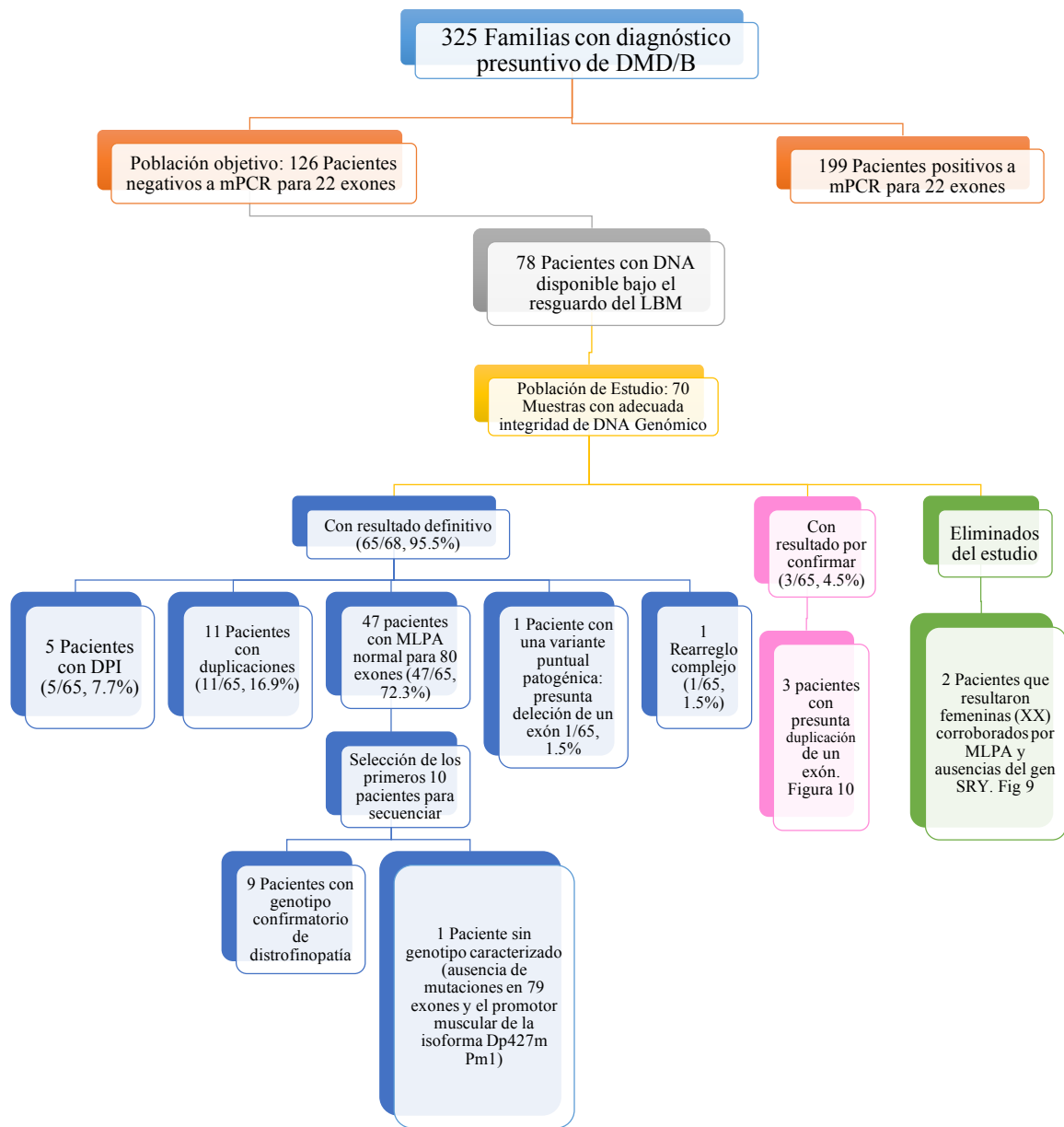


**Figura 9.** Ensayo para verificación de amplificación de los fragmentos correspondientes a los exones 4, 16, 20, 47 y 73 obtenidos para la posterior secuenciación automatizada. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo LUV con condiciones de amplificación: 3.3 mM final de Mg Cl<sub>2</sub> 50 pmol/rxn primers (F/R), PCR enh. Sol. Invitrogen 10x [Final 2X], buffer Invitrogen (con sulfato de amonio) 0.5ul, DNTP's [10Mm]. Taq polimerasa Alt Enzy [2UI/rxn]

## Resultados

### Datos clínicos y de laboratorio/gabinete de los pacientes seleccionados

En este estudio se incluyeron 70 pacientes no relacionados con sospecha diagnóstica de distrofinopatía (DMD=14, DMB=4, fenotipo intermedio=1, no referido=41, conservan la marcha=10) cuyas muestras de ADN genómico fueron de calidad adecuada; 25 de ellos contaban con antecedentes familiares y 45 fueron catalogados como casos únicos. La sospecha diagnóstica se hizo con base en los datos clínicos (debilidad muscular proximal 37.1%, n=26), estudios de laboratorio (CPK 58.5%, n=41; EMG con patrón miopático 24.3%, n=17), estudio histopatológico (biopsia muscular con cambios distróficos 27.1%, n=19) y evaluación con inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular (distrofina ausente, 17.1% n=12) (**figura 10**). Todos ellos contaban a su ingreso con un estudio negativo a DPI en el gen *DMD* por mPCR de 22 exones.

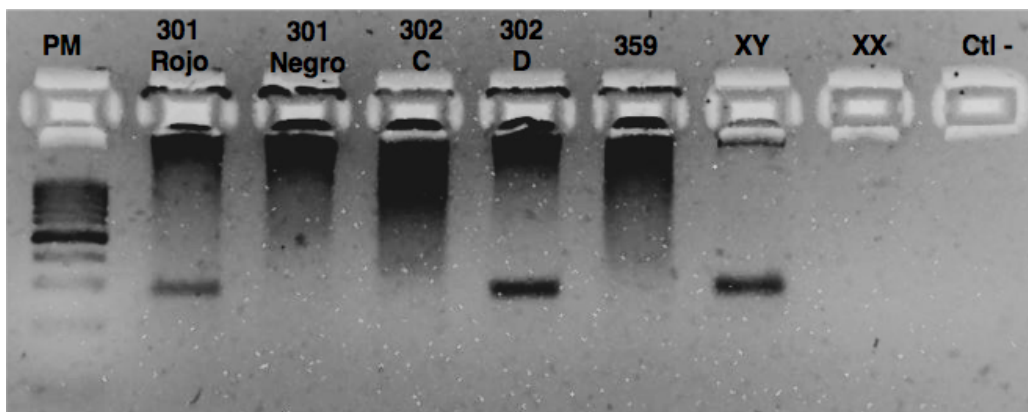


**Figura 10.** Esquema general que ilustra la selección y los resultados generales de los pacientes incluidos en el presente estudio.

## Fase I del estudio molecular: Amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA) para el estudio de DPI infrecuentes y duplicaciones en el gen *DMD*

### Muestras eliminadas por resultar con complemento sexo cromosómico XX.

Las muestras DMD-301 (fecha de captación 28/10/91) y DMD-359 (fecha de captación 01/04/93) fueron identificadas por MLPA con complemento sexo cromosómico XX (femeninos) (**figura 11**) y corroborado por ausencia del gen *SRY*, razón por la cual fueron eliminadas del estudio. Las muestras DMD-301 Rojo y DMD-302 D que resultaron con *SRY* positivo se les realizó la prueba de mPCR y presentaron una DPI del exón 45 por lo que no se les incluyó en el estudio.



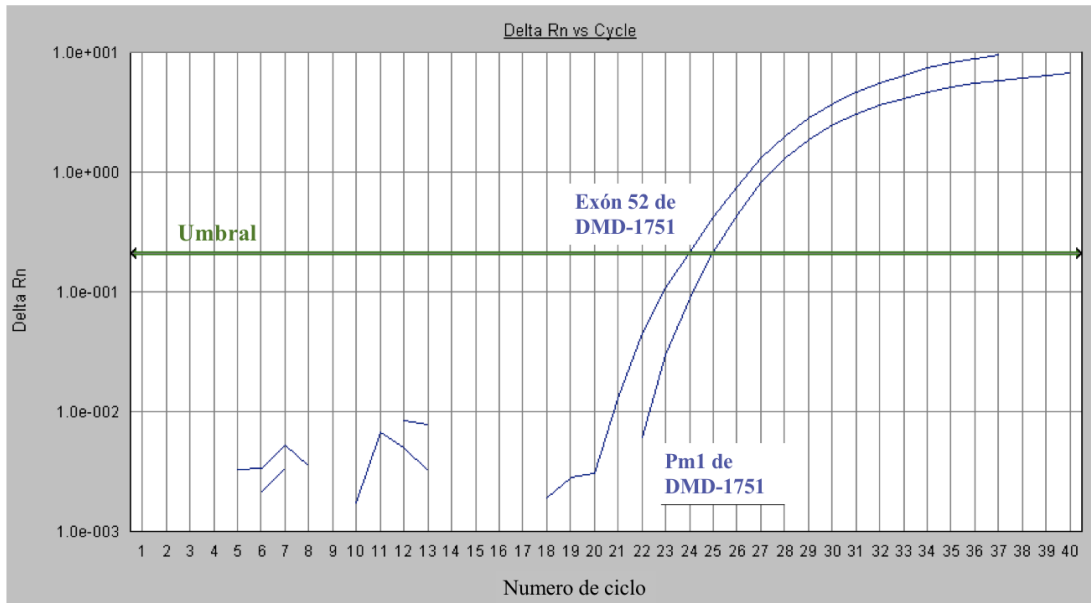
**Figura 11.** Ensayo de PCR realizado para la corroboración de sexo en las muestras DMD-301 (caso índice), DMD-302 (Madre de DMD-301) y DMD-359 (Caso índice) que resultaron con incongruencia de complemento sexocromosómico en el estudio de MLPA. No se contó con la muestra de DMD-360 (Madre de DMD-359) para incluirla en el estudio. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo LUV. Se tenían en la reserva del banco de ADN dos tubos de ADN stock para el paciente DMD-301 (muestras 301-Rojo y 301-negro) y 2 tubos con ADN stock para DMD-302 marcados con "C" y "D" y un sólo tubo de ADN stock para DMD-359; las 5 muestras se amplificaron para el gen *SRY* en una PCR punto final. El carril XY contiene una muestra de varón; el carril XX contiene una muestra femenina y en el carril siguiente está el control negativo, agua bidestilada. PM: marcador de tamaño molecular (escalera de 100 pb).

### Identificación de DPI/duplicaciones en el gen *DMD* por MLPA.

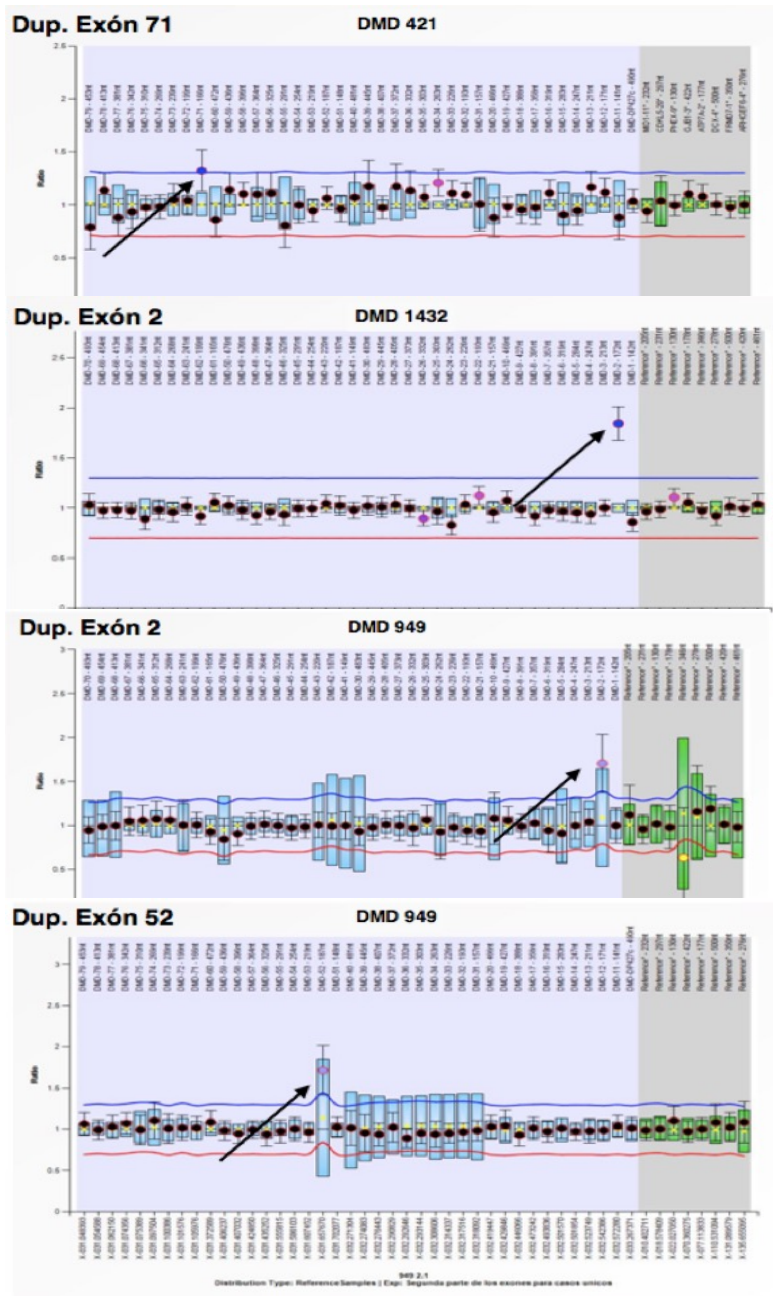
Se identificaron DPI (7.35%, n=5/68) o duplicaciones (16.2%, n=11/68) en el 23.5% de los 68 pacientes, un rearrreglo complejo lo que representa el 1.4% (n=1) y una variante puntual de tipo transversión identificada por aparente deleción del exón 21 (1.4%, n=1). De las 11 duplicaciones, 3 involucraron sólo el exón 52 pero fueron corroboradas por PCR en tiempo real (PCR-tr): (3/11, 27.3%, **figura 12**). La corroboración por PCR-tr o un ensayo semicuantitativo de las duplicaciones de un solo exón (pacientes DMD-421: duplicación del exón 71; DMD-943: duplicación del exón 2 y 52; y paciente DMD-1432: duplicación del exón 2) está en curso (**figura 13**). El rearrreglo complejo identificado incluye una duplicación no continua de los exones 45-50 y 63-79 (**figura 14**). El 69.12% (n=47) restante presentó una dosis génica normal para los 80 exones analizados por MLPA.

En cuanto a las DPI, se identificaron 3 que no fueron detectadas por la mPCR (DMD-128, deleción del exón 45 con fecha de captación de 1990; DMD-386 con deleción de los exones 7-9 y fecha de captación de muestra de 1993 y DMD-1355 con deleción de los exones 31 al 43 con fecha de captación del 2004). Se identificaron 3 que incluían un solo exón (DMD-1834 deleción del exón 18, DMD-1803 deleción del exón 21 y anteriormente mencionado DMD-128 deleción del exón 45, **figura 15**) que requirieron ser confirmadas por PCR punto final específico para cada exón. Con este ensayo se confirmaron las DPI de los exones 18 y 45 (ensayo no mostrado), sin embargo la muestra DMD-1803 con aparente deleción del exón 21 (**figura 15**) sí amplificó con los primers de PCR punto final (**figura 16**), por lo que estaba indicada la secuenciación de dicho fragmento para descartar variantes que interfieren con la hibridación y subsecuente ligación de las sondas de este exón: La secuenciación del exón 21 de este paciente identificó la variante puntual tipo transversión c.2707G>T que interfiere con el sitio de hibridación y ligación de la sonda y resulta en la generación de un codón de paro prematuro a nivel de la posición 903 de la distrofina: p.(Gly903\*) (**figura 17**). Esta mutación no ha sido descrita en las Bases de Datos de Leiden (<http://www.dmd.nl>) ni en la UMD-DMD Francesa ([http://www.umd.be/DMD/W\\_DMD/index.html](http://www.umd.be/DMD/W_DMD/index.html)). Los resultados del análisis de MLPA se encuentran en la **tabla 6**.

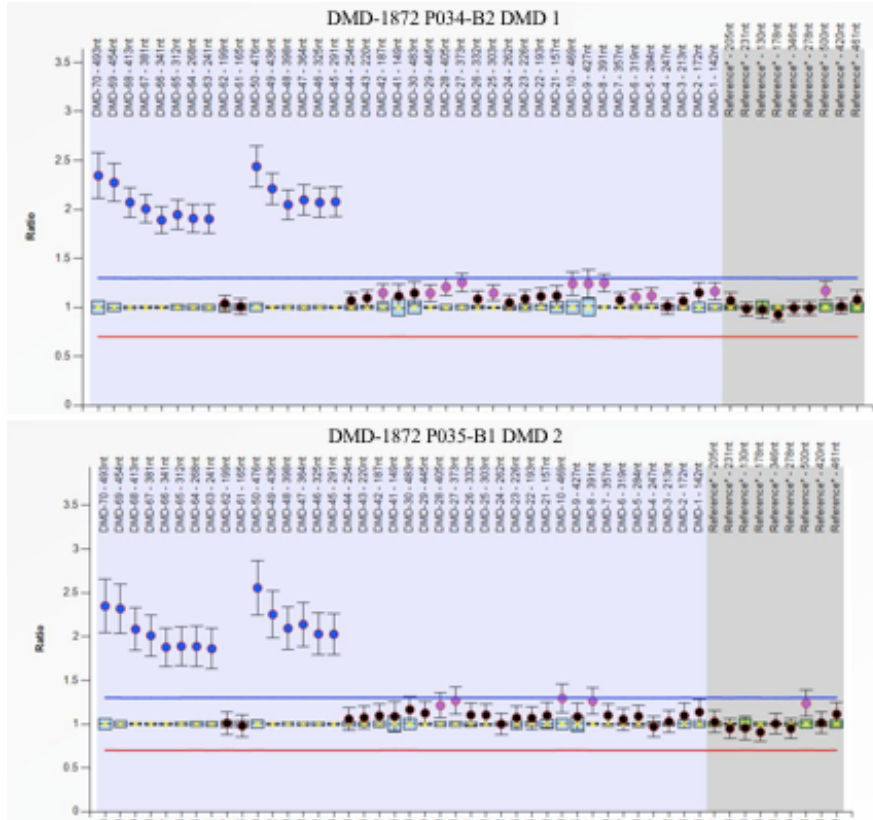




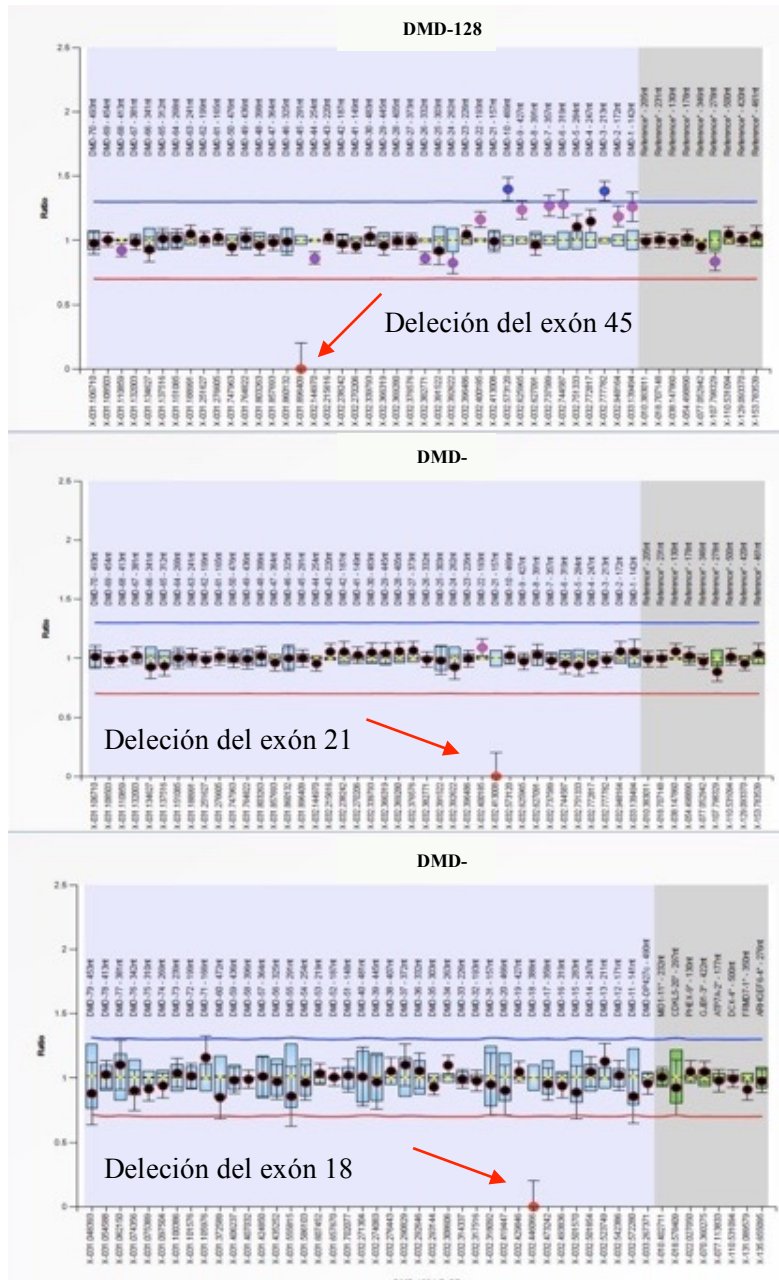
**Figura 12.** Ensayo de PCR-tr para confirmación de dosis génica en el paciente DMD 1751. En la imagen se puede observar la amplificación de dos exones del mismo paciente, el exón 52 (exón duplicado) y el promotor de la distrofina muscular (control intramuestra). El ciclo en el que la fluorescencia en la muestra cruza el umbral se conoce como ciclo umbral y es inversamente proporcional al número de copias del amplificado, por lo que en la imagen se puede observar que el exón 52 tiene el doble de copias que el Pm1 ya que la curva de fluorescencia cruzó el umbral un ciclo antes. El ensayo se realizó con dos controles intermuestra que consisten en muestra de un varón sano y un femenino sano, además de un control negativo (sin ADN) para cada ensayo de confirmación de duplicación (controles no mostrados). La cuantificación relativa de los exones se realizó con el método  $\Delta\Delta C_t$  [40].



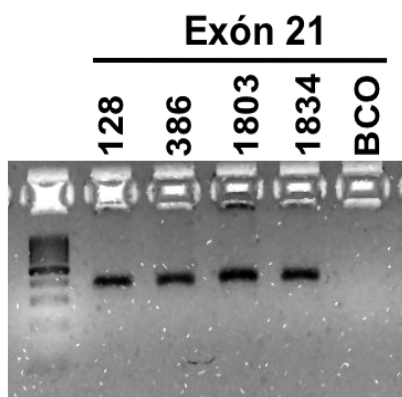
**Figura 13.** Gráficas de dosis génica de los pacientes positivos a duplicación de un solo exón por MLPA analizadas con el kit P034 B1. A) Paciente 421 muestra un dosis génica sugestiva de una duplicación del exón 71 (flecha, 2 copias). B) Paciente 1432 muestra una duplicación del exón 2 (flecha, 2 copias). C) Paciente 949 muestra dos aparentes duplicaciones no contiguas de los exones 2 y 52 (flecha, 2 copias). El índice ("ratio") en el eje vertical indica la dosis génica.



**Figura 14.** Gráficas de dosis génica del paciente DMD-1872 que presenta un rearrreglo complejo que incluye dos duplicaciones de exones no continuos (exones 45-50 y 63-79).



**Figura 15.** Gráficas de dosis génica de los pacientes positivos a delección de un solo exón por MLPA analizadas con el kit P034 B1. A) Paciente DMD-128 muestra una delección del exón 45 (flecha, 0 copias). B) Paciente DMD-1803 muestra una delección del exón 21 (flecha, 0 copias). C) Paciente DMD-1834 muestra una delección del exón 18 (flecha, 0 copias). El índice (“ratio”) en el eje vertical indica la dosis génica.

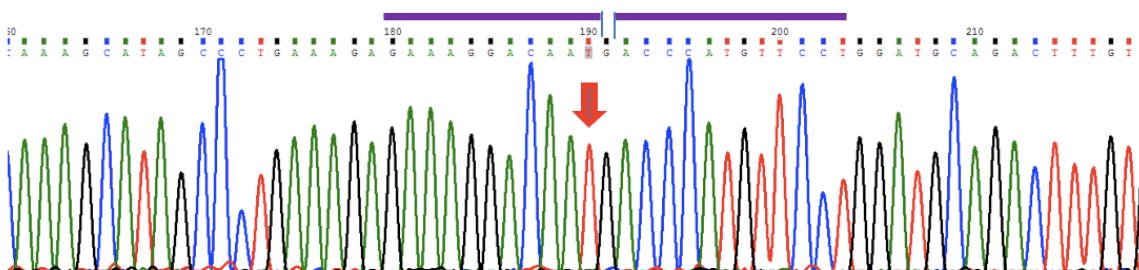


**Figura 17.** Ensayo de PCR punto final realizado para la corroboración de la deleción del exón 21 en la muestra 1803. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo LUV. Se muestran el ensayo realizado para el exón 21. Los carriles 128, 386 y 1834 corresponden a pacientes con diagnóstico de deleción de exón único por MLPA (exones 45, 8 y 18, respectivamente) y sirven de control de amplificación en este ensayo. El paciente 1803 mostró la presencia del amplicón del exón 21 aparentemente deletado en el estudio de MLPA, lo cual obligó a secuenciar dicho fragmento para descartar la presencia de variantes (polimórficas o patogénicas) que pudiesen interferir con la hibridación de las sondas (ver figura 6). Carril MPM: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb. Carril BCO: agua (control negativo).

Hemicigoto variante patogénica: NM\_004006.2:c.2707G>T (p.Gly903\*)

Sitio hibridación sondas MLPA exón 21:

GAAAGGACAAGG-ACCCATGTTCT



**Figura 16.** Análisis de Secuenciación automatizada del exón 21 en el paciente DMD-1803. Las barras violetas indican parte de los extremos 3' y 5' de las sondas del exón 21. Se señala la variante patogénica puntual sin sentido tipo transversión c.2707G>T (p.Gly903\*) que se ubica en una posición crítica dentro el sitio de hibridación/ligación de las sondas de MLPA (esquemáticas por las barras horizontales) para el exón 21 (extremo 3' de la sonda 5'), lo cual explica la aparente deleción identificada por MLPA atribuible en realidad a un impedimento en la hibridación y subsecuente ligación de ambas sondas del exón 21

**Tabla 6.** Relación de DPI/duplicaciones y un re arreglo complejo en el gen *DMD* identificados por MLPA en el presente estudio.

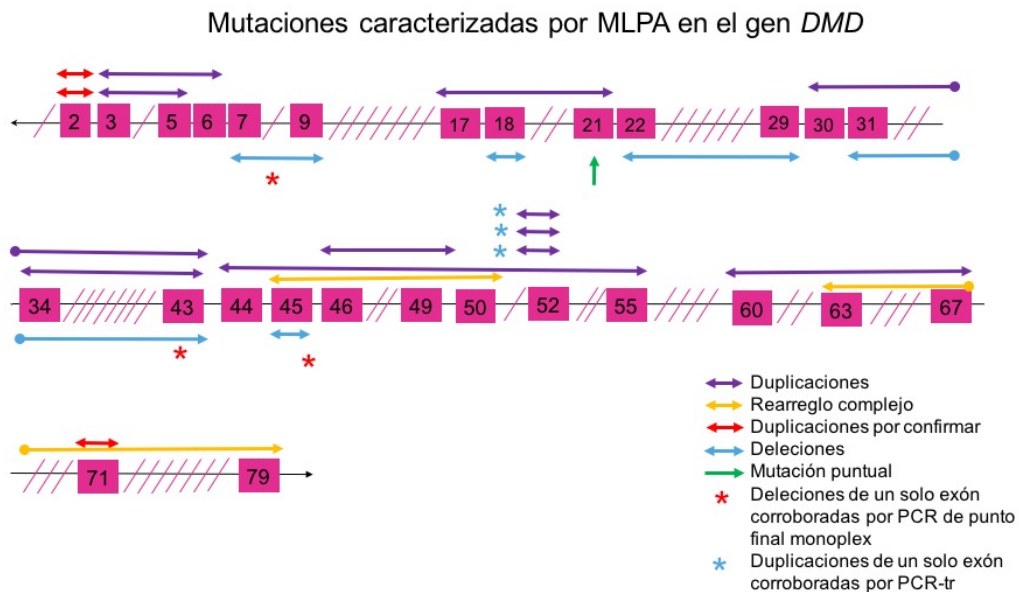
\*Según la base de datos de UMD-DMD francesa y Leiden Open source Variation Database. \*\*Datos

No.	Clave del Paciente	Alteración Encontrada	Alteración previamente descrita*	Patrón de IH para distrofina en BM	Predicción del marco de lectura**	Fenotipo referido	Técnica de confirmación	Antecedentes Familiares
<b>DPI</b>								
1	DMD-386	Del 7-9	No	-	<i>Out of frame</i>	NR	PCR punto final para exón 7 y 9	Único
2	DMD-1355	Del 31-43	Si	-	<i>Out of frame</i>	NR	PCR punto final para el exón 43	Único
3	DMD-128	Del. 45	Si	-	<i>Out of frame</i>	NR	PCR punto final para exón 45	Único
4	DMD-1834	Del. 18	Si	-	<i>Out of frame</i>	9 años 11 m y deambula	PCR punto final para exón 18	Familiar
5	DMD 1302	Del. 22-29	Si	-	<i>Out of frame</i>	NR	-	Familiar
<b>DUPLICACIONES</b>								
6	DMD-752	Dup. 3-5	Si	-	<i>In frame</i>	DMB	-	Único
7	DMD-425	Dup. 17-21	Si	-	<i>Out of frame</i>	NR	-	Único
8	DMD-1561	Dup. 30-43	Si	Irregular	<i>Out of frame</i>	DMD	-	Único
9	DMD- 1191	Dup. 52	Si	Irregular	<i>Out of frame</i>	14 años y deambula	PCR-tr	Único
10	DMD 1585	Dup. 52	Si	-	<i>Out of frame</i>	DMD	PCR-tr	Único
11	DMD 1751	Dup. 52	Si	-	<i>Out of frame</i>	14 años y deambula	PCR-tr	Único
12	DMD-899	Dup. 3-6	Si	-	<i>Out of frame</i>	NR	-	Familiar
13	DMD-1430	Dup. 34-43	No	-	<i>Out of frame</i>	NR	-	Familiar
14	DMD-907	Dup. 44-55	Si	-	<i>Out of frame</i>	NR	-	Familiar
15	DMD-1749	Dup. 46-49	No	Biopsia sugestiva	<i>Out of frame</i>	DMD	-	Familiar
16	DMD-1460	Dup. 60-67	No	-	<i>In frame</i>	Intermedio	-	Familiar
<b>REARREGLO COMPLEJO</b>								
17	DMD-1872	Dup. 45-50 y 63-79	No	-	-	12 años y deambula	-	Único
<b>Variantes patogénicas identificadas por Secuenciación tipo Sanger por aparente delección de un sólo exón</b>								
18	DMD-1803	c.2707G>T	No	-	Sin sentido	8 años y deambula	Secuenciación automatizada para exón 21	Familiar

obtenido mediante el programa de predicción de integridad del marco de lectura "DMD exonic deletions/duplications reading-frame checker 1.9" de Leiden Muscular Dystrophy pages (<http://www.dmd.nl/>). IH: Inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular, BM: Biopsia Muscular; Del: Delección; Dup: Duplicación.

## Distribución de DPI y duplicaciones en el gen *DMD*

La distribución de las alteraciones tipo deleción/duplicación /rearrreglo complejo a lo largo del gen *DMD* caracterizadas hasta el momento se ilustran en la **figura 18**. No se observa una clara preferencia en la ubicación de las 5 DPI identificadas, sin embargo la mayoría de las duplicaciones (n=9/11, 81.8%) se ubican en la región central y 3' del gen *DMD*; en la región 3' que involucra los exones 41-79 se caracterizaron 6 duplicaciones (54.5%); en la región central (exones 21-40) y 5' (exones 1-20) se ubican 2 duplicaciones (18.18%) y la última duplicación se ubica en la región 5'-central. Cabe mencionar que el exón que más veces se encontró duplicado fue el 52 (n=4/11 36.4%).



**Figura 18.** Ubicación y extensión de los rearrreglos génicos identificados por MLPA. Los cuadros y líneas diagonales rosas representan los exones del gen *DMD*.

## Correlación del genotipo *DMD* con el fenotipo

Para establecer la relación fenotipo-genotipo de cada paciente se requiere contar con el fenotipo clínico de cada paciente, el cual se asigna por la edad biológica a la que se pierde la capacidad ambulatoria sin tratamiento. Así, aquellos pacientes que pierdan la capacidad ambulatoria antes o a los 12 años se clasifican con el fenotipo más severo (DMD). Los pacientes que conserven la capacidad deambulatoria al menos hasta los 16 años se consideran con fenotipo Becker. Los pacientes que pierdan la capacidad ambulatoria entre los 12 años y los 16 años se clasificaron con fenotipo intermedio. En este caso sólo se contaba con esa información en 10 de los 18 pacientes con genotipo caracterizado por MLPA (55.5%, **tabla 6**). Hay 3 pacientes sin clasificar como fenotipo Duchenne, Becker o Intermedio ya que aún no cumplen los 12 años y por lo tanto no se puede establecer la relación fenotipo-genotipo en ellos. Dos pacientes no concuerdan con la regla del marco de lectura ya que la mutación pronostica un fenotipo severo y en ambos casos a los 14 años los pacientes siguen deambulando. Ambos han recibido tratamiento con corticoesteroides pero no por el tiempo suficiente (un año en un paciente, una semana en otro) para sustentar este comportamiento. En los 5 pacientes con datos clínicos disponibles restantes la correlación fenotipo-genotipo concuerda en un 71.4% (n=5/7) y hay una discordancia clínica con el efecto esperado por el marco de lectura resultante en un 28.5% (n= 2/7) y se pueden observar estos datos en la **tabla 7**.



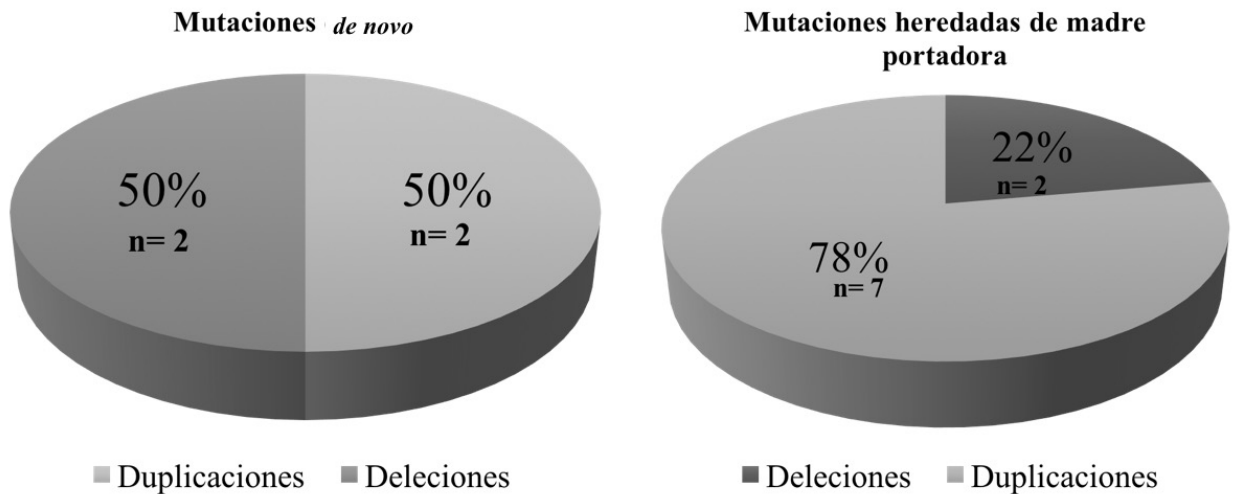
**Tabla 7.** Correlación fenotipo-genotipo de los pacientes con datos clínicos disponibles y genotipo *DMD* caracterizados por MLPA.

Núm.	Núm. de paciente	Mutación caracterizada	Fenotipo clínico	Fenotipo por genotipo	Estudio de inmunohistoquímica	Tratamiento	Concordancia
1	<b>DMD-1834</b>	Del exón 18	9a y deambula	Duchenne		Deflazacort 7a6m a 9a11m	NA
2	<b>DMD-1803</b>	c.2707G>T	8a y deambula	Duchenne			NA
3	<b>DMD-1191</b>	Dupl 52	14a y deambula	Duchenne	Patrón irregular	Deflazacort 1a	NO
4	<b>DMD-1751</b>	Dupl 52	14a y deambula	Duchenne		Prednisona por 10 días	NO
5	<b>DMD-1585</b>	Dupl 52	Duchenne	Duchenne			Si
6	<b>DMD-1749</b>	Dupl 46-49	Duchenne	Duchenne		Deflazacort por 7m	Si
7	<b>DMD-1561</b>	Dupl 30-43	Duchenne	Duchenne	Patrón irregular		Si
8	<b>DMD-1460</b>	Dupl 60-67	Intermedio	Becker			Si
9	<b>DMD-752</b>	Dupl 3-5	Becker	Becker			Si
10	<b>DMD-1872</b>	Rearreglo complejo (Dupl 45-50 y 63-79)	12a y deambula				NR

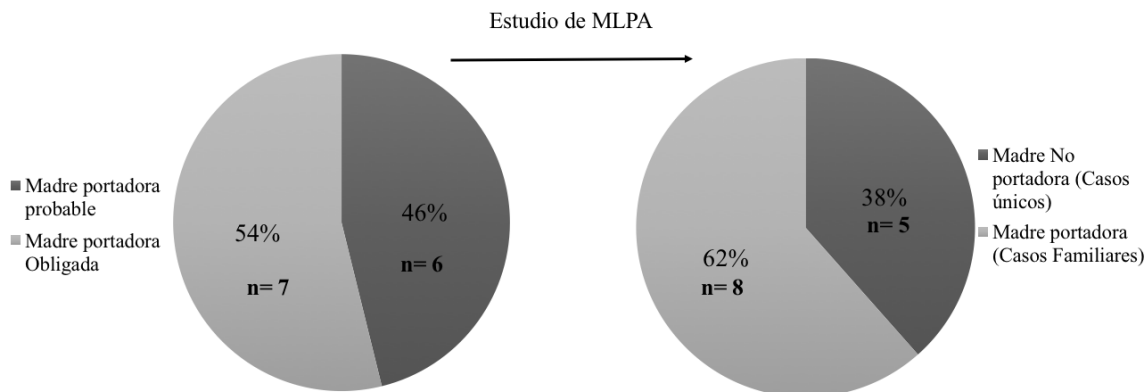
NA: No aplica por la temprana edad del paciente, NR: No referido, Del: DPI, Dupl: Duplicación.

## Diagnóstico del estado de portadora de duplicaciones y DPI por MLPA

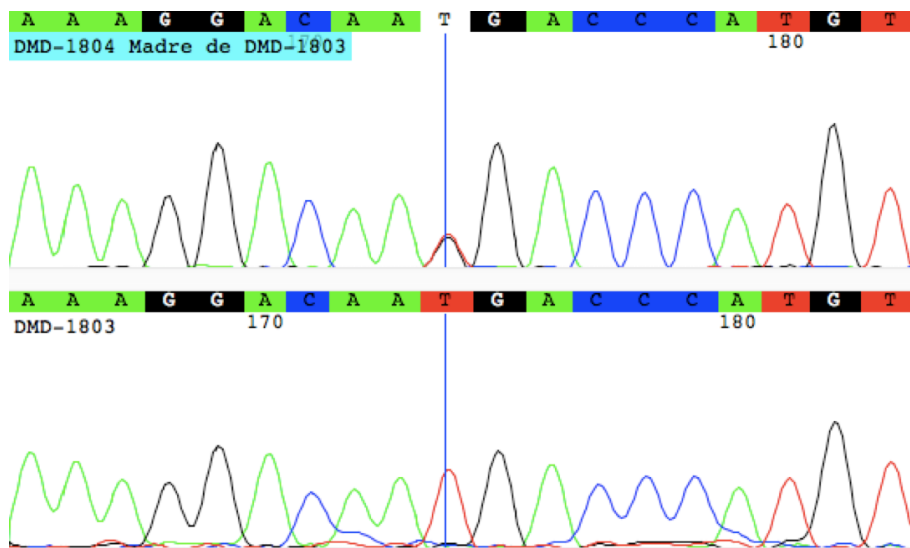
De los 5 pacientes que presentaron una delección se contó con muestra disponible y de buena calidad en 4 madres; de las cuales 2 se reportaron como portadoras obligadas y 2 como probables casos únicos antes del ensayo con MLPA y posterior a éste se corroboró que la mutación en los casos únicos se originó *de novo*, así como el estado de portadora obligada en los dos casos familiares. De los 11 pacientes que presentaron alguna duplicación, se contó con muestra disponible y de buena calidad en 9 madres, de las cuales 5 se reportaron como portadoras obligadas y 4 como casos únicos antes del estudio de MLPA. De estos casos, 7 heredaron la duplicación a través de madre portadora obligada (77.7%) y 2 por un evento *de novo* (22%). No se contó con muestra de la madre del paciente que presentó el rearrreglo complejo. En total se contó con muestra disponible y de buena calidad de 13 madres a las que se les realizó el estudio dirigido de las mutaciones correspondientes con MLPA (**figura 20**); el 61.5% de las mutaciones resultaron ser heredadas de madre portadora (8/13), y el 38.4% corresponden a mutaciones originadas *de novo* o madre no portadora (5/13). Los datos se muestran en las **gráficas 1 y 2**. La secuenciación del exón 21 en la madre del paciente DMD-1803 confirmó su estado de portadora obligada (historia familiar positiva para distrofinopatía) de la variante puntual tipo transversión c.2707G>T en estado heterocigoto (**figura 19**).



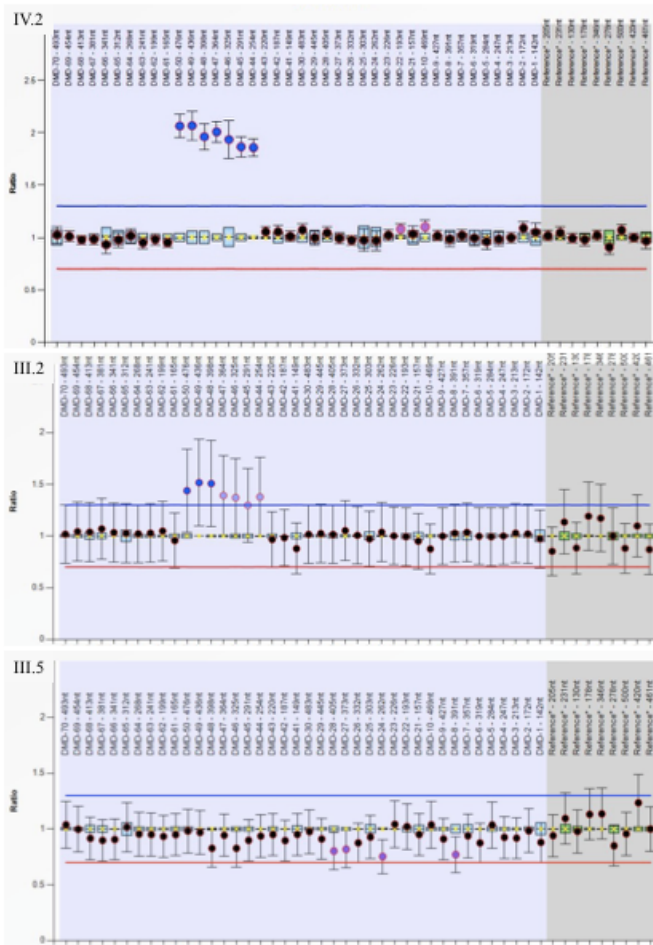
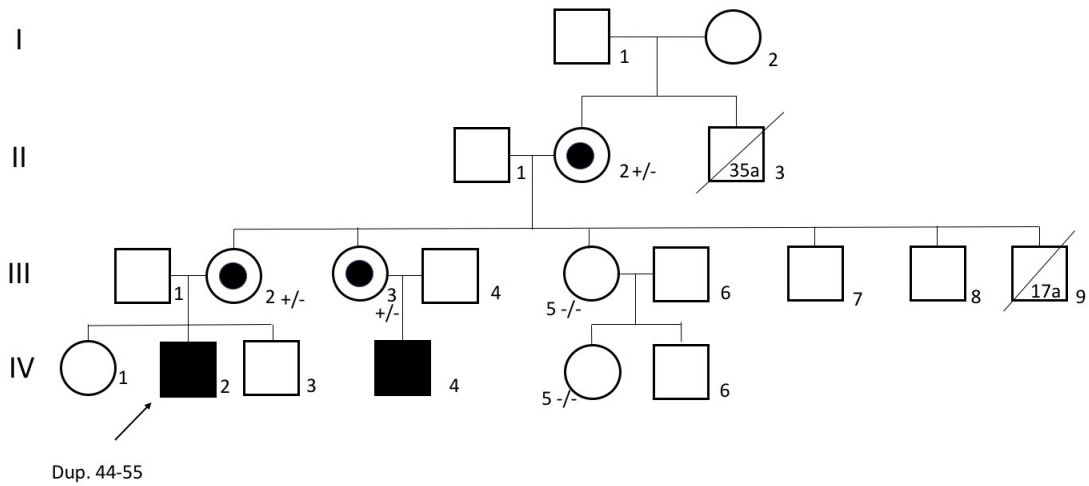
**Gráfica 1** Origen de las mutaciones caracterizadas por MLPA por tipo.



**Gráfica 2** Proporción entre casos únicos y familiares antes y después del estudio de MLPA para la identificación de DPI y duplicaciones en madres de 13 casos índices no relacionados.



**Figura 19.** Secuenciación automatizada del exón 21 en el paciente DMD-1803 y su madre DMD-1804. Se señala la variante patogénica puntual sin sentido tipo transversión c.2707G>T (p.Gly903\*). Se observa el estado heterocigoto de la madre para dicha variante, ya que en el electroferograma en esa posición existe una posición mixta de guanina (correspondiente al alelo sano) y de timina (correspondiente al alelo mutante).



**Figura 20.** Árbol genealógico del paciente DMD-907 (IV.2). El ensayo de MLPA dirigido para buscar la duplicación de los exones 44-55 confirmó el estado de portadora en madre (III.2), abuela portadora (II.2, MLPA no mostrado) y una tía emparentada por rama materna (III.3, MLPA no mostrado) y descartó el estado de portadora en una tía (III.5) y una prima (IV.5, MLPA no mostrado).

## **Fase II del estudio molecular: Secuenciación automatizada tipo Sanger para el estudio de variantes puntuales, microdeleciones/microinserciones en el gen *DMD*.**

### **Identificación de genotipos *DMD* en varones.**

Hasta el momento, el estudio de secuenciación completa identificó el genotipo *DMD* responsable en 9 de 10 pacientes (**tabla 4**). De las 9 variantes patogénicas identificadas, 4 no han sido reportadas previamente en las bases de datos de LOVD ([http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php?select\\_db=DMD](http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php?select_db=DMD)), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) ni en la literatura.

Las variantes puntuales incluyendo la evidenciada por MLPA y corroborada por secuenciación del exón 21, representan el 70% (n=7/10) de las caracterizadas en este estudio, el 30% restante corresponde a microdeleciones (n=3/10) que condicionan un corrimiento en el marco de lectura, se ubican en trectos homopoliméricos de adeninas y han sido previamente descritas en la base de datos de LOVD y ClinVar (**tabla 8**), por lo que podrían considerarse como recurrentes. No se observó una distribución preferencial de las variantes caracterizadas por secuenciación automatizada en el gen *DMD*

Las variantes sin sentido representan el 28.5% del total de las variantes puntuales identificadas (n=2/7); en ambos casos se produjo el codón UGA, en un caso por una transición (c.4758G>A) y en otro por una transversión (c.2707G>T). Las variantes que afectan los sitios de splicing (c.7661-1G>A y c.2292+2T>G) comprendieron el 28.5% (n=2/7) y aunque no se determinó su efecto a nivel de transcrito y proteína, podrían considerarse severas. Sólo se identificó una variante de sentido erróneo que representa el 14.2% de las variantes puntuales (n=1/7) provocada por una transversión (c.494A>T) en el dominio N-terminal de unión a actina (ABD1): p.(Asp165Val) en un paciente reportado con fenotipo Duchenne y con resultado de inmunohistoquímica para distrofina ausente en biopsia muscular; esta variante ha sido previamente reportada como patogénica y asociada a un fenotipo severo en la base de datos de LOVD y en la literatura [41]. Una microduplicación de una sola base (c.6446dup) y una microdelección de una sola base (c.294del) representan el 28.5% restante (n= 2/7) de variantes que recorren el marco de lectura y causan un codón de paro prematuro.

**Tabla 8.** Relación de pacientes y variantes patogénicas identificadas por la secuenciación automatizada tipo Sanger de los 79 exones del gen DMD.

Paciente	Exón	Variante Caracterizada	Cambio a nivel de proteína	Tipo de variante	Alteración y fenotipo descrito*	Patrón de IH	Fenotipo referido	Antecedentes familiares
<b>DMD 1801</b>	5	c.294del	p.(Asp98Glufs*3)	Delección	No	-	9a y deambula	Único
<b>DMD 1847</b>	45	c.6446dup	p.(Asp98Glyfs*73)	Duplicación	No	Ausente	9a y deambula	Único
<b>DMD 1777</b>	62	c.9204_9207del	p.(Asn3068Lysfs*20)	Micro delección	DMD RCV000201037.1	-	Duchenne	Único
<b>DMD 1789</b>	18	c.2281_2285del	p.(Glu761Serfs*10)	Micro delección	DMD RCV000080487.3	Ausente	Duchenne	Único
<b>DMD 1837</b>	43	c.6128_6131del	p.(Asp2043Valfs*29)	Micro delección	DMD RCV000201192.1	-	11a y deambula	Familiar
<b>DMD 1852</b>	6	c.494A>T	p.(Asp165Val)	Sentido erróneo	Si BMD (en un caso)	Ausente	8a y deambula	Único
<b>DMD 1187</b>	34	c.4758G>A	p.(Trp1586*)	Sin sentido	Si DMD	Ausente	Duchenne	Único
<b>DMD 1793</b>	53	c.7661-1G>A	-	Sitio de splicing	No	Irregular	Duchenne	Único
<b>DMD 1372</b>	18	c.2292+2T>G	-	Sitio de splicing	No	-	Duchenne	Familiar
<b>DMD 1825</b>	-	Sin genotipo caracterizado	-	-	-	-	11a y deambula	Familiar

\*Según la base de datos Leiden Open Source Variations Data Base y Clin Var; IH: Inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular.

### Correlación del genotipo *DMD* con el fenotipo.

Se logró identificar el genotipo condicionante de DMD en 9 de 10 pacientes de los cuales se contó con la información necesaria para establecer la relación fenotipo- genotipo en 5 de ellos; en los 4 restantes no se tiene un fenotipo definido ya que son menores de 12 años y aún conservan la capacidad ambulatoria. Se estableció una correlación fenotipo genotipo en el 33.3% de los pacientes incluidos en esta etapa (n= 3/9) y ésta correlación fue congruente en el 100% de ellos (n=3/3). El estatus de cada uno puede consultarse en las **tablas 8 y 9**.

**Tabla 9.** Correlación fenotipo-genotipo de los pacientes caracterizados por Secuenciación automatizada.

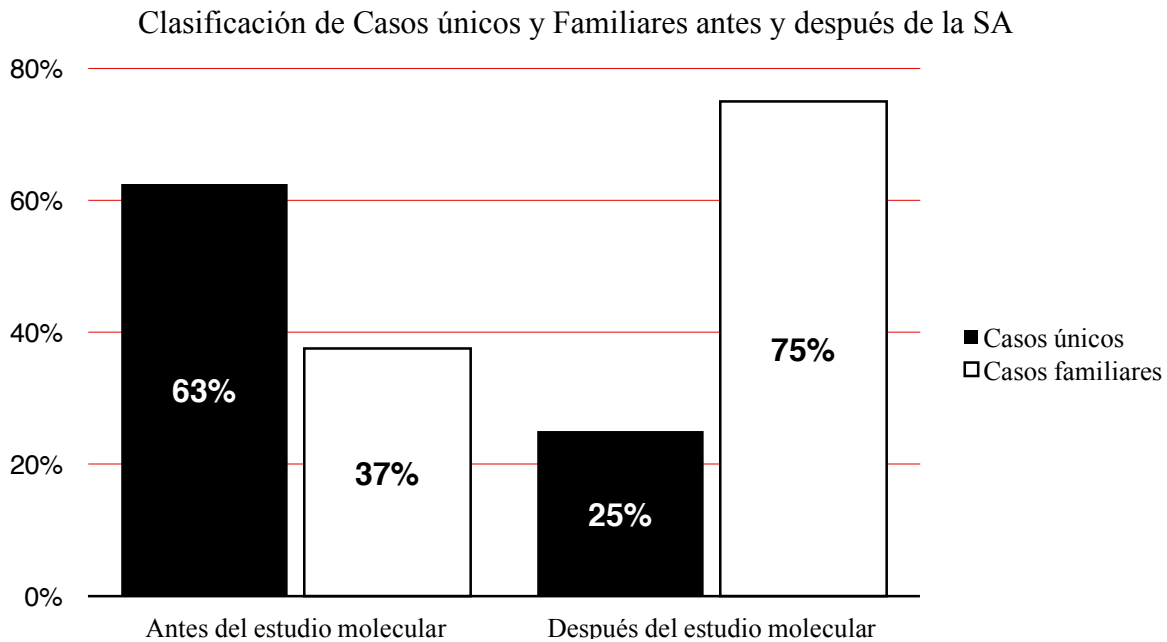
Paciente	Mutación caracterizada	Fenotipo clínico	Fenotipo reportado	Estudio de IH	Tratamiento	Concordancia
<b>Variantes descritas</b>						
DMD- 1852	c.494A>T	8a y deambula	Becker	Ausente	-	NA
DMD- 1837	c.6128_6131del	11a y deambula	Duchenne	-	Deflazacort 9a-11a	NA
DMD- 1789	c.2281_2285del	Duchenne	Duchenne	Ausente	-	Si
DMD- 1777	c.9204_9207del	Duchenne	Duchenne	-	-	Si
DMD- 1187	c.4758G>A	Duchenne	Duchenne	Ausente	-	Si
<b>Variantes no descritas</b>						
DMD-1801	c.294del	9a y deambula	Duchenne	-	Calcort 7m	NA
DMD- 1847	c.6446dup	9a y deambula	Duchenne	Ausente	Prednisona 2m	NA
DMD.1372	c.2292+2T>G	Duchenne	-	-	-	NR
DMD-1793	c.7661-1G>A	Duchenne	-	Patrón irregular	-	NR

IH: Inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular, NA: No aplica, NR: No referido

### Diagnóstico del estado de portadora por Secuenciación automatizada.

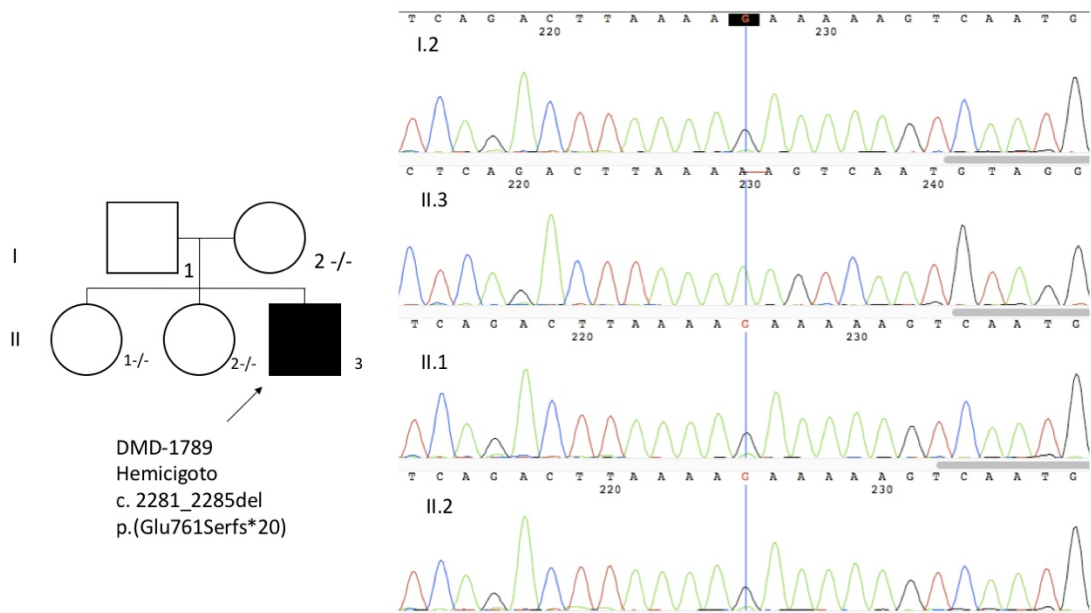
Se realizó la secuenciación dirigida a 14 familiares femeninas disponibles y a un hermano referido como afectado pertenecientes a 8 de las 10 familias con genotipo identificado (**figuras 21 y 22**). El estudio no pudo realizarse en 2 casos reportados sin historia familiar por no contar con muestra de ADN de la madre o de algún otro familiar femenino. En éstos 8 pacientes, el 75% corresponde a variantes heredadas de madre portadora (6/8) y el 25% corresponden a mutaciones originadas *de novo* (2/8). La proporción entre casos únicos y familiares antes y después del estudio de secuenciación automatizada se observan en la **gráfica 3**.

**Gráfica 3.** Proporción entre casos únicos y familiares (madre portadora) antes y después de la secuenciación automatizada.

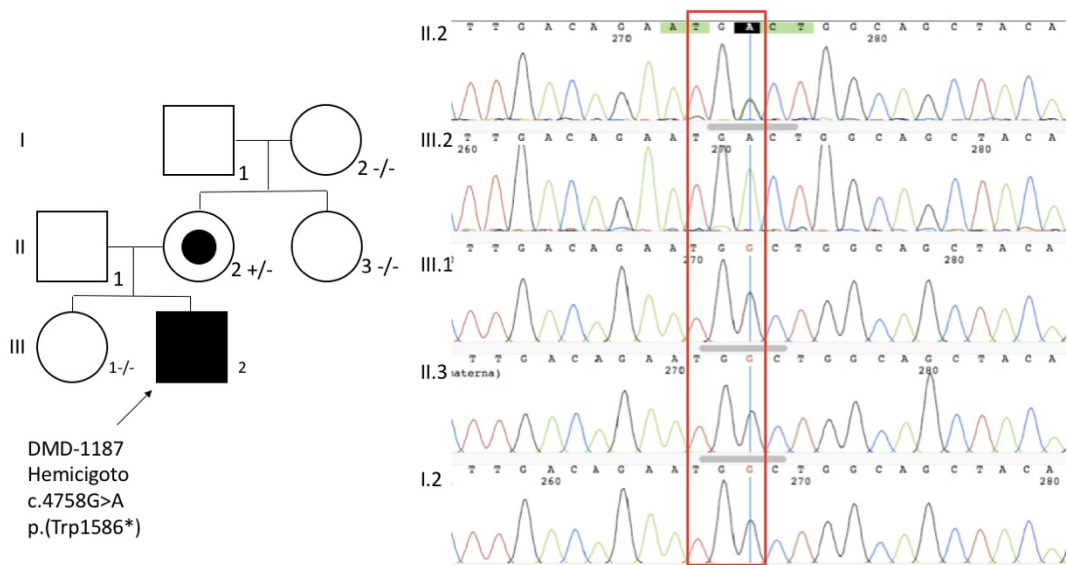


n=8





**Figura 21.** Árbol genealógico del paciente DMD-1789 en quién se identificó la microdeleción c.2281\_2285 (II.3), misma que se buscó dirigida con la secuenciación automatizada tipo Sanger del exón 18 en su madre (I.2) y dos hermanas (II.1, II.2) y no se encontró el alelo con dicha alteración en ellas por lo que el origen de ésta variante tipo microdeleción de 4 pb es por un evento *de novo* y con el estudio en las hermanas se descarta el riesgo de recurrencia por la posibilidad de mosaicismo germinal materno en II.1 y II.2. Nótese que la microdeleción está ubicada en una región homopolimérica y está registrada con la clave RCV000080487.3 en la base de datos de ClinVar por lo que se consideraría una variante recurrente.



**Figura 22.** Árbol genealógico del paciente DMD-1187 en quién se identificó la variante puntual c.4758G>A, misma que se buscó con la amplificación del exón 34 en su hermana (III.1), su madre (II.2), una tía por rama materna (II.3) y su abuela materna (I.2). Con este estudio se observó el estado de portadora de la madre y de no portadora en las familiares femeninas relacionadas. El estado de portadora en la madre (II.2) se pudo originar por un evento *de novo* a nivel de la espermatogénesis paterna ya que con el estudio de su tía (II.3) se descarta la posibilidad de recurrencia por mosaicismo germinal materno (I.2).

## Discusión

El presente trabajo es el primero en México en el que reporta el espectro mutacional del gen *DMD* en pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de distrofinopatía, con mPCR negativo a DPI parciales intragénicas, identificado mediante un algoritmo metodológico que emplea MLPA y secuenciación automatizada tipo Sanger. El estudio aporta información para delinear el espectro mutacional de DPI infrecuentes, duplicaciones, mutaciones puntuales, micro deleciones/inserciones y rearrreglos complejos del gen *DMD* en la población mexicana y por lo tanto justifica el empleo de una metodología mínimamente invasiva y certera en la identificación del espectro mutacional responsable de las distrofinopatías, para un diagnóstico oportuno y preciso que impacte positivamente en el inicio temprano de las intervenciones médicas y asesoramiento genético de certeza al paciente y sus familiares.

Los criterios de inclusión que se establecieron en este estudio han sido utilizados en estudios previos realizados en la población de origen chino. En uno de ellos se incluyeron al estudio a 1053 pacientes con valoración de distrofinopatía basados en cuadro clínico, CPK elevada, electromiografía y biopsia muscular; y de los cuales contaban con expediente clínico completo del 75.3% de los pacientes incluidos y el resto se anexó solamente por considerar los valores elevados de CPK. Los autores reportan la identificación de un 59.35% de DPI y 11.21% de duplicaciones, cifra que podría ser equiparable a nuestros resultados si se considera que el MLPA identificó un 7.35% de DPI adicionales al mPCR (50%). De igual forma, la cifra reportada para duplicaciones también es similar a la descrita en el presente estudio (16.17%). De manera similar a nuestro algoritmo, los autores seleccionaron a 20 pacientes al azar que presentaron estudio de MLPA normal para secuenciar el gen *DMD* completo, de los cuales el 40% (n=8) presentó alguna variante puntual sin sentido, el 35% (n=7) mostraron variantes que alteraron los sitios de splicing y el 25% restante (n=5) lo comprendieron variantes puntuales de sentido erróneo; en este estudio se identificó el genotipo responsable de la enfermedad en el 100% de los pacientes (n=20/20) [17].

Otro estudio de población china [42] incluyó a 119 pacientes referidos sólo con un cuadro clínico compatible con DMD consistente en debilidad muscular progresiva simétrica acompañada por pseudohipertrofia en los gastrocnemios, cuya edad al inicio de los síntomas fuera menor de 5 años y con pérdida de la capacidad ambulatoria antes de los 13 años, adicional a valores elevados de CPK sérica (criterios similares a los seleccionados en este estudio) y con antecedentes familiares positivos. El análisis por MLPA reveló en ellos un 53.8% de DPI, 13.4% de duplicaciones y 0.84% de rearrreglos complejos (delección/duplicación). Particularmente en este estudio, el porcentaje de duplicaciones y de rearrreglos complejos coincide con nuestras cifras (16.17% y 1.47%, respectivamente), no así la de DPI, pues estas en nuestro estudio fueron descartadas previamente por mPCR (50% de los casos analizados en el Laboratorio de Biología Molecular del INP) al ser un criterio de exclusión.

En un estudio con 150 pacientes de origen hindú de los cuales se contaba con información clínica en el 89.3% de los casos, se tomaron como criterios clínicos de inclusión la edad de aparición de los síntomas o a la que se presentó la pérdida de ambulación, pseudohipertrofia de los músculos gastrocnemios y signo de Gowers positivo (en aquellos con expediente clínico) y valores altos de CPK como requisito mínimo. El abordaje para diagnóstico molecular de estudio comenzó con mPCR que identificó DPI en el 68.6% de su muestra

(103 pacientes); el resto de los pacientes fue analizado por MLPA (47 muestras) y de ellas el 19.1% (9 muestras) reveló un resultado positivo, a duplicaciones en el 17% (8/47) y 2.1% con DPI. Este estudio es similar al nuestro en cuanto al algoritmo metodológico empleado, sin embargo nosotros tuvimos un porcentaje mayor de muestras con rearrreglos exónicos identificados por MLPA (27.6% de nuestro estudio contra 19.1%) aunque el porcentaje de duplicaciones es muy similar (18.4% vs 19%), no así en el caso de las DPI infrecuentes, en el que pudimos identificar un porcentaje mayor (7.6%) [43].

Referente a las 5 DPI identificadas en el presente estudio, éstas se ubicaron distribuidas preferentemente en la región 5' (40% N=2/5) seguida por la región central del gen, central-3' y 3' con el 20% (N=1/5); 2 fueron en sitios infrecuentes (paciente DMD 1302 deleción de los exones 22-29 y paciente DMD 1834 con deleción del exón 18) que no se hubieran identificado con el ensayo de mPCR empleada en el Laboratorio de Biología Molecular del INP y las tres restantes eran DPI identificables por la mPCR, sin embargo fueron evidenciadas por MLPA y posteriormente se corroboraron por PCR punto final monoplex para cada uno de los exones. Así, éstas tres DPI son falsos negativos de la mPCR que pueden atribuirse a que en el momento del análisis molecular de los tres pacientes no se tenía bien estandarizada la técnica de mPCR para los 22 exones (las muestras tienen fechas de captación de 1990, 1993 y 2004). Éste fenómeno ha sido reportado anteriormente en otro estudio realizado en población hindú donde se incluyeron 217 pacientes con diagnóstico clínico de DMD sometidos primero a mPCR y aquellos que resultaron negativos (51 pacientes) posteriormente se les realizó MLPA. En ellos se encontraron 11 DPI y una duplicación, de las DPI, 6 correspondieron a falsos negativos de mPCR (10.9% n= 6/55) y las 5 restantes fueron DPI en exones fuera de los *hot spots* o de exones no cubiertos por el panel de exones incluidos en la mPCR [31]. Así en nuestro estudio este porcentaje fue significativamente menor (4.4% n=3/68) por lo que podríamos afirmar que la mPCR es un método robusto que puede seguirse aplicando en el Laboratorio de Biología Molecular del INP como estrategia diagnóstica no invasiva de primera elección para pacientes con sospecha de distrofinopatía, pues aunque las guías diagnósticas actuales postulan a la técnica de MLPA como estudio molecular de primera línea, la mPCR permite un diagnóstico molecular rápido (<1 semana) en el 50-55% de los casos [38] que obviaría el empleo de estrategias diagnósticas invasivas e innecesarias como la EMG o la biopsia muscular y a un bajo costo (sin necesidad de disponer de kits y secuenciador automático) [28, 30]. Así mismo, hay que considerar que de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, existe una posibilidad del 4.4% (3/68) de DPI que pasen desapercibidas por la mPCR, sin embargo hay que resaltar detectables por mPCR, por lo que el porcentaje real de falsos negativo de la mPCR podría ser menor actualmente debido a la mayor experiencia adquirida, la mejora en reactivos (uso de polimerasas “hot-start”, aditivos, etc.) y el desempeño de los termocicladores.

En este estudio se identificó que las duplicaciones se encuentran en mayor proporción en la región 3' del gen (58.3%, n=7/12, exones 41 a 79), seguido de la región 5' y la región central-3' (16.6% n=2/12, exones 1 a 20 en ambas regiones) y finalmente en el extremo 5'-Central (8.3% n=1/12, exones 1-40), lo cual coincide con el estudio en población china que revela predominio de duplicaciones en los exones 3-11 y 21-37 [17], y también con un estudio previo en 442 casos de DMD/B de nacionalidad japonesa [18] que contemplo como primer abordaje molecular el análisis de MLPA, con el que se caracterizaron 42 duplicaciones, de las cuales el 47.6% se ubicó en la región 5' del gen y el 38.1% en la región central del gen *DMD*.

El rearreglo complejo que se caracterizó (dup 45-50 y 63-72) no está reportado como tal en las bases de datos, ni en la literatura, pero se ha descrito un paciente con un rearreglo similar (dup 45-55 y 65-79) [44]. En este artículo se compilan los resultados de tres grandes estudios de duplicaciones en el gen *DMD* de los que observan varios rearreglos complejos de duplicaciones o incluso triplicaciones no continuas y concluyen que en este tipo de rearreglos no es posible inferir un fenotipo a partir del genotipo a menos que se tenga la secuencia de los RNAm para conocer el orden en el que están ubicados los exones implicados en dichos rearreglos, ya que con el MLPA se puede determinar la dosis génica de cada exón, no así su ordenamiento preciso en el genoma del paciente. En el caso del paciente DMD-1872 con dos duplicaciones no contiguas (45-50, 63-72) no es posible predecir la integridad del marco de lectura y por ende el fenotipo resultante, ya que la duplicación incluye al exón 79 y se desconoce si esta duplicación incluye otras secuencias aledañas en dirección 3' al gen *DMD* no analizadas por MLPA. En este caso particular se podría realizar un ensayo de hibridación genómica comparativa en microarreglos (aCGH) y eventualmente el análisis del transcrito resultante, para delimitar con certeza la extensión de la duplicación y el efecto a nivel del marco de lectura, respectivamente.

Es importante señalar la importancia de corroborar DPI o duplicaciones de un solo exón, tal como quedó ilustrado con la variante patogénica c.2707G>T identificada en el paciente 1803 mediante una aparente delección del exón 21. Éste fenómeno se identificó en el 1.1% (1 caso con aparente delección del exón 15, NM\_004006.1; c.1729 G>T, p.Glu577\*) de 133 pacientes no relacionados con diagnóstico clínico sugestivo de DMD (98)/DMB(35) [43] de nacionalidad Serbia y analizados por MLPA y en un reporte chino donde se identificó a 4 pacientes que dieron un resultado falso positivo de delección por MLPA (3.3%) y que en realidad se debía a la presencia de variantes puntuales que interferían con la hibridación de las sondas [42]. La identificación certera de la variante patogénica responsable de la enfermedad es crucial para establecer una correlación fenotipo-genotipo correcta que además es indispensable para ofrecerle al paciente la terapia correcta basada en genotipo.

Para la etapa de secuenciación automatizada tipo Sanger, por cuestiones financieras no fue posible incluir al estudio del gen *DMD* a los 47 pacientes candidatos con estudio de MLPA normal. Sin embargo, el protocolo actualmente se encuentra en evaluación por el comité de investigación para la asignación de recursos financieros federales de nuestro Instituto que permitan la conclusión de la fase de secuenciación en estos 47 pacientes con estudio de MLPA normal. Por lo anterior y con el aval del Comité Tutoral, se llevó a cabo la selección de 10 pacientes para realizar el ensayo de secuenciación automatizada tipo Sanger de la porción codificante completa del gen *DMD* y sus bordes exón-intrón. Aunque el número de pacientes analizados fue limitado, las variantes puntuales y microdelecciones/inserciones identificadas hasta el momento no muestran una aparente distribución preferencial a lo largo del gen, tal y como se ha referido en otros estudios [22, 23, 42, 45], al contrario de lo que sucede con las duplicaciones y las DPI de exones, las cuales se ha propuesto que son originadas por que en el gen *DMD* la recombinación meiótica es 4 veces más frecuente de lo que se esperaría por su tamaño y posee dos regiones de recombinación ubicadas entre los exones 44 y 51 y la otra región entre el intrón 7 y el extremo 5' del gen que corresponden a los *hot spots* para DPI [46-48].

Un estudio de población china que utilizó un abordaje similar al nuestro (MLPA seguido de secuenciación automatizada) en 26 pacientes chinos, de los cuales 21 fueron diagnosticados por MLPA y los 5 restantes por secuenciación de nueva generación, de los cuales se obtuvo porcentajes muy distintos a los de nuestro estudio para los diferentes tipos

de variantes: mutaciones sin sentido (variantes puntuales 40 vs 20%), de sentido erróneo (40 vs 20%) y las variantes tipo microdelección/microinserción que corren el marco de lectura (20 vs 50%) [45]; aunque en ambos estudios se observa una amplia heterogeneidad alélica. Estas cifras tampoco coinciden con un estudio en población española donde incluyeron a 576 pacientes a un protocolo similar (MLPA seguido de secuenciación automatizada) en donde las variantes puntuales más frecuentes fueron sin sentido con un 51.4%, de las cuales el codón mayormente identificado fue el UGA (42.6%) lo cual sí coincide con lo caracterizado en el presente trabajo; seguidas de las variantes puntuales de *frameshift* con un 23.8%, posteriormente aquellas que se ubican en los sitios de splicing (20%) preferentemente en el sitio 5' y finalmente aquellas de sentido erróneo 3.8%.

Hay que mencionar que en uno de los pacientes incluidos a la etapa de secuenciación (10%, n=1/10) que cuenta con biopsia sugestiva a DMD no se le ha encontrado alteración alguna en los 79 exones secuenciados o en la región promotora de la isoforma muscular (datos no mostrados); sin embargo presenta clínica, estudios de laboratorio e historia familiar positiva de la enfermedad consistente con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. Las explicaciones a este fenómeno, podrían consistir en la existencia de una variante intrónica profunda que pueda generar un pseudo exón como la variante C.9225-647A localizada en el intrón 62 que activa un sitio donador de *splicing* que junto con el aceptor de *splicing* provoca la generación e inclusión de un pseudoexón de 67pb en el RNAm maduro, lo cual altera la síntesis de distrofina [23]. Este tipo de mutaciones se identifican mediante el análisis de cDNA obtenido de biopsia muscular. Un segundo mecanismo puede consistir en algún rearrreglo tipo inversión génica similar a la que no implica pérdida o ganancia de material genético, pero altera por completo el ordenamiento de los exones; este rearrreglo también puede identificarse inicialmente a través del análisis del transcrito mutante.

El fenotipo clínico esperado depende del efecto de la delección /duplicación en el marco de lectura del gen, el cual no depende necesariamente del tamaño del rearrreglo. Así, la mutación producirá un fenotipo severo (DMD) si condiciona un corrimiento del marco ("*Out of frame*"), o un fenotipo intermedio o leve (DMB) si se preserva el marco de lectura abierto ("*In-frame*"). De manera paradójica y de acuerdo a la base de Datos de Leiden Muscular Dystrophy, el 7% de los casos que presentan una mutación dentro del marco de lectura presentan un fenotipo grave, mientras que 2% de los casos que presentan una mutación fuera del marco de lectura, resultan en fenotipos DMB. Esto se debe a que las predicciones de la base de Datos de Leiden se basan en que la información del ADN se transcribe directamente a un ARNm el cual se forma por delección/inserción (duplicación) de los exones seleccionados por el usuario de la base de datos, sin embargo se ha reportado que algunos cambios a nivel de ADN no coinciden exactamente con los cambios observados "*in vivo*" a nivel de ARNm. Por ejemplo a nivel de ARNm se pueden perder más exones porque dominios intrónicos requeridos para generar un splicing correcto pueden estar deletados; además de la potencial presencia de secuencias intrónicas flanqueadas por señales aberrantes de splicing (sitios de splicing crípticos) que pueden activarse añadiendo "pseudoexones" al ARNm. Por otro lado se asume que las duplicaciones se dan en tandem en la mayoría de los casos, sin embargo no todos los estudios reportan el orden real de los exones duplicados a nivel del ARNm.

De los 68 pacientes incluidos en este estudio sólo 31 contaron con expediente clínico vigente de donde se recabó la información clínica mencionada; el resto de los expedientes clínicos no se encontraron disponibles ya sea por defunción del paciente, mayoría de edad,

abandono del seguimiento clínico o por proceso de digitalización, lo que constituyó un obstáculo para correlacionar el genotipo con el fenotipo de los pacientes, ya que de los 27 pacientes con genotipo caracterizado, sólo 18 contaron con expediente clínico disponible para efectuar la correlación fenotipo-genotipo (66.6%). Sin embargo, se pudo realizar la correlación fenotipo-genotipo en 12 de 27 pacientes con genotipo caracterizado por MLPA o por Secuenciación automatizada tipo Sanger (44.4%) ya que la clasificación en fenotipos Duchenne, intermedio o Becker, se encuentra pendiente en 7 pacientes (25.9%) debido a que son menores de 12 años y/o aún conservan la capacidad ambulatoria y aunque el paciente con dos duplicaciones no contiguas (rearrreglo complejo) se refirió con fenotipo intermedio/Becker, pero la correlación precisa no se puede establecer por la ausencia de una caracterización precisa a nivel de ADN genómico.

De los 12 pacientes donde fue posible una correlación fenotipo-genotipo (**tabla 7 y 9**), 10 presentaban genotipo condicionante de Duchenne, sin embargo sólo 8 de ellos presentaba dicho fenotipo, por lo que se cumplió la regla del marco de lectura sólo en el 80% de los casos lo cual es bajo para los porcentajes reportados (~90%), aunque esto puede atribuirse al tamaño limitado de la muestra (n=8). Dos pacientes que presentaron una duplicación del exón 52 condicionante de un corrimiento del marco de lectura y un fenotipo Duchenne (DMD-1191 y DMD-1751), preservan aún su capacidad ambulatoria a los 14 años, uno de ellos (DMD-1191) incluso presenta un estudio de inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular con resultado de distrofina en patrón discontinuo. Ambos pacientes recibieron tratamiento con Deflazacort o Prednisona, sin embargo la duración de dicho tratamiento no explica el comportamiento fenotípico en ambos casos (una semana y un mes, respectivamente). Dos pacientes, uno con fenotipo Becker (DMD-752) y el otro con fenotipo intermedio (DMD-1460), presentaron un genotipo condicionante de Becker, lo cual concuerda al menos en forma parcial con la predicción de un fenotipo menos severo que el Duchenne. Así al menos en nuestro dos pacientes con fenotipo leve, la regla del marco de lectura se cumplió en el 100% (n=2).

En este estudio no se identificó a ningún paciente que pudiera ser candidato a terapia molecular con los fármacos drisapersen o eteplirsen diseñados para pacientes con DPI del exón 52, sin embargo, en los 5 pacientes diagnosticados con DPI podrían ser candidatos a restituir el marco de lectura saltando un exón con AON's específicos en cada caso (para DMD-128 con DPI del exón 45 se restauraría el marco de lectura al omitir el exón 44; para DMD-386 con DPI de los exones 7-9 se restauraría el marco de lectura al omitir el exón 6; para DMD-1355 con DPI de los exones 31-43 se restauraría el marco de lectura al omitir el exón 44; para DMD-1302 con DPI de los exones 22-29 se restauraría el marco de lectura al omitir el exón 21 y finalmente para DMD-1834 con DPI del exón 18 se restauraría el marco de lectura al omitir el exón 17). Los pacientes DMD-1803 y DMD-1187 ambos con diagnóstico obtenido por secuenciación automatizada tipo Sanger presentan una sustitución que resulta en la generación del codón UGA por lo que son candidatos a terapia molecular de "omisión del codón de paro" con el fármaco PTC124 (Ataluren) [1]. Así, el presente estudio revela que el 25.9% (n=7/27) de pacientes con genotipo caracterizado en este estudio son candidatos a recibir terapia molecular experimental con los fármacos mencionados.

Dentro de los objetivos contemplados, estaba el determinar el origen de la mutación identificada a través del estudio dirigido en la madre de los pacientes. Éste se logró identificar en 21 familias no relacionadas. En el caso de las DPI el 50% fueron originadas *de novo* y el 50% fueron heredadas de madre portadora similar a lo reportado en la literatura donde se conoce que las DPI originadas *de novo* son de alrededor del 60% [14, 38]. En el

caso de las duplicaciones un tercio (33.3%, n=3/9) fueron originadas *de novo* y 2/3 (66.6%, n=6/9) heredadas de madre portadora idéntico a lo descrito por Haldane en 1935 [16]. En el caso de las variantes puntuales y de otro tipo el 25% (n=2/8) tuvieron un origen *de novo* y el 75% (n=6/8) heredadas de madre portadora, esto puede deberse a que la mayoría de las mutaciones puntuales ocurren en la espermatogénesis del abuelo materno, [49] lo cual podría explicar la proporción de mutaciones heredadas de madre portadora mayor a la reportada en DPI las cuales son originadas en su mayoría en la oogénesis.

Si se toma en cuenta de forma conjunta los tres tipos de mutaciones caracterizadas el 33.3% de ellas tienen un origen *de novo* (n=7/21) y el 66.6% se originaron a través de una madre portadora (n=14/21), lo cual es idéntico a lo predicho por Haldane en 1993 [16] para el origen de las mutaciones condicionantes de trastornos ligados al cromosoma X. Las femeninas portadoras se pudieron originar a su vez por mutaciones *de novo* en las células germinales del abuelo materno de los pacientes, condicionando así mujeres portadoras en casos aparentemente no familiares por genealogía.

Así mismo, los resultados generaron un impacto positivo en 20 familias al asignar o excluir con certeza el diagnóstico de portadora obligada en las familiares femeninas. Con este estudio se reclasificaron como casos familiares (madre portadora) a 4 familias de 11 que estaban catalogadas como casos únicos antes del estudio molecular dirigido. Las familias de los casos únicos que no cuentan con estudio molecular se asesoran con la suposición de que la madre es portadora de la enfermedad (riesgo empírico de ser portadora: 2/3); en tal caso, se cuenta con un 1/3 de posibilidades de que su próximo hijo varón padezca la enfermedad y un 1/3 de posibilidades de que su próxima hija mujer sea portadora de la enfermedad. Sin embargo al contar con el estudio molecular estos datos se pueden dar con certeza en caso de resultar portadora y en caso de resultar no portadora se tendrá que informar que aún tiene riesgo de presentar mosaicismo germinal, esta posibilidad se descartó al menos en hermanas de casos únicos en 2 familias que corresponden al 28.5% (n=2/7), en las 5 familias restantes sólo se contó con muestra disponible de la madre del caso índice por lo que no fue posible descartar la condición del mosaicismo germinal materno.



## **Limitaciones del estudio.**

La ausencia de datos clínicos en 7 de 27 pacientes y 3 nuevas variantes (las variantes en sitios de splicing y el rearreglo complejo) sin fenotipo predecible imposibilitaron la correlación fenotipo-genotipo en el 40.7% (11/27) de los pacientes con genotipo establecido. La ausencia de muestra de madres en 6 de 27 familias con alguna alteración en el gen *DMD* impidió conocer el origen de la totalidad de las mutaciones caracterizadas. Finalmente el costo aún elevado para nuestra institución de la técnica de secuenciación automatizada impidió realizar dicho estudio en todos los pacientes con estudio de mPCR y de MLPA sin alteraciones.

En este estudio no fue posible asesorar a las 7 de las 27 familias con genotipo caracterizado ya que no se dispuso de la madre para realizar el estudio molecular y no fue posible contactar a dichas familias para una segunda toma de muestra. Hasta el momento no se tiene conocimiento de que alguna familiar solicite el estudio prenatal por lo que no se ha realizado ninguno.

No fue posible descartar la condición de mosaicismo germinal en 5 casos únicos debido a que no se contó con muestra de hermanas relacionados al caso índice, si bien el riesgo tradicional es de 6-12% este riesgo puede variar de acuerdo al tipo de mutación [50], por ejemplo en casos únicos se ha estimado <5% para DPI [38] por lo que es de suma importancia descartar esta condición para ofrecer un asesoramiento genético confiable en dichas familias.

## Conclusiones

- La técnica de MLPA permitió la caracterización de un 26.4% (18/68) de los genotipos responsables de distrofinopatías en una muestra de pacientes con sospecha clínica de dicha entidad y estudio molecular negativo a DPI (mPCR). Por lo que, se estima que con ambas metodologías se podría identificar el 70% de los genotipos condicionantes de las distrofinopatías en pacientes de nuestra población.
- La secuenciación automatizada identificó la variante patogénica en el gen *DMD* en 9 de 10 pacientes con alta sospecha clínica de distrofinopatía (90%).
- Se estableció que la regla del marco de lectura que relaciona el genotipo con el fenotipo se cumplió en el 80% de los casos analizables de 12 pacientes que mostraron una correlación fenotipo-genotipo.
- De manera general, las mutaciones patogénicas identificadas, se heredaron a través de madre portadoras en 2/3 partes de las familias con genotipo y madre disponible para el estudio, en contraste, sólo 1/3 se originó como evento *de novo*.
- Se reclasificaron a 4 de 11 familias que se ubicaban en casos únicos como casos familiares.
- Se descartó la condición de mosaicismo germinal en el 28.5% de las hermanas de los casos únicos identificados (n=2/7)
- Con este estudio se identificaron a dos pacientes candidatos a recibir terapia molecular de omisión de codón de paro (2.9%, n=2/68) y 5 pacientes candidatos a terapia molecular experimental con AON's (7.35% n=5/68).

## Literatura Citada

1. Wein, N., L. Alfano, and K.M. Flanigan, *Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy*. *Pediatr Clin North Am*, 2015. **62**(3): p. 723-42.
2. Dalkilic, I. and L.M. Kunkel, *Muscular dystrophies: genes to pathogenesis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. **13**(3): p. 231-8.
3. Jackson, C.E., *A clinical approach to muscle diseases*. *Semin Neurol*, 2008. **28**(2): p. 228-40.
4. McDonald, C.M., *Clinical approach to the diagnostic evaluation of hereditary and acquired neuromuscular diseases*. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2012. **23**(3): p. 495-563.
5. Cardamone, M., B.T. Darras, and M.M. Ryan, *Inherited myopathies and muscular dystrophies*. *Semin Neurol*, 2008. **28**(2): p. 250-9.
6. Abbs, S., et al., *Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies*. *Neuromuscul Disord*, 2010. **20**(6): p. 422-7.
7. Rahimov, F. and L.M. Kunkel, *The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy*. *J Cell Biol*, 2013. **201**(4): p. 499-510.
8. Cotta, A., et al., *Common recessive limb girdle muscular dystrophies differential diagnosis: why and how?* *Arq Neuropsiquiatr*, 2014. **72**(9): p. 721-34.
9. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(1): p. 77-93.
10. Verma, S., Y. Anziska, and J. Cracco, *Review of Duchenne muscular dystrophy (DMD) for the pediatricians in the community*. *Clin Pediatr (Phila)*, 2010. **49**(11): p. 1011-7.
11. Mostacciuolo, M.L., et al., *Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy*. *Hum Genet*, 1987. **75**(3): p. 217-20.
12. Ferlini, A., M. Neri, and F. Gualandi, *The medical genetics of dystrophinopathies: molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice*. *Neuromuscul Disord*, 2013. **23**(1): p. 4-14.
13. Bushby, K., F. Muntoni, and J.P. Bourke, *107th ENMC international workshop: the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, the Netherlands*. *Neuromuscul Disord*, 2003. **13**(2): p. 166-72.
14. Alcantara, M.A., et al., *High frequency of de novo deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling*. *Clin Genet*, 1999. **55**(5): p. 376-80.
15. Taylor, P.J., et al., *Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy*. *J Med Genet*, 2007. **44**(6): p. 368-72.
16. Haldane, J.B., *The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935*. *J Genet*, 2004. **83**(3): p. 235-44.
17. Yang, J., et al., *MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD*. *BMC Med Genet*, 2013. **14**: p. 29.

18. Takeshima, Y., et al., *Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center.* J Hum Genet, 2010. **55**(6): p. 379-88.
19. Mah, J.K., et al., *A population-based study of dystrophin mutations in Canada.* Can J Neurol Sci, 2011. **38**(3): p. 465-74.
20. LM, M.A.B.C.L.G.S.M.H.K., *An explanations for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.* Genomics, 1988. **2**: p. 90-95.
21. Lopez-Hernandez, L.B., et al., *[Improvements in the diagnosis of dystrophinopathies: what have we learnt in these last 20 years?]*. Rev Neurol, 2011. **52**(4): p. 239-49.
22. Wang Y, Y.Y., Liu J, Chen XC, Liu X, Wang CZ, He XY, *Whole dystrophin gene analysis by next-generation sequencing: a comprehensive genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy.* Molecular Genetic Genomics, 2014. **289**(5): p. 1013-21.
23. Juan-Mateu J, G.-Q.L., Rodriguez MJ, Baena M, Verdura E, Nascimento A, Ortez C, Baiget M, Gallano P, *DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations.* PLoS One, 2015. **10**(8).
24. CT, C.J.G.R.R.J.C., *Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy.* PCR Protocols: A guide to Methods and Applications 1990: p. 272-281.
25. Beggs, A.H., Koenig M; Boyce FM; Kunkel LM, *Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction.* Hum Genet, 1990. **86**(1): p. 45-8.
26. CT, C.J.G.R.R.J.N.P.C., *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification.* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(23): p. 11141-11156.
27. Gonzalez-Herrera, L., et al., *[Identifying deletions in the dystrophin gene and detecting carriers in families with Duchenne's/Becker's muscular dystrophy]*. Rev Neurol, 2009. **48**(2): p. 66-70.
28. Nouri, N., et al., *Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification analysis versus multiplex polymerase chain reaction assays in the detection of dystrophin gene rearrangements in an Iranian population subset.* Adv Biomed Res, 2014. **3**: p. 72.
29. Kalman, L., et al., *Quality assurance for Duchenne and Becker muscular dystrophy genetic testing: development of a genomic DNA reference material panel.* J Mol Diagn, 2011. **13**(2): p. 167-74.
30. Lalic, T., et al., *Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA.* Eur J Hum Genet, 2005. **13**(11): p. 1231-4.
31. Verma, P.K., et al., *Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy.* Indian J Hum Genet, 2012. **18**(1): p. 91-4.
32. Coral-Vazquez, R., et al., *Analysis of dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy.* Arch Med Res, 1993. **24**(1): p. 1-6.
33. Alcantara, M.A., et al., *Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available.* Ann Genet, 2001. **44**(3): p. 149-53.
34. López- Hernández, L.G.-D., B; Luna- Angulo, AB; Anaya-Segura, M; Bunyan, DJ; Zúñiga-Gúzman, C; Escobar-Cedillo, RE; Roque-Ramírez, B; Ruano-Calderón, LA; Rangel-Villalobos, H; López-Hernández, JA; Estrada-Mena, FJ; García, S; Coral-

- Vázquez, RM. , *Comparison of Mutation Profiles in the Duchenne Muscular Dystrophy Gene among Populations: Implications for Potential Molecular Therapies*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**: p. 5334-5346.
35. Fairclough, R.J., M.J. Wood, and K.E. Davies, *Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(6): p. 373-8.
  36. van Deutekom, J.C.d.K., Sjeff J.; Campion, Giles V., *Antisense oligonucleotides as personalized medicine for Duchenne muscular dystrophy*. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, 2013. **xxx**(xx): p. 386- 394.
  37. Aartsma-Rus, A., *Antisense-mediated modulation of splicing: Therapeutic implications for Duchenne muscular dystrophy*. RNA Biology, 2010. **7**(4): p. 453-461.
  38. Bermudez-Lopez, C., et al., *Germinal mosaicism in a sample of families with Duchenne/Becker muscular dystrophy with partial deletions in the DMD gene*. Genet Test Mol Biomarkers, 2014. **18**(2): p. 93-7.
  39. Marquis-Nicholson, R., et al., *A Streamlined Protocol for Molecular Testing of the DMD Gene within a Diagnostic Laboratory: A Combination of Array Comparative Genomic Hybridization and Bidirectional Sequence Analysis*. ISRN Neurol, 2013. **2013**: p. 908317.
  40. Traverso, M., et al., *Multiplex real-time PCR for detection of deletions and duplications in dystrophin gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 145-50.
  41. Flanigan, K.M., et al., *Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 931-9.
  42. Chen, C., et al., *Screening of Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations and investigating its mutational mechanism in Chinese patients*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e108038.
  43. Murugan, S., A. Chandramohan, and B.R. Lakshmi, *Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis*. Indian J Med Res, 2010. **132**: p. 303-11.
  44. White, S.J., et al., *Duplications in the DMD Gene*. Human mutation, 2006. **27**: p. 938-945.
  45. Magri, F., et al., *Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the Dystrophin gene detected by direct sequencing*. BMC Med Genet, 2011. **12**: p. 37.
  46. Hu, X.Y., P.N. Ray, and R.G. Worton, *Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination*. EMBO J, 1991. **10**(9): p. 2471-7.
  47. Oudet, C., et al., *Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(8): p. 599-603.
  48. Worton, R.G., *Duchenne muscular dystrophy: gene and gene product; mechanism of mutation in the gene*. J Inherit Metab Dis, 1992. **15**(4): p. 539-50.
  49. Tuffery, S., et al., *Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test*. Hum Genet, 1998. **102**(3): p. 334-42.
  50. Wood, S. and B.C. McGillivray, *Germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy*. Hum Genet, 1988. **78**(3): p. 282-4.

