



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO MUTACIONAL EN  
DISTROFINOPATÍAS: INICIATIVA EN EL INSTITUTO NACIONAL  
DE PEDIATRÍA.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

**DR. ALAN CARO CONTRERAS**

TUTOR:

**DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**

CO-TUTOR:

**DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ANGEL**

CIUDAD DE MÉXICO

2018





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.

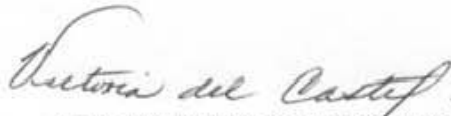
**AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO MUTACIONAL EN  
DISTROFINOPATÍAS: INICIATIVA EN EL INSTITUTO NACIONAL  
DE PEDIATRÍA.**




DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA  
SUBDIRECTORA DE PROGRAMACIÓN Y EVALUACIÓN EDUCATIVA



DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO



DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD EN GENÉTICA  
MÉDICA



DR. MIGUEL ÁNGEL ALVÁNTARA ORTIGOZA  
TUTOR DE TESIS



DRA. ARIADNA ESTELA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL  
CO-TUTOR DE TESIS

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por el regalo invaluable de la vida.

A mi **Familia** por ser la inspiración y el motor de mi vida.

A **Dennise** por ser una fuente inagotable de amor, cariño y apoyo.

A mis **Tutores** por ser el ejemplo del trabajo incansable y la búsqueda por la excelencia.

A la **Dra. Del Castillo** por haberme abierto las puertas a este Instituto.

A mis **Adscritos** por su confianza, dedicación y paciencia en la instrucción de mi enseñanza.

A mis **compañeros** por hacer de este viaje una experiencia inolvidable.

A todo el resto de las personas del departamento de Genética Humana, quienes más que compañeros de trabajo se han convertido en mi **familia académica**.

A la Fundación Carlos Slim de la Salud por el apoyo económico brindado a través de la Beca Impulso para la Investigación 2016-2018. Este trabajo forma parte del proyecto 068/2015 el cual contó con Recursos Fiscales de Fondos Federales del INP.

## Índice

Resumen estructurado.....	6
Antecedentes y Marco Teórico .....	8
Planteamiento del problema.....	14
Pregunta de investigación.....	14
Justificación.....	14
Objetivos .....	15
Clasificación de la investigación .....	15
Población de Estudio .....	16
Criterios de Selección .....	16
Material y Métodos.....	17
Análisis estadístico.....	19
Consideraciones éticas.....	19
Consideraciones de bioseguridad.....	20
Factibilidad.....	20
Resultados.....	20
Discusión.....	29
Conclusiones.....	35
Anexos .....	36
Anexo 1 Hoja de captación de datos .....	36
Anexo 2 Hoja de consentimiento informado (Tutor de caso índice).....	39
Anexo 3 Hoja de consentimiento informado (Caso índice) .....	42
Anexo 4 Hoja de consentimiento informado (Familiares 1er grado) .....	45
Anexo 5 Hoja de asentimiento informado (Hermano(a) caso índice).....	48
Anexo 6 Secuencias de los primers que se utilizaron en el estudio molecular de secuenciación automatizada.....	51
Bibliografía .....	54

# **AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO MUTACIONAL EN DISTROFINOPATÍAS: INICIATIVA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.**

## **COAUTORES**

- Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza
  - Tutor de tesis
  - Investigador en Ciencias Médicas “D”, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana.
  
- Dra. Ariadna Estela González del Angel
  - Co-tutor de tesis
  - Investigador en Ciencias Médicas “D”, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana.
  
- Dra. Bernardette Estandía Ortega
  - Médico Especialista en Genética Médica. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana.
  
- M. en C. Cesárea Bermúdez López
  - Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana.
  
- Dr. Alan Caro Contreras
  - Tesista para obtener el grado de Especialista en Genética Médica.

## Resumen Estructurado

**Introducción:** Las distrofias musculares tipos Duchenne/Becker (DMD/DMB) se consideran el trastorno neuromuscular hereditario y letal más frecuente en el humano. La DMD afecta a 1 de cada 3,500 varones recién nacidos vivos, mientras que la DMB afecta a 1 de cada 18,500. Ambas entidades alélicas, heredadas de manera recesiva ligada al cromosoma X, son condicionadas por variantes patogénicas en el gen *DMD* (Xp21.2, MIM \*300377) organizado en 79 exones. Dicho gen codifica a diversas isoformas de la distrofina, proteína esencial para mantener la integridad del sarcolema durante los fenómenos de contracción y relajación muscular. Las mutaciones más frecuentes son las deleciones parciales intragénicas (DelPI), las cuales mediante la técnica de PCR múltiplex (mPCR) de 22 exones, fueron identificadas en 50% de 300 familias captadas en el Laboratorio de Biología Molecular, un porcentaje similar al reportado en otras series nacionales e internacionales (50-60%). En el resto de las familias aún no se tiene caracterizado el genotipo *DMD*, a pesar de que una proporción importante tiene clínica compatible con el diagnóstico de distrofinopatía (DFP). **Justificación:** En el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría (LBM-INP) se tienen captadas más de 300 familias con diagnóstico presuntivo de DMD/B. Aun cuando estas entidades son incurables a la fecha, el diagnóstico temprano permite la intervención oportuna con corticoesteroides así como el seguimiento cardiaco, respiratorio, ortopédico y de rehabilitación que ayudan a mejorar la calidad de vida y la sobrevivencia del paciente. Actualmente un niño diagnosticado y tratado en forma temprana en los países de primer mundo alcanza una expectativa de vida de hasta cuatro décadas, mientras que si no es tratado fallece antes de la segunda década. Así mismo, las mujeres portadoras en una pequeña proporción (3%) manifiestan algunos síntomas de enfermedad, reportándose alteraciones cardíacas hasta en el 18% de los casos. Es imprescindible confirmar el diagnóstico en los pacientes y sus familias con sospecha de DFP para brindarles asesoramiento genético y, eventualmente a las mujeres portadoras, ofrecerles la posibilidad de diagnóstico prenatal. A la fecha aún no se ha reportado el espectro mutacional completo en pacientes mexicanos, que incluya duplicaciones parciales (DupPI) entre otras mutaciones, las cuales explican a nivel internacional un 30-40% de los casos. Estas mutaciones sólo pueden ser identificadas por amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA) y/o secuenciación automatizada completa (SA). La caracterización precisa del genotipo responsable de 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. **Planteamiento del problema:** Las distrofias musculares forman parte de un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que causan debilidad y degeneración muscular progresiva del músculo estriado, condicionantes de la pérdida de la capacidad ambulatoria, con importante compromiso de la función cardíaca y respiratoria que conllevan al deceso prematuro de los pacientes (alrededor de los 20 años de edad). Actualmente las clasificaciones de estas distrofias musculares toman en cuenta el diagnóstico molecular. Mientras que hay grupos en otras partes del mundo que han caracterizado el espectro mutacional del gen *DMD* con técnicas como

mPCR, MLPA y SA con eficacia diagnóstica cercana al 100%, en México sólo se han reportado las DelPI que explican el 50% de los casos. **Objetivo general:** Caracterizar el genotipo *DMD* en pacientes con diagnóstico presuntivo de DMD/DMB con estudio negativo a deleciones por mPCR de 22 exones, mediante MLPA y SA. **Metodología:** Estudio descriptivo, observacional, transversal, ambispectivo y clínico. Se estudiaron 70 pacientes masculinos con trastornos neuromusculares compatibles con DFP con muestra de ADN genómico disponible en el LBM-INP, y que cuenten con un resultado negativo en el estudio molecular de DelPI del gen *DMD*. Se excluirán pacientes con patrón de herencia distinto al recesivo ligado al cromosoma X y a aquellos pacientes sin muestra disponible de ADN bajo resguardo y que no acepten una segunda toma de muestra. Los pacientes cuyo resultado de mPCR sea negativo a deleciones en 22 exones, serán analizados por MLPA para identificar deleciones infrecuentes y duplicaciones en los 79 exones del gen *DMD*. Aquellos que presenten un resultado normal de MLPA, serán analizados por SA los 79 exones para caracterizar mutaciones puntuales, entre otras, y se relacionará el fenotipo DMD/B con el genotipo obtenido. Se determinará la frecuencia de mutaciones en el gen *DMD* y el modo de herencia (mutación heredada vs. *de novo*) mediante el estudio dirigido de la mutación encontrada en las madres de los pacientes con genotipo caracterizado. **Resultados:** Se excluyeron a 2 pacientes erróneamente asignados como varones afectados. En los 68 restantes, la MLPA identificó DelPI (n=5)/DupPI (n=13) en el 26.5% de los casos (n=18/68); en estas últimas se incluye una DupPI discontinua de exones 45-50 y 63-79 e indirectamente se caracterizó una variante puntual [c.2707G>T o p.(Gly903\*)] (n=1/68, 1.5%). Aunque la MLPA corroboró la ausencia de DelPI caracterizables por mPCR en 65 pacientes, 3 de las 5 DelPI identificadas correspondieron a falsos negativos de la mPCR (4.4%). Mediante MLPA en madres disponibles de casos con DelPI/DupPI, se determinó que éstas se heredaron como evento *de novo* en el 46.2% (n=6/13) de los casos y de madre portadora en el 53.8% (n=7/13). Se determinó el genotipo *DMD* responsable por SA en 9 de los primeros 10 pacientes con MLPA normal y logró excluir (n=2/8, 25%) o asignar (n=6/8, 75%) el estado de portadora en madres disponibles (incluye familia con c.2707G>T o p.(Gly903\*). **Discusión y conclusiones:** La MLPA caracterizó un 27.9% de genotipos adicionales (n=19/68) en pacientes con DFP y estudio negativo de mPCR, proporción similar a la descrita en población europea (32.7%). La concordancia de DelPI ausentes por mPCR y corroborada por MLPA (95.6%), justifica que la primera prueba, económicamente más accesible, continúe como estudio de primera línea diagnóstica antes del MLPA/SA ante la sospecha de DFP. Los criterios empleados para la selección de los primeros pacientes para SA aseguraron un alto porcentaje de identificación del genotipo responsable (90%).



## ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

### Definición del problema

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades clínicas y genéticamente heterogéneas que comparten como característica clínica la debilidad y degeneración muscular progresiva. La amplia variabilidad en su presentación clínica refleja la heterogeneidad genética de los mecanismos moleculares responsables que las subyacen, oscilando desde distrofias musculares congénitas a un inicio en la adultez. También comparten la mayoría de ellas a nivel histológico la fibrosis y el reemplazo de fibras musculares por tejido adiposo. El mecanismo de la enfermedad varía considerablemente entre las formas específicas de distrofia muscular. Se han descrito variantes patogénicas en genes responsables de proteínas asociadas a membrana, con función de proteasa y regulación transcripcional. Históricamente, el primer gen clonado por metodología de posicionamiento clonal fue el gen de la Distrofia Muscular de Duchenne (*DMD*), el cual codifica para la proteína de la distrofina. Todas aquellas patologías que se encuentren condicionadas por alteraciones de dicha proteína son conocidas como distrofinopatías (DFP). La enfermedad arquetípica es la DMD [Flanigan, 2012].

Tradicionalmente se ha clasificado a las distrofias musculares por sus características clínicas e histopatológicas, sin embargo más recientemente la mayoría de ellas se ha clasificado en base a la confirmación de un estudio molecular [Aartsma-Rus, 2016]. Las DFP incluyen tanto a la distrofia muscular de Duchenne (DMD), como a la distrofia muscular de Becker (DMB), aunque en realidad comprenden un espectro de enfermedades musculares causadas por variantes patogénicas en *DMD*. En el espectro más leve de esta entidad se encuentran individuos con elevación asintomática de la creatina quinasa (CK), con calambres musculares y mioglobinuria pero sin debilidad muscular. En el espectro severo se encuentra la DMD con afección principal a nivel de músculos esqueléticos y cardíaco, mientras que la DMB es una versión un poco más leve que la anterior [Domingos, 2017; Wein, 2015].

### Epidemiología y Estadística

La DMD es la enfermedad muscular hereditaria más común [Domingos, 2017]. La prevalencia de todas las distrofias musculares combinadas es de alrededor de 16.14 por cada 100,000, o de 1 en 6,200 [Mah, 2016]. La prevalencia de DMD y de DMB es de 4.78 y 1.53 por 100,000 varones, respectivamente. La incidencia de DMD oscila de acuerdo a lo reportado en la literatura internacional entre 10.71 a 27.78 por 100,00 [Mah, 2014], aunque la estimación más frecuentemente utilizada es la de 1 en 3,500 recién nacidos vivos (RNV) varones para DMD y 1 en 18,500 RNV varones para DMB.

Estos datos varían considerablemente de acuerdo a la bibliografía consultada, ya que algunos autores toman en cuenta la prevalencia al momento del diagnóstico, mientras que otros lo toman al nacimiento. Los últimos datos publicados al respecto refieren la prevalencia puntual en Francia, Estados Unidos, Reino Unido y Canadá, la cual es de 10.9, 1.9, 2.2 y 6.1,

respectivamente por 100,000 RNV varones para DMD [Ryder, 2017]. No se cuenta con una cifra similar de pacientes mexicanos al no haber literatura publicada al respecto.

El costo económico de estas entidades escala de forma dramática conforme progresa la enfermedad. En un estudio en Alemania se reportó que el promedio anual del costo generado por atención médica directa (manejo intra y extra hospitalario, rehabilitación, medicamentos, soporte respiratorio) en pacientes con DMD en etapa I (fase ambulatoria temprana) fue de 4,220 euros, mientras que este costo ascendió a 68,968 euros para pacientes en etapa V (fase no ambulatoria). Estas cifras para pacientes con DMB fueron de 2,470 euros y 19,349 euros en etapas I y V, respectivamente [Schreiber-Katz, 2014]. Esto refleja un incremento de 16 veces para pacientes con DMD, y de cerca 8 veces para pacientes con DMB, lo que resalta el impacto de la severidad y la progresión de la enfermedad además de comparar la carga económica de DMD con la forma alélica más leve de DMB [Ryder, 2017].

Aunque de forma primaria esta es una entidad ligada al cromosoma X (herencia por rama materna) que sólo afecta a varones, algunas mujeres portadoras (alrededor del 10%) se vuelven sintomáticas aunque generalmente con un fenotipo mucho más leve. Además de escasos casos asociados con rearrreglos cromosómicos, la mayoría de las mujeres afectadas se asume sea a consecuencia de una inactivación sesgada del cromosoma X [Bushby, 2010].

## **Fisiopatología**

Las distrofinopatías son causadas por mutaciones en *DMD*, uno de los genes más largos del genoma humano con 2.22 megabases (Mb). Consta de 79 exones, los cuales comprenden solamente el 0.6% del gen. El 99.4% restante está conformado por secuencias intrónicas. Este gen codifica para la proteína distrofina de 427 kilodaltones, la cual está conformada de 3,685 aminoácidos, con ocho promotores y siete transcritos distintos que pueden ser encontrados en músculo liso, esquelético y cardíaco, así como células corticales, de Purkinje, gliales, retinianas y renales [Aartsma-Rus, 2016; Muntoni, 2003].

La distrofina se compone de un dominio amino-terminal que constituye el sitio de unión a la actina, un dominio central largo con 21 repetidos de espectrina, un segmento rico en cisteína unido al  $\beta$ -dístroglicano en el sarcolema y un dominio carboxi-terminal con muchos sitios de fosforilación (Figura 1). La distrofina, junto con el sarcoglicano  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ , el  $\beta$  dístroglicano, sarcospan, sintrofinas, distrobrevina y la sintasa de óxido nítrico conforman el complejo distrofina-glicoproteína (Figura 2). Este complejo mecánicamente une el aparato contráctil de la fibra muscular (el sarcómero) a la matriz extracelular. La distrofina también juega un rol en la comunicación a través del sarcolema [Wicklund, 2013].



De forma normal, la distrofina actúa como un amortiguador o disipador de choque durante la contracción de la fibra muscular al unir la actina del aparato contráctil a la capa de tejido conectivo que envuelve a cada fibra muscular. En DMD, las variantes patogénicas que sufre el gen van a abolir la función de la distrofina ya sea al modificar el marco de lectura o generando un codón de paro prematuro. Como resultado, la unión entre la actina del citoesqueleto y el tejido conectivo se pierde y las fibras musculares se vuelven muy susceptibles a daño durante la contracción muscular, llevando a un daño muscular crónico, inflamación y eventualmente reemplazo de fibras musculares por tejido adiposo y fibrótico y por lo tanto pérdida de la función muscular. Por el contrario, en la DMB generalmente las variantes patogénicas mantienen abierto el marco de lectura, permitiendo la producción de distrofina parcialmente funcional. Por consiguiente, los individuos con DMB muestran una edad de inicio más tardía y una progresión más lenta de la enfermedad [Domingos, 2017].

La tasa de mutación es relativamente alta, encontrando que dos terceras partes de las variantes son mutaciones *de novo*. Aunque la mayoría de los pacientes tiene una delección (~68%) o duplicación (~11%) de uno o más exones, también se describen variantes puntuales (~20%). Estas delecciones o duplicaciones pueden ocurrir a lo largo de todo el gen, sin embargo se concentran entre los exones 45-55 y exones 2-10 para delecciones y duplicaciones, respectivamente, sitios a los cuales se les conoce como sitios proclives o “*hot-spots*” [Aarstma-Rus, 2016].

Hay distintas formas en que las variantes pequeñas pueden interferir con la producción de la distrofina. Delecciones o duplicaciones pequeñas pueden alterar el marco de lectura a nivel exónico, lo que se traduce en una distrofina no funcional. Las variantes puntuales generar un codón de paro o pueden afectar el sitio de corte y empalme intrón-exón (*splicing*). Estas variantes en el sitio de *splicing* generalmente causan una delección de un solo exón, lo que puede traducirse en una distrofina parcialmente funcional o no funcional, dependiendo de si el exón se encontraba dentro o fuera del marco de lectura, respectivamente. En menos de 1% de los pacientes se describen otro tipo de variantes, tales como las variantes intrónicas profundas o translocaciones que involucran el gen *DMD* [Aarstma-Rus, 2016; Wein, 2015].

Cerca del 10% de las variantes patogénicas no obedecen la regla del marco de lectura, es decir, pacientes con variantes dentro del marco de lectura pueden desarrollar DMD, mientras que pacientes con variantes fuera del marco de lectura pueden desarrollar DMB. Más aún, para ciertas variantes se han descrito pacientes tanto de DMD como de DMB. Así mismo, el grado de severidad para pacientes DMD/B puede variar aún con la misma variante, incluso en ocasiones aún dentro de una misma familia, por lo que se sugiere que existan modificadores genéticos que jueguen un papel importante en determinar la severidad de la enfermedad [Aarstma-Rus, 2016].

## Diagnóstico

El diagnóstico de DMD/B debe sospecharse en todo paciente masculino con retraso en el desarrollo motor y pseudohipertrofia muscular a nivel de gastrocnemios, especialmente si cuenta con antecedentes familiares. Los síntomas iniciales como retraso al inicio de la deambulación, caídas frecuentes y dificultad para correr y subir escaleras tienden a aparecer entre el primero y el tercer año de vida, afectándose inicialmente los músculos de los gemelos, de la pelvis y de los muslos. Los varones afectados son físicamente más lentos que el resto de sus compañeros, marchan en puntas y eventualmente desarrollan el signo de Gowers. Los niños con DMD típicamente requieren de uso de silla de ruedas entre los 8 y los 14 años debido a la pérdida de la deambulación ocasionada por la debilidad muscular [Flanigan, 2014; Ryder, 2017].

Una vez que el paciente pierde la deambulación, ciertas complicaciones progresan más rápidamente como la escoliosis y las contracturas musculares. Así mismo, dicha escoliosis puede condicionar deformidad de la cavidad torácica, con la dificultad respiratoria consiguiente. La cardiomiopatía se hace evidente alrededor de los 20 años de vida, lo que aunado a la debilidad de los músculos respiratorios pone al paciente en riesgo de muerte. Aún con tratamiento médico, la mayoría de los pacientes con DMD fallecen alrededor de los 30 años por falla cardíaca o respiratoria. La edad al diagnóstico en países europeos se ha reportado en promedio de 4 años de vida [Ryder, 2017].

Como parte del abordaje se deberán realizar una serie de estudios de laboratorio y gabinete para su confirmación, apoyando fuertemente el diagnóstico una elevación de la creatina quinasa (CK) sérica de 10 a 200 veces. Las enzimas hepáticas pueden estar discretamente elevadas reflejando una transaminitis por involucro muscular y no por enfermedad hepática. La electromiografía (EMG) va a revelar unidades motoras miopáticas con o sin inestabilidad de la membrana muscular. Históricamente la biopsia de músculo con técnicas de inmunohistoquímica en busca de la distrofina era la manera de confirmar el diagnóstico. Actualmente las técnicas de diagnóstico molecular son las que constituyen las pruebas diagnósticas confirmatorias [Wein, 2015].

En el abordaje del diagnóstico molecular se deben tomar en cuenta la frecuencia de las distintas variantes patogénicas que ocasionan la entidad. Dado que la mayor parte de las variantes son deleciones y duplicaciones (~70%), las guías de práctica clínica recomiendan iniciar con estudio de MLPA. Sin embargo, en nuestro medio, por la rapidez, facilidad relativa de la técnica y costo bajo en comparación con MLPA, el estudio molecular de primera línea es la PCR múltiple (mPCR) de 22 exones. Si no se demuestra una variante por estas metodologías, se deberá buscar entonces una variante puntual a través de la técnica de secuenciación automatizada Sanger (SA) [Aarstma-Rus, 2016]. Algunos grupos han caracterizado el espectro mutacional del gen *DMD* en poblaciones de Canadá [Mah, 2011], Japón [Takeshima, 2010], Australia [Taylor, 2007] e Italia [Magri, 2011] con técnicas como mPCR, MLPA y SA con las cuales han tenido una eficacia de diagnóstico cercana al 100%. En México sólo se tienen reportes con mPCR, técnica con la que se han podido definir el patrón de deleciones, pero no ha sido posible determinar el espectro

mutacional completo [Alcántara, 1999; Coral-Vázquez, 1993; González-Herrera, 2009; Alcántara, 2001].

El diagnóstico temprano de DMD/B tiene implicaciones importantes tanto para el paciente como para la familia. Una vez que se ha identificado una variante en el paciente, se puede realizar la búsqueda de la misma variante en la madre para determinar el estado de portadora. El estatus de portadora en la madre tiene repercusiones en la planificación familiar y dicta que los otros miembros femeninos de la familia son portadores potenciales [Aarstma-Rus, 2016].

## **Tratamiento**

Actualmente no hay un tratamiento curativo para DMD/B, enfocándose las opciones terapéuticas en aliviar los síntomas y manejar las complicaciones. En 2010 las recomendaciones eran considerar glucocorticoides, incluyendo deflazacort y prednisona, como medicamentos de primera línea para pacientes DMD de dos años o mayores cuya condición no estaba mejorando [Bushby, 2010]. Los glucocorticoides se siguen indicando para pacientes de 6 años y mayores para ayudar a disminuir la pérdida de la fuerza y función muscular. Se recomienda que los pacientes, sobre todo aquellos con factores de riesgo pre-existentes, sean monitoreados en busca de efectos adversos tales como aumento de peso, retraso en el crecimiento, desmineralización ósea y riesgo de fracturas. También se han publicado guías para el manejo respiratorio, sin embargo, las distintas guías de manejo comparten que el paciente con DMD/B requiere de un abordaje multidisciplinario en su manejo y cuidado, incluyendo el uso de corticoides, cuidado coronario, cuidado pulmonar, terapia física, consideraciones quirúrgicas y cuidado psicosocial [Kinnett, 2015].

Se refiere que la esperanza de vida de un paciente con DMD en Francia entre 1970 y 1994 era de 40.95 años, mientras que la misma entre 1955 y 1969 era solo de 25.77 años. Este aumento considerable se ha atribuido al uso de esteroides, mayor acceso a ventilación asistida y al desarrollo de guías específicas de manejo [Ryder, 2017].

Con el surgimiento de las nuevas técnicas de terapia génica, la importancia del diagnóstico molecular ha cobrado aún mayor importancia para la selección y evaluación de cada una de las opciones terapéuticas del paciente. Por ejemplo, el Ataluren ya se ha aprobado en Europa para el tratamiento de DMD causado por variantes que generan un codón de paro prematuro (en niños de 5 años de edad o mayores). Así mismo, la identificación exacta de la variante patogénica es importante para la terapia antisentido de salto exónico [Aarstma-Rus, 2016].

Por lo tanto, la prueba confirmatoria genética del gen *DMD* tiene implicaciones en el pronóstico de la enfermedad, determina el asesoramiento genético y permite evaluar las opciones terapéuticas del paciente con respecto a las nuevas técnicas de terapia génica comercialmente disponibles.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las distrofias musculares forman parte de un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que causan debilidad y degeneración muscular progresiva del músculo estriado, condicionantes de la pérdida de la capacidad ambulatoria, con importante compromiso de la función cardíaca y respiratoria que conllevan al deceso prematuro de los pacientes (alrededor de los 20 años de edad). Actualmente las clasificaciones de estas distrofias musculares toman en cuenta el diagnóstico molecular, es decir, el gen y la proteína codificada alterados. Mientras que hay grupos en otras partes del mundo que han caracterizado el espectro mutacional del gen *DMD* con técnicas como mPCR, MLPA y SA con eficacia diagnóstica cercana al 100% [Magri, 2011; Mah, 2011; Takeshima, 2010; Taylor, 2007], en México sólo se han reportado las deleciones parciales intragénicas que explican el 50% de los casos [Alcántara, 1999; Coral-Vázquez, 1993; González-Herrera, 2009; Alcántara, 2001].

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el espectro mutacional completo del gen *DMD* en población mexicana con clínica compatible con DMD/B?

## JUSTIFICACIÓN

El Instituto Nacional de Pediatría es un centro nacional de referencia para pacientes con trastornos neuromusculares. Aun cuando estas entidades son incurables a la fecha, el diagnóstico temprano permite la intervención oportuna con corticoesteroides así como el seguimiento cardíaco, respiratorio, ortopédico y de rehabilitación que ayudan a mejorar la calidad de vida y la sobrevida del paciente. Actualmente un niño diagnosticado y tratado en forma temprana en los países de primer mundo alcanza una expectativa de vida de hasta cuatro décadas, mientras que si no es tratado fallece antes de la segunda década de la vida. Así mismo, las mujeres portadoras en una pequeña proporción (3%) manifiestan algunos síntomas de enfermedad, reportándose alteraciones cardíacas hasta en el 18% de los casos.

Es importante implementar el diagnóstico molecular para el abordaje de los pacientes con sospecha clínica de DFP, ya que es un estudio menos invasivo que las biopsias musculares o la EMG. En estas familias es imprescindible confirmar el diagnóstico para brindarles asesoramiento genético de certeza y eventualmente a las mujeres portadoras brindarles la posibilidad de diagnóstico prenatal, pues algunas de ellas se encuentran en etapa reproductiva.

En el LBM-INP se tienen captadas más de 300 familias con diagnóstico presuntivo de DMD/B de las cuales hasta el momento sólo se han identificado DeIPI del gen *DMD* en el 50% de ellas a través de mPCR de 22 exones [Alcántara, 1999; Alcántara, 2001; Bermúdez-López, 2014]. Sin embargo, falta confirmar el diagnóstico de DFP en cerca de 150 familias que resultaron sin deleciones a través de esta técnica y aún no se tiene caracterizado el genotipo

*DMD*, a pesar de que una proporción importante tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X y clínica compatible con el diagnóstico de DFP.

En México varios grupos desde la década de los 90's han reportado la prevalencia de DelPI responsables de distrofinopatías identificadas a través de mPCR [Coral-Vázquez, 1993], sin embargo, aún no se ha definido la proporción de deleciones infrecuentes que ocurren fuera de los "*hot spots*", así como DupPI, ni el espectro de mutaciones pequeñas heterogéneas las cuales explican a nivel internacional un 30-40% de los casos. Estas variantes patogénicas sólo pueden ser identificadas por amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA) y/o secuenciación automatizada completa (SA). La caracterización precisa del genotipo responsable de 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.

## OBJETIVOS

- **General**
  - o Caracterizar el genotipo *DMD* en pacientes con diagnóstico presuntivo de DMD/B con estudio negativo a deleciones por mPCR de 22 exones.
  
- **Particulares**
  - o Caracterizar deleciones 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 10 pacientes negativos a deleción 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 originadas *de novo*.

## CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Se trata de un estudio descriptivo, observacional, transversal, ambispectivo y clínico.



## 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 LBM-INP, y que cuenten con un resultado negativo en el estudio molecular de deleciones parciales intragénicas del gen *DMD*.

### *Población Elegible:*

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

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

- **Criterios de Inclusión**
  - o 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 deleciones parciales intragénicas del gen *DMD*.
  - o Que cuenten con CK elevada, EMG con patrón miopático y biopsia muscular con inmunohistoquímica con distrofina alterada.
- **Criterios de Exclusión**
  - o 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 LBM-INP fuera inadecuada y no acepten una segunda toma de muestra.
  - o Temporal: Pacientes transfundidos en un periodo de 3 meses.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Descripción general del estudio**

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado: "Delineación del espectro mutacional del gen *DMD* responsable de distrofinopatías: Identificación de mutaciones infrecuentes por Amplificación Múltiple de Sondas Ligadas (MLPA) y Secuenciación Automatizada" que se realiza en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, el cual está aprobado por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del INP con el número de registro 068/2015.

Este estudio estuvo dirigido para caracterizar las variantes patogénicas de *DMD* en pacientes pediátricos con resguardo de ADN en el LBM-INP con diagnóstico clínico y de gabinete de distrofinopatía, con estudio negativo de mPCR de 22 exones, a través de las técnicas de MLPA y SA para posteriormente establecer una correlación fenotipo-genotipo, determinar el estado de portadoras en las mujeres emparentadas al caso índice y a su vez establecer la proporción de casos *de novo*.

### **Tamaño de la muestra**

Se incluyeron 70 pacientes masculinos (intervalo de edad al momento de su captación de acuerdo a expediente clínico disponible: 4-14 años), no relacionados entre sí, referidos entre los años 1991 a 2016 con clínica de DFP (DMD=14, DMB=4, fenotipo intermedio=1, no referido=41, con preservación de la marcha=10) por los servicios de Genética y/o Neurología Pediátrica del INP, con muestra de ADN genómico disponible de buena calidad y cantidad bajo el resguardo del LBM-INP y con (35.7%, n=25) o sin (64.3%, n=45) antecedentes familiares de DFP por rama materna. La totalidad de los 70 pacientes contaban con un estudio molecular previo negativo para DelPI en mPCR de 22 exones representativos de los 2 *hot-spots* del gen *DMD* (exones pm1, 3, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 43 al 45, 47 al 55 y 60).

### **Captación de pacientes**

Las variables se registraron en la hoja de captación de datos con base en el expediente del paciente y su exploración física (Anexo 1). Se solicitó la autorización y firma del consentimiento y/o asentimiento informado de pacientes y sus padres o tutores (Anexo 2 y 3).

Se recontactó a los pacientes con estudio negativo a deleciones del gen *DMD* por mPCR ya captados en el Laboratorio de Biología Molecular, que fueron referidos a nuestro laboratorio por los servicios de Neurología Pediátrica y/o Genética para la caracterización de DelPI del gen *DMD* como parte del abordaje diagnóstico de un trastorno neuromuscular (distrofinopatías). A ellos y a sus progenitores se les invitó a participar en el presente estudio y se les solicitó la firma del consentimiento y/o asentimiento informado (Anexos 2 y 3), para la autorización del estudio molecular del gen *DMD* por MLPA y SA en la muestra de ADN disponible bajo resguardo del Laboratorio de Biología

Molecular. En los casos en que la muestra resguardada no era de suficiente calidad y se pudo contactar aún al paciente, se solicitó una segunda toma de muestra de sangre por venopunción para la obtención de ADN genómico.

A los familiares de primer grado de casos afectados donde se identificó un genotipo *DMD* diagnóstico de distrofinopatía, previo asesoramiento genético, se les invitó a participar también en el protocolo. De ellos con autorización y aceptación de consentimiento y/o asentimiento informado (Anexos 4 y 5), se obtuvo una muestra de sangre periférica, de 3 a 5 ml, para realizar una búsqueda dirigida de la mutación ya sea por MLPA o por secuenciación automatizada [Sakthivel, 2013; Verma, 2012; Yang, 2013].

## **Metodología molecular**

### **a) MLPA gen *DMD* (80 exones)**

El ADN genómico (~200 ng por reacción) de los 70 pacientes se sometió a evaluación de dosis génica mediante MLPA para los exones 1 al 79 de la isoforma Dp427m, más el exón 1 de la isoforma Dp427c del gen *DMD* en dos reacciones múltiplex y de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante (SALSA® MLPA® probemix P034-B1 *DMD* y P035-B1 *DMD*, MRC-Holland®), las cuales incluyen además sondas de referencia para normalización y comparación de dosis génica ubicadas en loci diferentes al locus *DMD*, para determinación de complemento sexocromosómico (cromosomas X y Y) y de evaluación de la calidad de la reacción (fragmentos “Q”, “Lig” y “DD”). En el ensayo se incluyó un control masculino sano, así como un control sin ADN genómico (blanco). Los productos de PCR marcados con fluorescencia (6-FAM) de ambas reacciones de MLPA se resolvieron mediante electroforesis capilar de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante y los electroferogramas resultantes fueron analizados mediante el Programa Coffalyser.Net (MRC-Holland®). Las alteraciones en la dosis génica de un solo exón se corroboraron por PCR de punto final y SA del exón aparentemente deletado (DelPI), PCR en tiempo real (DupPI) [Bermúdez-López, 2014] o un segundo ensayo de MLPA independiente con SA adicional del exón involucrado (DupPI).

### **b) SA completa del gen *DMD***

Se realizó una selección de los primeros 10 pacientes (3 casos familiares) con resultado de MLPA normal para la SA completa del gen *DMD* con base en cuadro clínico altamente sugestivo de DFP emitido por médico genetista y/o neurólogo pediatra (n=10/10), elevación característica de creatinín-fosfoquinasa (CPK) sérica (n=10/10), EMG con patrón miopático (n=4/10), antecedentes familiares positivos compatibles con un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X (n=3/10) o biopsia muscular con cambios distróficos y/o alteración (ausencia o distribución irregular) en el patrón de inmunohistoquímica para distrofina (n=6/10) (Tabla 2). El ADN genómico de estos pacientes se sometió a PCR de punto final (~10 ng/reacción) para amplificar en formato de placa de 96 muestras y un solo programa de termociclado a los 79 exones en 78 amplicones unidos al vector M13F para su secuenciación con un solo primer de acuerdo a las condiciones previamente reportadas [Marquis-Nicholson, 2013]. Los amplicones generados incluyeron la

secuencia codificante completa (nucleótidos c.1 a c.11058) traducida en los 3,685 aminoácidos que comprenden a la principal isoforma muscular Dp427m, así como los bordes exón-intrón y parte de las secuencias 5' (nucleótidos c.-80 a c.-1) y 3' (nucleótidos c.\*1 a c.\*25) no traducibles del gen. La calidad de los amplicones se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, Inc.) y visualizados bajo luz ultravioleta, para posteriormente ser purificados enzimáticamente (ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup, Affymetrix, Inc.) previo a su SA directa (tipo Sanger con Big Dye® Terminator Cycle Sequencing kit, Life Technologies, servicio contratado con MACROGEN USA, Rockville, Maryland, USA, <https://www.macrogenusa.com/>) y alineación con las secuencias de referencia genómica y de la isoforma Dp427m (NG\_012232.1 RefSeqGene y NM\_004006.2) a través del programa ChromasPro versión 1.7.7. La anotación de las variantes encontradas se realizó con el programa Mutalyzer 2.0.22 (<https://mutalyzer.nl/name-checker>) o Alamut Visual versión 2.7.2. En un paciente adicionalmente se amplificó y se secuenció la totalidad del promotor de la isoforma Dp427m (posiciones c.-677 a c.-149).

En las madres y otros familiares femeninos disponibles de casos con genotipo caracterizado, se les brindó estudio dirigido (MLPA o SA) para el diagnóstico de portadoras.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis descriptivo para las frecuencias de mutaciones en el gen *DMD* tanto en casos únicos como familiares, mismos que se representarán como porcentajes en la población de estudio.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Este protocolo de investigación se apegó a los principios de las buenas prácticas clínicas, de la declaración de Helsinki y de las regulaciones de Salud en México (Art. 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud). En todos los casos se solicitó el consentimiento y/o asentimiento informado (Anexo 2 y 3). La información clínica obtenida queda resguardada bajo llave. Los datos clínicos y genéticos quedan encriptados en archivos electrónicos. Sólo los investigadores responsables del proyecto tienen la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad. La muestra de ADN genómico que ya no se necesite queda codificada bajo una clave que no incluya el nombre ni datos clínicos del paciente, en el contenedor de dicha muestra, y ésta queda bajo el resguardo del LBM-INP, de la Secretaría de Salud, manteniendo la confidencialidad de la información derivada.

## CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

En este proyecto se trabajaron muestras biológicas de humano (sangre periférica) así como reactivos inflamables (etanol e isopropanol). El manejo de residuos y productos peligrosos se realizó de acuerdo al Plan de Manejo de Materiales Peligrosos y Residuos Hospitalarios del INP.

## FACTIBILIDAD

El grupo de trabajo del LBM-INP cuenta con un banco de ADN de pacientes (alrededor de 150 casos no relacionados) con diagnóstico clínico de DFP, además de los recursos humanos y el equipamiento necesario para el estudio molecular. Los gastos derivados de materiales y servicios de electroforesis capilar y secuenciación automatizada necesarios fueron solventados a través de Recursos Fiscales (proyecto 068/2015, Programa E022 Investigación y Desarrollo Tecnológico en Salud, Modalidad A)-INP. Además, el Dr. Alan Caro cuenta con el apoyo económico otorgado por la Fundación Carlos Slim, a través de la beca Impulso para la Investigación 2016-2018.

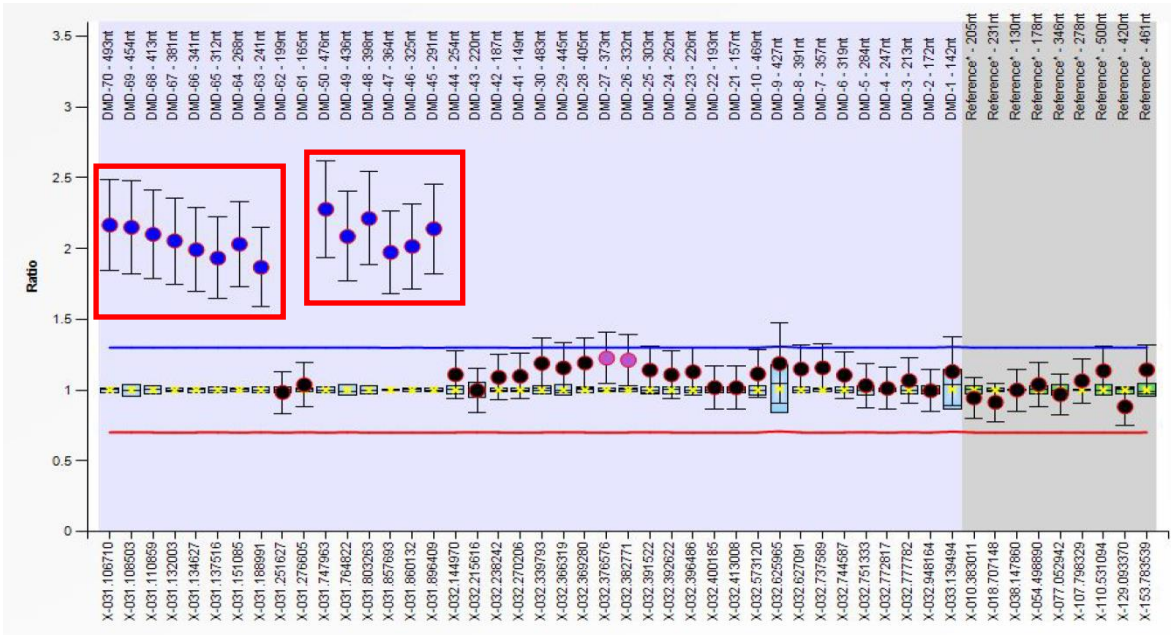
## RESULTADOS

El análisis de los 80 exones por MLPA en los 70 pacientes identificó a 2 de ellos (DMD-301 y DMD-359) con ausencia del fragmento de 105 pares de bases (pb) correspondiente al cromosoma Y, lo que sugería un complemento sexocromosómico 46,XX. En estas muestras se procedió a amplificar por PCR de punto final a un fragmento del gen SRY (270 pb, Yp11.2), mismo que resultó negativo (datos no mostrados). Estos pacientes fueron captados durante los años 1991 y 1993, por lo que asumimos una confusión de etiquetado y por ende fueron excluidas de subsecuentes análisis.

La MLPA en los 68 pacientes restantes identificó DelPI (n=5) y DupPI (n=13, incluye una duplicación no continua de exones 45-50 y 63-79, figura 3) en el 26.5% de los casos (n=18/68), e indirectamente una variante puntual patogénica por aparente DelPI en el exón 21 (n=1/68, 1.5%). La Tabla 1 concentra las alteraciones del gen *DMD* caracterizadas directa o indirectamente por la MLPA en los 68 pacientes, así como algunos de los datos relevantes de tipo clínico y de laboratorio/gabinete disponibles de los pacientes.

De acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante de los ensayos de MLPA, todas las alteraciones en la dosis génica, ya sean "0 copias" para DelPI o "2 copias" para DupPI en varones afectados hemicigotos, se corroboraron por otra metodología o un segundo ensayo de MLPA más SA del exón involucrado. Las DelPI del exón 18 en paciente DMD-1834 y del exón 45 en paciente DMD-128 (n=2/5 DelPI identificadas por MLPA), fueron corroboradas por la ausencia del amplicón correspondiente aunada a la presencia del amplicón de un exón control (sin DelPI) mediante un ensayo de PCR de punto final con primers específicos de los exones involucrados y empleados para generar los amplicones del ensayo de SA. En el paciente DMD-1803 con aparente delección

del exón 21, el ensayo de PCR de punto final sí generó el amplicón de dicho exón, lo cual obligó a secuenciar dicho fragmento para descartar variantes que interfirieran con la hibridación y/o ligación de las sondas 5' y 3' de MLPA del exón 21. La SA de dicho amplicón reveló la presencia de la variante patogénica c.2707G>T o p.(Gly903\*) que interfiere con el sitio de hibridación de la sonda 5' de MLPA del exón 21 (figura 4).



**Figura 3.** Resultados de la evaluación genética del kit P034-DMD-1 de MLPA en el paciente DMD-1872 (caso único) que ilustra la presencia de una DupPI no continua que involucra los exones 45-50 y 63-79. Los recuadros señalan la presencia de 2 copias anormales para los exones 45-50 y 63-70; la dosis anormal de 2 copias para los exones 71-79 se documentó con el kit P035-DMD-1 (datos no mostrados). Cabe mencionar que la predicción del efecto de esta mutación en la síntesis de distrofina se ve limitada al no tener una delimitación precisa de la extensión real de la DupPI hacia el extremo 3' del gen (el kit de MLPA no incluye sondas distales al exón 79) y debido al desconocimiento si ambas duplicaciones estrictamente se encuentran arregladas en *-cis* y en *tándem*, aunque el paciente tiene un curso clínico menos severo que el fenotipo esperado para Duchenne con capacidad de deambulación aún conservada a los 12 años de edad y sin tratamiento con corticoesteroides. Debido a que no se dispone de la madre del paciente, se desconoce si este rearrreglo se originó como evento *de novo* o de madre portadora. Este tipo de rearrreglos complejos se han descrito en el 1-2% como condicionantes de DFP en pacientes con estudio normal de mPCR.

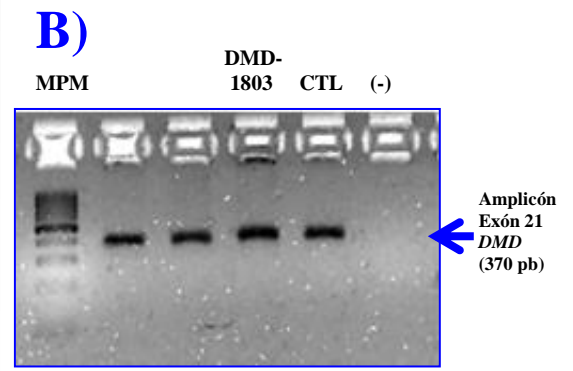
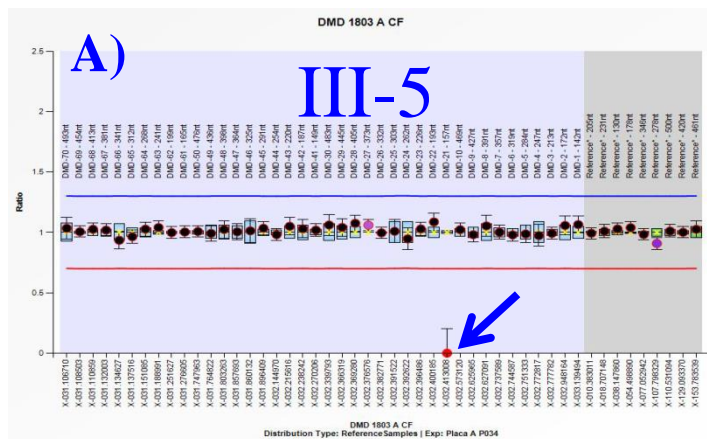
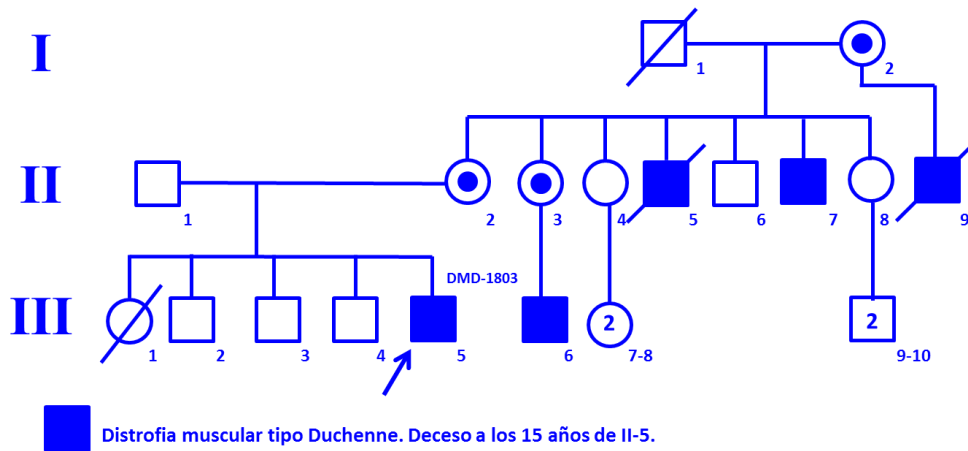
**Tabla 1. Pacientes con DelPI/DupPI y otras alteraciones identificadas por MLPA del gen DMD. Se incluyen datos relevantes clínicos, de laboratorio, gabinete y origen de la mutación a través del estudio dirigido de la madre.**

No.	Clave del Paciente	Exones involucrados	Predicción de integridad de marco de lectura**	Fenotipo referido	Técnica de confirmación	Antecedentes Familiares-Resultado MLPA-madre
<b>DelPI</b>						
1	DMD-386	Exones 7-9	<i>Out of frame</i>	NR	-	Único NO PORT
2	DMD-1355	<b>Exones 31-43*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	PCR punto final para el exón 43	Único NO PORT
3	DMD-128	<b>Exón 45*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	PCR punto final para exón 45	Único Madre no disponible
4	DMD-1834	<b>Exón 18*</b>	<i>Out of frame</i>	9 años 11 m y deambula	PCR punto final para exón 18	<b>Familiar (DMD) PORT</b>
5	DMD 1302	<b>Exones 22-29*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	-	Familiar Madre no disponible
<b>DupPI</b>						
6	DMD-752	<b>Exones 3-5*</b>	<i>In frame</i>	DMB	-	Único NO PORT
7	DMD-425	<b>Exones 17-21*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	-	<b>Único PORT</b>
8	DMD-1561 <sup>a</sup>	<b>Exones 30-43*</b>	<i>Out of frame</i>	DMD	-	Único NO PORT
9	DMD-1191 <sup>a</sup>	<b>Exón 52*</b>	<i>Out of frame</i>	14 años y deambula	PCR-tr	Único NO PORT
10	DMD 1585	<b>Exón 52*</b>	<i>Out of frame</i>	DMD	PCR-tr	Único Madre no disponible
11	DMD 1751	<b>Exón 52*</b>	<i>Out of frame</i>	14 años y deambula	PCR-tr	Único Madre no disponible
12	DMD-899	<b>Exones 3-6*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	-	<b>Familiar PORT</b>
13	DMD-1430	Exones 34-43	<i>Out of frame</i>	NR	-	<b>Familiar PORT</b>
14	DMD-907	<b>Exones 44-55*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	-	<b>Familiar PORT</b>
15	DMD-1749	Exones 46-49	<i>Out of frame</i>	DMD	-	<b>Familiar (DMD) PORT</b>
16	DMD-1460	Exones 60-67	<i>In frame</i>	Intermedio	-	<b>Familiar (DMD/DMB) PORT</b>
17	DMD-1432	<b>Exón 2*</b>	<i>Out of frame</i>	NR	2°. Ensayo MLPA y SA de exón 2	Único NO PORT
18	DMD-1872	DupPI discontinua Exones 45-50 y 63-79	No valorable (se desconoce límite 3')	12 años y deambula	-	Único Madre no disponible
<b>Variantes patogénicas identificadas por SA por aparente delección de un sólo exón</b>						
19	DMD-1803	c.2707G>T p.(Gly903*) (exón 21)	Variante puntual sin sentido	8 años y deambula	PCR punto final/ SA exón 21	<b>Familiar (DMD) PORT</b>

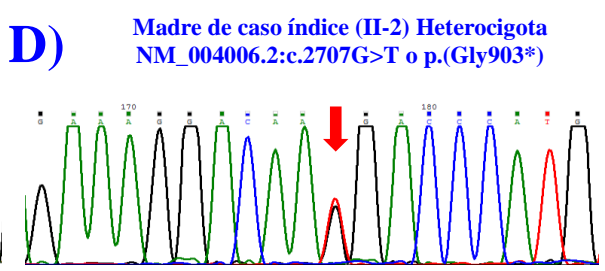
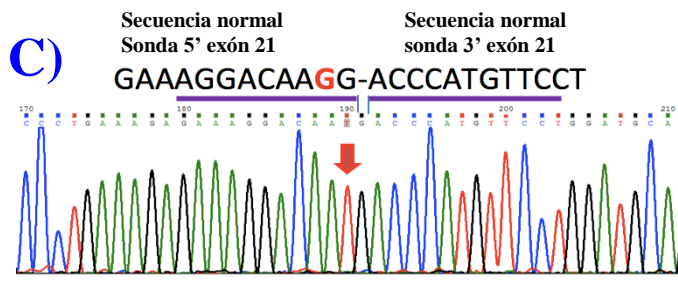
PIE DE TABLA 1:

<sup>a</sup>. Pacientes con reporte de patrón irregular en la evaluación inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular.  
\* Mutaciones previamente descritas en otros pacientes con DFP según la base de datos de *The DMD mutations database UMD-DMD France* ([http://www.umd.be/DMD/W\\_DMD/index.html](http://www.umd.be/DMD/W_DMD/index.html)) y *Leiden Open Source Variation Database* (<http://www.lovd.nl/3.0/home>).

\*\*Datos obtenidos 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>).  
 Abreviaturas: DelPI: deleciones parciales intragénicas; DupPI: duplicaciones parciales intragénicas; NO PORT: madre no portadora; PCR-tr: PCR en tiempo real (método doble delta-Ct); PORT: madre portadora; SA: secuenciación automatizada tipo Sanger; (-): no disponible.



**Caso índice (III-5, DMD-1803) Hemicigoto**  
 NM\_004006.2:c.2707G>T o p.(Gly903\*)



**Madre de caso índice (II-2) Heterocigota**  
 NM\_004006.2:c.2707G>T o p.(Gly903\*)

**Figura 4.** Identificación indirecta por MLPA de una variante patogénica puntual que interfiere con el sitio de hibridación de la sonda 5' del exón 21 del gen *DMD* en un paciente con antecedentes familiares. A) MLPA donde se aprecia "0 copias" sólo para el exón 21 (flecha). B) De acuerdo a los lineamientos para reportar DelPI de un solo exón mediante MLPA, se procedió a corroborar la aparente deleción del exón 21 mediante PCR de punto final con los primers empleados para la SA de dicho fragmento, ensayo que reveló la presencia del amplicón correspondiente que obligó a descartar variantes polimórficas o patogénicas en los sitios de hibridación de ambas sondas de MLPA por SA. MPM: marcador de pesos moleculares, escalera de 100 pb; CTL: control masculino sano; (-): control blanco de la reacción. C) SA del exón 21 en el caso índice reveló una variante puntual sin sentido no reportada (flecha) que claramente interfiere con la correcta hibridación y ligación del extremo 3' de la sonda 5' de MLPA (flecha), lo cual explica la ausencia del amplicón de la sonda ligada del exón 21 en A). D) La c.2707G>T o p.(Gly903\*) se identificó de manera dirigida en II-2 por SA del exón 21 (flecha) que confirmó el genotipo heterocigoto o de portadora obligada por genealogía.

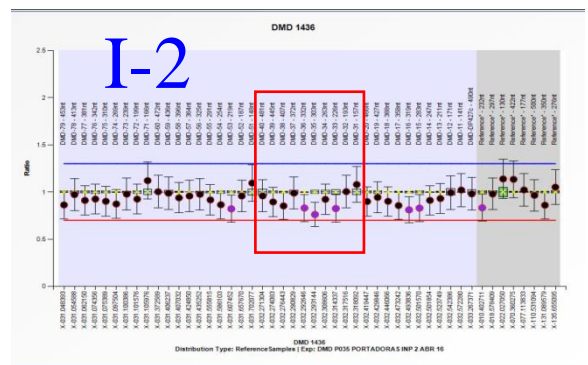
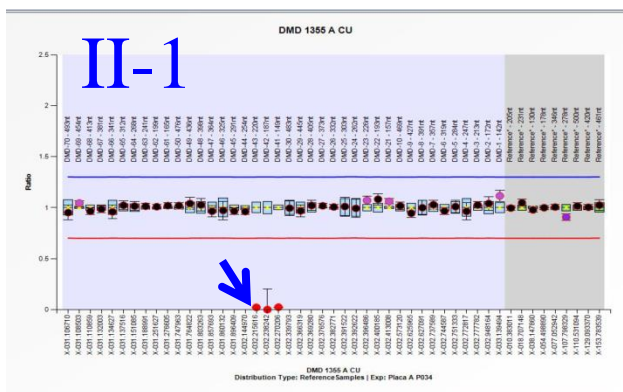
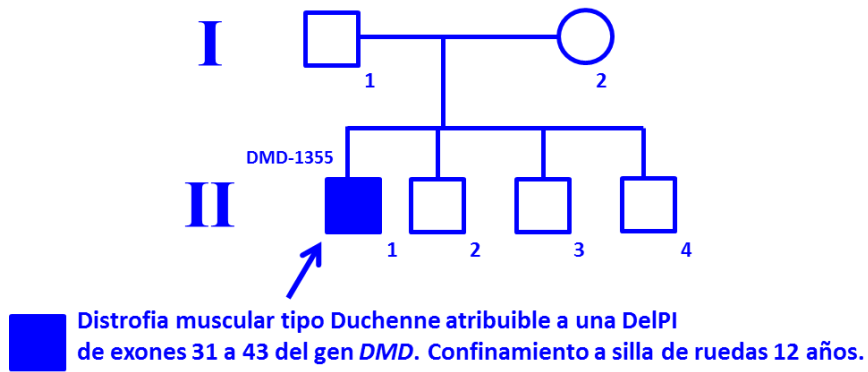


Por otro lado, inicialmente se identificaron 6 aparentes DupPI de un solo exón (una discontinua que aparentemente involucraba a los exones 2 y 52), sin embargo mediante evaluación de dosis génica por PCR en tiempo real (método doble delta-Ct) se confirmaron tres DupPI del exón 52 (casos DMD-1191, -1585, y -1751) y por un segundo ensayo de MLPA y SA, sólo se logró confirmar una DupPI del exón 2 (caso DMD-1432). Así, las duplicaciones de un solo exón comprendieron 4 de las 13 DupPI identificadas (30.8%, Tabla 1).

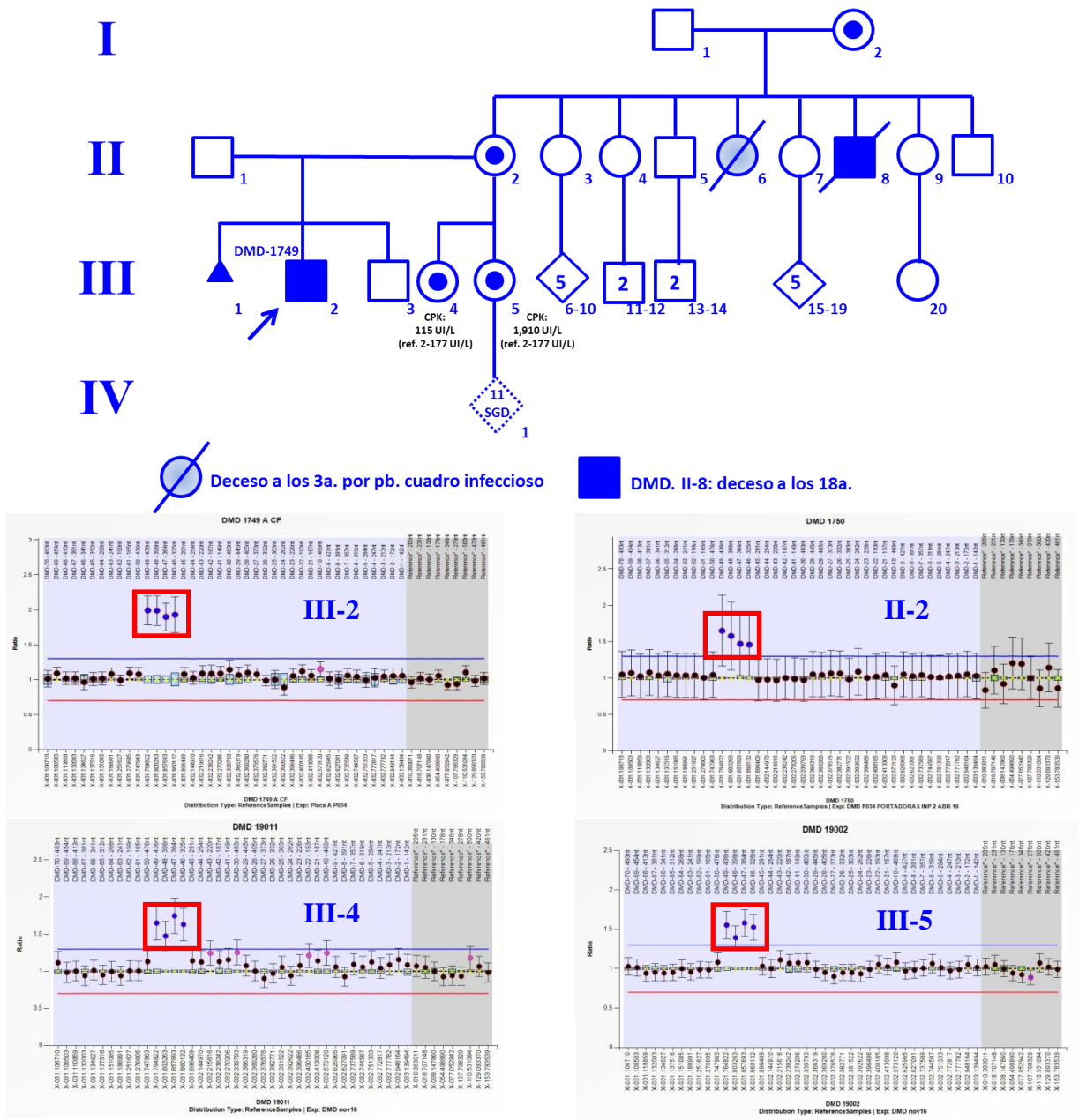
Aunque la MLPA corroboró la ausencia de DelPI caracterizables por mPCR en 65 pacientes, 3 de las 5 DelPI identificadas correspondieron a falsos negativos de la mPCR (4.4%): exón 45-paciente DMD-128, exones 7 a 9-paciente DMD-386 y exones 31 a 43-paciente DMD-1355 (figura 3); la captación de estos 3 pacientes fue en los años 1990, 1993 y 2004, respectivamente.

Con la finalidad de definir si las DelPI/DupPI se originaron *de novo* (madre no portadora) o fueron heredadas a través de madre portadora obligada, se realizó una caracterización dirigida por MLPA en ADN genómico de sangre periférica proveniente de 13 de las 18 (72.2%) madres de pacientes con DelPI/DupPI (Tabla 1, figuras 5 y 6). Mediante este análisis se logró determinar que este tipo de rearrreglos se originaron *de novo* en el 46.2% (n=6/13) de los casos y de madre portadora en el 53.8% (n=7/13; en 6 de ellas se confirmó el estatus de portadora obligada por genealogía); en tanto, no se dispuso de muestra materna en el resto de los casos (27.8%, n=5/18), por lo que se encuentra pendiente el recontactar a estas familias. El paciente DMD-1803 hemicingoto para la variante patogénica c.2707G>T o p.(Gly903\*) identificada indirectamente por MLPA y corroborada por SA, corresponde a un caso familiar y la SA del exón 21 confirmó el estatus de portadora obligada en la madre (figura 4).

La SA de los 79 exones del gen *DMD* en los primeros 10 pacientes con estudio de MLPA normal y seleccionados para esta etapa (al menos todos ellos con clínica sugestiva y CPK sérica elevada), logró caracterizar el genotipo responsable en 9 de ellos (90%). Se identificaron 4 variantes puntuales y 5 micro-indels (Tabla 2). Así mismo, la SA adicional del promotor muscular en un caso familiar (DMD-1825) por hermano varón aparentemente afectado ante la ausencia de mutación identificable en 79 exones, resultó normal. De forma interesante, en este paciente masculino de 9 años se informó posterior a obtener el estudio molecular de MLPA y SA, un resultado de biopsia muscular con inmunohistoquímica positivo para distrofina (epítomos N- y C-terminal) en fibras musculares mejor conservadas y sin necrosis, sugestivos de DMB vs. miopatía congénita, aunque también se refiere muestra limitada para diagnóstico. Este mismo paciente cuenta con un hermano menor con elevación significativa de CPK (17,451 UI/L, ref. <150 UI/L), estudio de mPCR normal, pero con discreta debilidad muscular, que contrasta con el cuadro franco de DMD documentado en su hermano mayor desde los 3-4 años de edad y que obligó a evaluación de CPK en ese momento (10,336 UI/L, ref. <150 UI/L) (Tabla 2).



**Figura5.** Identificación de un falso negativo de la mPCR por MLPA de los 3 identificados en el presente estudio y con subsecuente exclusión del estado de portadora en madre (I-2) de un caso único con DMD (II-1). En II-1, la flecha señala el valor de “0 copias” para el exón 43 en la MLPA. Aunque la mPCR no analiza ninguno de los exones 31 al 42, el exón 43 sí se encuentra incluido en la mPCR, la cual la reportamos en II-1 (año de 2004) como normal o sin DelPI en 22 exones. Posterior al hallazgo de la MLPA, un segundo ensayo de mPCR en II-1 sí logró documentar la DelPI del exón 43. En I-2 la dosis génica para los exones 31 a 40 involucrados en la DelPI de exones 31 a 43, resultó normal (recuadro), lo cual excluye al menos en sangre periférica el genotipo heterocigoto o portador de la DelPI de exones 31 a 43, que a su vez correlaciona con la ausencia de antecedentes familiares para la enfermedad, la presencia de 3 hermanos varones sanos y al hecho de que aproximadamente 2/3 partes de las DelPI en familias con casos únicos se originan *de novo* (Alcántara, 1999; Taylor, 2007); sin embargo, el resultado no excluye la eventual presencia de mosaicismo germinal, condición reportada en el ~4% de familias mexicanas con DFP atribuibles a DelPI [Bermúdez-López, 2014].



**Figura 6.** Identificación de DupPI mediante MLPA en un caso familiar de DMD. El caso índice (III-2) presenta una DupPI que involucra a los exones 46 a 49 (recuadros, 2 copias) que se predice como “fuera de marco” con consecuente imposibilidad para codificar una distrofina con función residual que correlaciona con el fenotipo Duchenne en III-2 y II-8 (confinamiento a silla de ruedas a los 10 y 12 años, respectivamente). La MLPA confirmó el estatus de portadora obligada por genealogía en II-2 (3 copias) y a la vez asignó el mismo estatus en dos medias hermanas (III-4 y III-5) del caso índice, una de ellas incluso con el antecedente de niveles de CPK sérica en intervalo normal. Al momento de la elaboración del presente manuscrito, III-5 cursaba con un embarazo del primer trimestre, por lo que fue canalizada al Instituto Nacional de Perinatología para evaluación de diagnóstico prenatal molecular en biopsia de vellosidades coriales o amniocentesis.

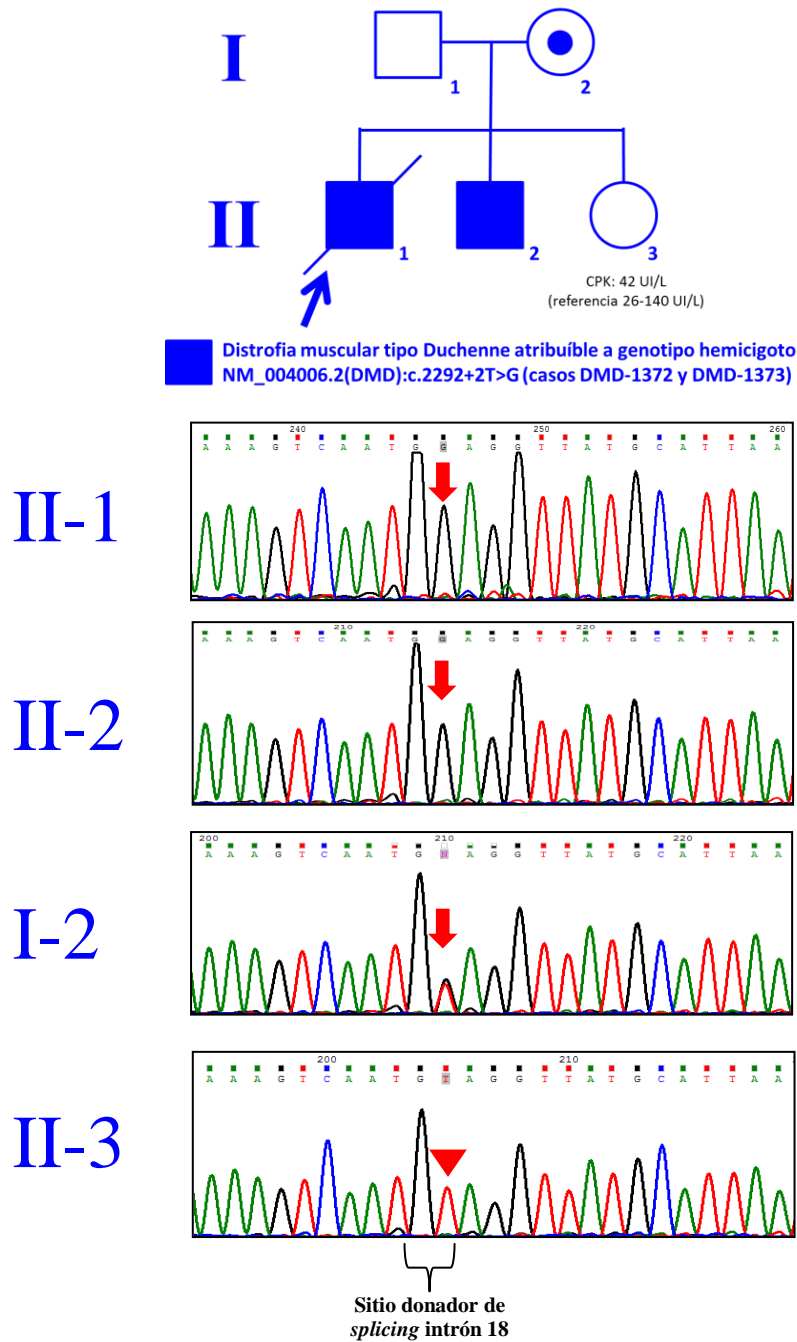
**Tabla 2. Genotipos DMD identificados, características clínicas, de laboratorio/gabinete en los primeros 10 pacientes seleccionados para la etapa de SA y estado de portadora en madres disponibles.**

Caso	Fenotipo y genotipo DMD (NM_004006.2)	AHF	CC	CPK	EMG-PM	BM	IH	Estatus de portadora en madre
DMD - 1187	DMD c.4758G>A p.(Trp1586*). Exón 34	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente	PO
DMD - 1373	DMD c.2292+2T>G. Intrón 18	Familiar	✓	✓	✓	NR	NR	PO (confirma estatus por genealogía, figura 7)
DMD - 1777	DMD c.9204_9207del p.(Asn3068Lysfs*20). Exón 62	Único	✓	✓	✓	NR	NR	PO
DMD - 1789	DMD c.2281_2285del p.(Glu761Serfs*10). Exón 18	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente	NOPORT
DMD - 1793	DMD c.7661-1G>A. Intrón 52	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina focal y disminuida	Madre no disponible
DMD - 1801	9a y deambula c.294del p.(Asp98Glu fs*3). Exón 5	Único	✓	✓	✓	NR	NR	Madre no disponible
DMD - 1837	11a y deambula c.6128_6131del p.(Asp2043Val fs*29). Exón 43	Familiar	✓	✓	NR	NR	NR	PO (confirma estatus por genealogía)
DMD - 1847	9a y deambula c.6446dup p.(Asp2150Gly fs*73). Exón 45	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente	PO
DMD - 1852	DMD c.494A>T p.(Asp165Val). Exón 6	Único	✓	✓	NR	✓	Distrofina ausente	NOPORT
DMD - 1825	11a y deambula Sin genotipo caracterizado (SA normal de 79 exones y pm1)	Familiar *	✓	✓	✓	✓	Distrofina presente**	Pendiente confirmación diagnóstica

Abreviaturas: AHF: Clasificación del paciente en caso único o familiar dependiendo del antecedente de distrofinopatías (DFP) por rama materna; BM: biopsia muscular; CC: cuadro clínico sugestivo de DFP; CPK: elevación de creatinín-fosfoquinasa sérica característica en DFP (50-100x); DMD: fenotipo Duchenne; EMG-PM: electromiografía con patrón miopático; IH: inmunohistoquímica para distrofina en biopsia muscular; NOPORT: madre no portadora; NR: no reportado; pm1: promotor muscular y parte 5' no traducible del exón 1 de la isoforma Dp427m (posiciones c.-677 a c.-149); PO: madre portadora obligada o heterocigota para la variante patogénica identificada en hijo afectado.

\* Paciente considerado como caso familiar por tener un hermano menor con cuadro de debilidad muscular discreta y elevación significativa de CPK sérica (17,415 UI/L, referencia <150 UI/L). Sin otros familiares masculinos afectados por rama materna.

\*\* Al momento de ingreso al estudio (4-noviembre-2014), el paciente no contaba con reporte de IH biopsia muscular (informe adicional fechado del 15-septiembre-2016).



**Figura 7.** Identificación del genotipo responsable en un caso familiar de DMD por SA de los 79 exones del gen *DMD* en el caso índice (II-1, DMD-1372), que conjunta la identificación y/o confirmación del estado de portadora en familiares femeninos en riesgo. Los electroferogramas parciales del amplicón del exón 18 y sus bordes exón-intrón (cadenas “forward”) revelan a la variante tipo transversión NM\_004006.2(DMD):c.2292+2T>G (flecha) no descrita en *The DMD mutations database UMD-DMD France* ([http://www.umd.be/DMD/W\\_DMD/index.html](http://www.umd.be/DMD/W_DMD/index.html)) y *Leiden Open Source Variation Database* (<http://www.lovd.nl/3.0/home>), sin embargo ésta se considera patogénica al eliminar al sitio donador de *splicing* del intrón 18 que predice un efecto deletéreo severo en la síntesis de distrofina que correlaciona con el fenotipo Duchenne de ambos pacientes. Se confirmó el estado de portadora obligada por genealogía en la madre (I-2, flecha indica posición mixta o genotipo heterocigoto T/G) y lo excluyó en la hermana (II-3, punta de flecha indica genotipo homocigoto normal T), que en este caso correlacionó con los niveles normales de CPK sérica.

La asignación o exclusión del estado de portadora se llevó a cabo en 8 madres disponibles de los 10 pacientes con mutación identificada por SA (incluye caso DMD-1803 identificado indirectamente por MLPA). En ellas, se excluyó (n=2/8, 25%) o se asignó (n=6/8, 75%) el genotipo heterocigoto o de portadora para la variante identificada (figura 7, Tabla 2).

## DISCUSIÓN

De acuerdo a lineamientos internacionales de diagnóstico, el posicionamiento como estudio de primera línea en DFP de la MLPA se basa en su capacidad para identificar en un solo ensayo DelPI, DupPI y rearrreglos complejos que involucran de uno a varios exones del gen *DMD* tanto en varones afectados, como en mujeres heterocigotas. Esta ventaja se reflejó en nuestro estudio al permitir caracterizar un 27.9% (n=19/68) adicional de genotipos responsables de DFP en pacientes con estudio de mPCR normal, cifra similar a la descrita en una muestra de pacientes europeos con DFP y estudio previo normal de mPCR de 18 exones (32.7%, n=17/52) [Lalic, 2005]; sin embargo fue mayor a la reportada en al menos dos estudios con los mismos criterios de inclusión, pero con un mayor número de pacientes analizados de ascendencia hindú (10.5%, n=19/180) [Kohli, 2010] y europea donde la mPCR empleada incluyó 30 exones (15.7%, n=14/89) [Janssen, 2005]. Si bien estas diferencias podrían reflejar un espectro mutacional distinto entre poblaciones, debe descartarse que ello se atribuya a los criterios clínicos empleados para la inclusión de los pacientes, pues suele ocurrir que este tipo de reportes provengan de laboratorios dedicados al diagnóstico molecular como es nuestro caso, y por lo general, incluyendo los tres trabajos previos [Janssen, 2005; Kohli, 2010; Lalic, 2005], no suelen describirse las características clínicas y de laboratorio/gabinete de los pacientes analizados limitándose a mencionar que fueron pacientes referidos para estudio molecular de rutina por la sospecha diagnóstica de DFP.

La MLPA simplifica la identificación de las DupPI que representan un 8-11% del espectro mutacional de las DFP [White, 2006] y las cuales anteriormente sólo eran caracterizables por estrategias más laboriosas como el Southern blot u otras basadas en PCR (PCR cuantitativo con lectura en electroforesis capilar, PCR en tiempo real, etc.) y que no siempre permitían definir con precisión la extensión del rearrreglo, el cual es un dato esencial para inferir su efecto en el marco de lectura resultante o para definir la presencia de rearrreglos complejos discontinuos descritos en el 1-2% de los pacientes [Janssen, 2005; Lalic, 2005; White, 2006] (figura 3). Acorde a lo descrito en la literatura y pese al número limitado de pacientes analizados, en nuestro estudio las DupPI aparentemente contiguas conformaron en proporciones similares el rearrreglo predominantemente identificado en pacientes con mPCR normal con un 17.6% (n=12/68) vs. 17.3% (n=9/52) [Lalic, 2005]; 11.2% (n=10/89) [Janssen, 2005] y 17.7% (n=16/90) [Kohli, 2010]; incluso estas similitudes se observaron también para la frecuencia documentada de 1.5% (n=1/68) de rearrreglos complejos (DMD-1872, figura 3, Tabla 1) que conformaron el 1.1% (n=1/89, DupPI 45-48 y de 54-55) [Janssen, 2005] y 1.9% (n=1/52, DupPI 52-55, 63-67 y una triplicación de exones 68-79) [Lalic, 2005] de los genotipos de DFP en los estudios europeos.

Aunque nosotros y en los estudios previos se reporta una aparente mayor frecuencia de DupPI respecto a la descrita en literatura (~17% vs. 8-11%, respectivamente) [Kohli, 2010; Lalic, 2005], hay que considerar que estas proporciones representan la frecuencia en la población con estudio normal de mPCR y no del total de pacientes con DFP. Con este ajuste en estudios que consideraron un total inicial de pacientes a analizar primero por mPCR y subsecuentemente por MLPA, las cifras de DupPI semejan más las cifras de DupPI tradicionalmente aceptadas (8.8%, n=16/180) [Kohli, 2010]; 6.5%, n=8/123) [Lalic, 2005]. En nuestro caso este ajuste no es posible, pues la selección de los 70 pacientes partió de >150 pacientes no relacionados con mPCR normal y tomando en cuenta otros criterios (muestra de ADN disponible, diagnóstico sugestivo de DFP emitido por genetista o neurólogo pediatra, CPK característicamente elevada, etc.).

La proporción de 7.4% de DelPI (n=5/68), acorde a lo descrito en literatura (3.3%, n=3/89) [Janssen, 2005]; n=3/90) [Kohli, 2010]; 13.4%, n=7/52) [Lalic, 2005], conformó el segundo tipo de rearrreglo más frecuente responsable de DFP identificado por MLPA en pacientes con mPCR normal. En los estudios previos, estas DelPI infrecuentes no fueron detectadas inicialmente por la mPCR debido a que involucraron ya sea uno o varios exones ubicados predominantemente fuera de los *hot-spots* (región intermedia exones 20 a 40 o distales al exón 60 ubicado en la región 3') y no representados en el ensayo de mPCR. Si bien esta situación explica la indetectabilidad de 2 DelPI por nuestro ensayo de mPCR (DelPI exón 18 y 22 a 29; 2.9%, n=2/68), las DelPI de exones 45 (detectable y confirmada por PCR de punto final), 7 a 9 (exón 8 detectable) y 31 a 43 (exón 43 detectable) no identificadas en la mPCR representan un 4.4% (n=3/68) de falsos negativos de nuestro ensayo de mPCR (Tabla 1). En uno de los estudios con mayor proporción de DelPI infrecuentes no detectables por mPCR (13.5%, n=7/52) [Lalic, 2005], a diferencia de nuestro estudio, ninguna de ellas correspondió a un falso negativo de la mPCR. Sin embargo esta limitación se ha descrito previamente en una pequeña serie de pacientes hindús con mPCR normal de 32 exones (n=1/20, 5% de falsos negativos) [Dastur, 2011], la cual llega hasta un 8% cuando se emplea hibridación in situ fluorescente (FISH) como método diagnóstico para DelPI en DFP [Janssen, 2005]. Dado que nuestros tres pacientes con las DelPI inicialmente no identificadas por la mPCR se captaron en los años 1990, 1993 y 2004, consideramos plausible el asumir que estas omisiones se pudieron originar por una insuficiente estandarización de la metodología, pues ninguna de las muestras captadas en años posteriores al 2004 e incluidas en el presente estudio tuvo una discordancia con la MLPA. Ello, aparte de la experiencia adquirida, también podría verse influenciado por la mejora técnica en los termocicladores y la disponibilidad de diversos aditivos para uso en mPCR como la betaína o mejoras en las DNA polimerasas recombinantes (por ejem. con propiedades "*hot-start*"). Pese a lo anterior y de acuerdo a lo propuesto por otros autores [Dastur, 2011; Nouri, 2014], consideramos que la alta concordancia de DelPI ausentes por mPCR y corroborada por MLPA (95.6%) particularmente en pacientes de reciente captación, justifica que la primera técnica más rápida (resultados en 4-6 horas), económicamente más accesible (no requiere uso de secuenciador automatizado, ni la compra de kits comerciales) y técnicamente menos demandante, podría seguir aplicándose

como estudio de primera línea diagnóstica antes de la MLPA o la SA en pacientes con sospecha de DFP, ya que identificaría al menos el 50% de las DelPI responsables de dichas entidades, aunque hay que tomar en cuenta que en varios de ellos quedaría pendiente el definir la extensión precisa del rearrreglo para inferir el marco de lectura. Así mismo, ante estos hallazgos, estaría pendiente la evaluación por MLPA de posibles falsos positivos para DelPI identificadas por mPCR [Ferlini, 2013; Flanigan, 2014; Wein, 2015].

La MLPA además de las DelPI infrecuentes, DupPI o rearrreglos complejos, indirectamente en DFP puede identificar variantes puntuales o micro-indels que interfieran con los sitios de hibridación/ligación de las sondas. De hecho en México, un estudio reportó en 2015 el empleo de sondas (Point mutation specific MLPA probes) específicamente diseñadas para la identificación de las 23 variantes puntuales más comunes sin sentido condicionantes de DFP y candidatas a supresión de codón de paro prematuro; este abordaje identificó el genotipo responsable en 6 de 162 pacientes con DFP (3.7%) [López-Hernández, 2015]. Sin embargo, el diseño de las sondas del kit comercial para evaluación de dosis génica (SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> probemix P034-B1 DMD y P035-B1 DMD, MRC-Holland<sup>®</sup>) contempla la hibridación idealmente en regiones génicas invariables en la población o carentes de variantes polimórficas o patogénicas, aunque es esperado que la distribución aleatoria de variantes puntuales o micro-indels presentes en el 20-30% de los pacientes con DFP, puedan ocurrir en estos sitios de hibridación e interferir con la ligación y subsecuente amplificación de la sonda, que de no corroborarse por una segunda metodología (por ejem. PCR de punto final del exón involucrado y subsecuente SA) pueden interpretarse erróneamente como una DelPI de un solo exón. Este fenómeno lo observamos en el paciente DMD-1803 (1.5%, n=1/68, Tabla1, figura 4) y en proporción similar a los estudios previos (1.1%, n=1/89, [Janssen, 2005]; 1.9%, n=1/52, [Lalic, 2005]; 2.2%, n=2/90, [Kohli, 2010]). La estrategia de confirmación del resultado inicial de MLPA en el paciente logró de forma inequívoca y precisa la asignación del genotipo responsable en esta familia, lo cual tiene importancia cardinal para asesoramiento genético, diagnóstico prenatal y en un futuro, para ofrecer a los varones afectados terapias basadas en la supresión de codones de paro prematuro y no de salto dirigido de exones indicados para DelPI.

El número limitado de pacientes con genotipo caracterizado por MLPA, particularmente en lo referente a DelPI (n=5/19), dificulta el inferir si su distribución difiere o no a lo reportado, aunque de acuerdo a lo previamente descrito en literatura, las DupPI aparentemente contiguas predominaron en la región central o *hot-spot* principal (58.3%, n=7/12), seguidas de la región 5' o *hot-spot* menor (33.3%, n=4/12) y sólo se documentó una DupPI de los exones 60-67 en la región 3' (Tabla 1). Así mismo, por la temprana edad de algunos pacientes con DelPI y DupPI que impide su clasificación en DMD o DMB o por la ausencia de expediente clínico disponible, no se puede establecer una cifra real de relación fenotipo-genotipo, a pesar de que conocemos la extensión precisa a nivel de exón de todas las DelPI y DupPI aparentemente contiguas que permite inferir la integridad del marco de lectura y la predicción de capacidad de síntesis de una distrofina con función residual (Tabla 1). A excepción del rearrreglo complejo de DMD-1872 donde no se conoce su ordenamiento real en *-cis* y la extensión "río abajo" de la DupPI de la región 3'



(exones 63-79), un total de 15 de las 17 DelPI/DupPI se predicen como severas o “fuera de marco” con la consecuente imposibilidad para la síntesis de distrofina, lo que implicaría un fenotipo Duchenne en todos estos pacientes, sin embargo llaman la atención los casos únicos DMD-1191 y DMD-1751 que coincidentemente presentan la misma DupPI “fuera de marco” del exón 52 aunada a la capacidad de deambulación a los 14 años y sin corticoterapia (Tabla 1). La regla de la predicción del fenotipo por la integridad del marco de lectura se cumple en el ~90% de los casos con DMD y las excepciones a esta regla se han atribuido a variaciones en el corte de intrones y empalme de los exones (*splicing*) del transcrito mutante influenciados por las secuencias intrónicas remanentes que flanquean las DelPI y DupPI, o por el ordenamiento preciso en *-cis* o *-trans* que no puede ser inferido por la MLPA u otras técnicas convencionales de diagnóstico molecular [Ferlini, 2013; Flanigan, 2003; Flanigan, 2014; Wein, 2015]. Sin embargo, el fenotipo DMB e intermedio (con familiares con DMB) en los pacientes DMD-752 y DMD-1460, sí correlaciona con las únicas 2 DupPI identificadas “en marco de lectura” y con posibilidad de síntesis de distrofina.

En el curso del desarrollo de la fase de MLPA se identificó un segundo resultado incongruente atribuible al factor humano y/o técnico. La identificación de dos muestras (DMD-301 y DMD-359) etiquetadas erróneamente como provenientes de pacientes del sexo masculino, el cual se detectó gracias a que la metodología de MLPA incluye dos sondas para determinar complemento sexocromosómico y que revelaron la ausencia del segmento correspondiente al cromosoma Y. Estas muestras se captaron en los años 1991 y 1993 cuando en el LBM-INP se comenzaban a estandarizar los primeros ensayos moleculares, por lo que probablemente el error podría atribuirse a una falta de experiencia suficiente para el manejo e identificación correcta de la muestra. Si bien ambos pacientes se excluyeron del estudio, a la fecha no se ha podido recontactar a la familia para nueva toma de muestra.

Respecto a la fase de SA del estudio, los criterios empleados para la selección de los primeros 10 de los 49 pacientes con MLPA normal aseguraron un alto porcentaje de identificación del genotipo responsable (90%, Tabla 2). Aunque aún está pendiente la SA de los restantes 39 pacientes, esta elección se realizó en primer término para optimizar los recursos económicos, pues la SA es aún demandante en cuanto a costos en nuestro medio, a la vez que se intentó que el resultado tuviera un impacto inmediato en la atención del paciente y su familia, lo cual se representa en parte por el hecho de que en 7 madres disponibles de los 9 pacientes caracterizados en la fase de SA, cuentan actualmente con la confirmación o exclusión diagnóstica del estatus de portadora.

Conjuntando la variante patogénica indirectamente identificada por MLPA (Tabla 1, figura 4) con las 9 variantes caracterizadas en la fase de SA (Tabla 2), se aprecia un franco predominio de alteraciones que predicen un efecto deletéreo severo o amorfo en la función del gen *DMD* (90%, n=9/10) por variantes que generan codones de paro prematuro o sin sentido (n=2/10), micro-indels con corrimiento del marco de lectura (n=5/10) y puntuales que eliminan sitios intrónicos canónicos aceptor o donador de *splicing* (n=2/10). A diferencia de los pacientes con DelPI/DupPI de la fase de MLPA, la totalidad de

los 10 casos con genotipo caracterizado por SA (incluye caso DMD-1803 identificado indirectamente por MLPA, Tabla 1) cuentan con suficiente información clínica para correlacionar la alteración genética con el fenotipo observado (Tabla 2). Así, 6 de los 7 pacientes referidos con fenotipo Duchenne de forma concordante portan variantes amorfas, mientras que el paciente DMD-1852 contradictoriamente presenta la única variante de sentido erróneo p.(Asp165Val) descrita previamente en un paciente con fenotipo Becker [Flanigan, 2003], aunque el cambio afecta al extremo N-terminal de la distrofina, específicamente al dominio crítico CH (“Calponin homology domain”; aminoácido 127-232) indispensable para la unión con la actina-F con el citoesqueleto subsarcolémico, por lo que nuestro paciente, segundo identificado con este genotipo, apoyaría que la variante p.(Asp165Val) condicionaría expresividad variable en DFP, sustentada incluso por haber documentado en él la ausencia de distrofina por inmunohistoquímica en biopsia muscular, sin embargo se requieren descripciones de más casos para confirmar con certeza el carácter patogénico de la variante y para delinear el fenotipo condicionante. En los tres casos restantes, no se cuenta con fenotipo asignado debido a la capacidad de deambulación conservada por su temprana edad al momento de su evaluación (<12-13 años), aunque portan genotipos severos que predicen un curso clínico rápidamente progresivo e incluso uno de ellos (DMD-1847) muestra ausencia de distrofina en la biopsia muscular, que determina un fenotipo Duchenne. En el paciente DMD-1793, el cambio severo identificado elimina al sitio aceptor canónico de *splicing* del intrón 52 (c.7661-1G>A) que correlaciona con el fenotipo franco de Duchenne (pérdida de deambulación a los 12 años), presencia de discapacidad intelectual y rasgos del espectro autista, características descritas hasta en el 19% y 3% de los casos con DMD, respectivamente [Daoud, 2009; Hendriksen, 2008]. La biopsia muscular de este paciente sólo reveló positividad de forma focal y atenuada con el anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal de la distrofina en pocas fibras, pero acorde al genotipo, no se identificó positividad con anticuerpos contra el extremo C-terminal.

Se estima que el estudio combinado de MLPA y SA completa del gen *DMD* no logra identificar el genotipo responsable hasta en el ~1% de los pacientes con DFP por la presencia de mutaciones en las regiones no traducibles, intrónicas “profundas” condicionantes de pseudoexones, inversiones génicas u otros defectos no detectables por ambas metodologías [Ferlini, 2013]. Esta situación la asumimos en un principio en el caso familiar DMD-1825 con resultado normal en MLPA/SA, que adicionalmente incluyó la secuenciación del promotor muscular de la isoforma Dp427m (Tabla 2). Posterior a la obtención del resultado molecular completo, además de los cambios distróficos en la biopsia muscular, llama la atención la positividad disminuida para distrofina con anticuerpos dirigidos para los extremos N- y C-terminal. Así, este hallazgo ante la ausencia de anomalías génicas por los dos métodos moleculares, podría contraponerse al diagnóstico de una DFP. De hecho, el paciente se considera caso familiar por el antecedente del hermano menor con elevación significativa de CPK sérica aunado a un cuadro de debilidad muscular referido como discreto y menos severo al observado en DMD-1825, además no existen otros familiares masculinos afectados por rama materna, por lo que aún cabe la posibilidad diagnóstica de una entidad neuromuscular autosómico recesiva,

como la distrofia muscular tipo LGMD2I condicionada por mutaciones en el gen *FKRP*, la cual muestra variabilidad intrafamiliar y se ha identificado hasta en el 12% de pacientes con cuadro clínico de DFP, pero estudio molecular del gen *DMD* negativo [Schwartz, 2005]. Lo anterior lleva a especular que si no se considerara al paciente DMD-1825, el estudio de SA en los 9 pacientes con clínica altamente sugestiva y MLPA normal, seleccionados bajo los criterios antes mencionados, tendría una eficiencia diagnóstica del 100%.

Otro objetivo del estudio consistió en determinar el origen de las variantes patogénicas a través de la genotipificación dirigida en madres disponibles de los pacientes con alteraciones génicas confirmadas. Para el caso de las DelPI existe evidencia para aseverar que ~2/3 partes de ellas en casos sin antecedentes familiares se originan como eventos *de novo* (madre no portadora) [Alcántara, 1999; Taylor, 2007], aunque por modelos teóricos esta cifra es significativamente menor (17.3%) [Grimm, 2012], pero siempre deberá considerarse la posibilidad reportada de 4-6.7% para mosaicismo germinal no detectable por el estudio molecular convencional en sangre periférica [Bermúdez-López, 2014; Grimm, 2012]. El análisis de MLPA en pacientes con DelPI y sus madres (Tabla 1) confirmó el estatus de portadora obligada en un caso familiar y lo descartó en dos casos únicos, por lo que no se identificaron incongruencias entre la historia familiar y el resultado molecular, pero no es posible dar una estimación de las mutaciones heredadas vs. las originadas *de novo*. En contraste, dado que la mayoría de las DupPI y las variantes puntuales/micro-indels se originan *de novo* en espermatogénesis (padre que engendra una hija portadora y ésta a su vez, varones afectados en la siguiente generación), cuando en un caso único se identifica uno u otro tipo de mutaciones, el riesgo de ser portadora se incrementa a >85% [Grimm, 2012]. Lo anterior se encuentra acorde con el predominio observado de madres portadoras para las variantes puntuales/micro-indels (75%, n=6/8, Tabla 2) que incluye a 3 casos sin historia familiar de DFP. En el caso de las DupPI, no observamos incongruencias entre la historia familiar y el resultado molecular que confirmó el estatus de madre portadora en 5 casos familiares y en la madre de un caso único (DMD-425, Tabla 1). De igual forma, se asume un origen *de novo* para las DupPI identificadas en 4 casos únicos, ya que al menos en la muestra materna de ADN de sangre periférica no se identificó el rearreglo; en los 3 casos restantes, incluyendo el del rearreglo complejo, no se dispuso de la madre. Así, aunque la proporción de DupPI aparentemente contiguas heredadas a través de madre portadora predomina sobre las originadas *de novo* (n=6/10, 60% vs. 40%, respectivamente) y ello se encuentra acorde a lo descrito en literatura [Grimm, 2012], debido al limitado tamaño de la muestra esta cifra difícilmente podría considerarse representativa de nuestra población.

La asignación o exclusión del estatus de portadora tiene un impacto decisivo en el asesoramiento genético de las familias con DFP. La familia representada en la figura 6 ilustra la utilidad directa de identificar el genotipo responsable en las mujeres en riesgo, incluso con valores de CPK sérica normal, parámetro tradicionalmente empleado para inferir el estado de portadora, pero que cuenta con baja sensibilidad y especificidad, pues sólo 30-50% de las mujeres heterocigotas presentan valores incrementados de la enzima y ello varía de acuerdo con la edad. En esta familia, una vez que en el caso índice se caracterizó la DupPI de los exones 46 al 49, inmediatamente dos medias

hermanas, previo asesoramiento genético, solicitaron el estudio molecular confirmatorio, particularmente porque una de ellas cursaba con un embarazo del primer trimestre y externó su intención de someterse a diagnóstico prenatal molecular, por lo que una vez confirmado su genotipo heterocigoto fue referida al Instituto Nacional de Perinatología. Probablemente esta familia constituya la primera en la que se realice la caracterización prenatal de una DupPI por parte de nuestro servicio y probablemente a nivel nacional.

Por último, el determinar el estado heterocigoto en mujeres obliga a ofrecerles seguimiento cardiológico a partir de los 16 años de edad, ya que ellas entre los 18 y 58 años, presentan riesgo de desarrollar hipertrofia ventricular, trastornos de la conducción cardíaca y cardiomiopatía dilatada en un 18% y 8% para las portadoras de DMD y DMB, respectivamente, sin embargo estos porcentajes varían entre los diferentes estudios [Mavrogeni, 2015]. Esta información se otorga dentro del asesoramiento genético de las familias.

## **CONCLUSIONES**

La culminación de la fase de MLPA y los resultados preliminares de SA ha logrado caracterizar un 41.7% (n=28/68) adicional de genotipos responsables de DFP. La conclusión de la fase de SA podría incrementar esta proporción y la información resultante conformaría el primer estudio donde se reporta el espectro mutacional completo de DFP en una muestra de pacientes de origen mexicano.

ANEXO 1. HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

**“Delineación del espectro mutacional del gen *DMD* responsable de distrofinopatías: Identificación de mutaciones infrecuentes por Amplificación Múltiple de Sondas ligadas (MLPA) y Secuenciación Automatizada.”**

Número de expediente: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Clave muestra ADN Laboratorio: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Género: M F

Nombre de la mamá \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Consanguinidad: \_\_\_\_\_ Endogamia: \_\_\_\_\_

ÁRBOL GENÉALÓGICO

Cuadro clínico

0= ausente 1=presente

Debilidad y atrofia muscular proximal	
a) Predominio escápulohumeral	
b) Predominio pelvifemoral	
c) Sin predominio	
Debilidad facial	
Pseudohipertrofia de músculos gastrocnemios	
Macroglosia	
Acortamiento del tendón de Aquiles	
Patrón respiratorio restrictivo	
Deambulación	
a) Edad de inicio de la deambulación independiente (años)	
b) Edad de pérdida de la capacidad de deambulación (años)	
Valoración cardiológica	
a) Edad	
b) Cardiomiopatía dilatada	

Biopsia Muscular \_\_\_\_\_

0= Ausente, 1= Presente

Necrosis y degeneración	
Fibras de tamaño variable	

Predominancia de fibras tipo I	
Infiltración de tejido fibroadiposo	
Patrón inmunohistoquímico de distrofina	
a) Normal	
b) Ausente	
c) No concluyente	
d) Mosaico	
e) Discontinuo	

Valor de CK al diagnóstico: \_\_\_\_\_(UI/L). Edad del paciente a la toma (años) \_\_\_\_\_

Electromiografía (0= Ausente, 1= presente) \_\_\_\_\_

a) Patrón miopático \_\_\_\_\_

b) Otros (describir) \_\_\_\_\_

Integridad de ADN adecuada Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Contactar para muestra de ADN Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

### Análisis Molecular

Gen	Mutación (es)	Polimorfismo (s)
<i>DMD</i>		

Observaciones:

---



---



---

## **ANEXO 2. Hoja de consentimiento informado (Tutor de caso índice)**

**Título: “Delineación del espectro mutacional del gen *DMD* responsable de distrofinopatías: Identificación de mutaciones infrecuentes por Amplificación Múltiple de Sondas ligadas (MLPA) y Secuenciación Automatizada.”**

### **¿Para qué se realiza este estudio?**

El presente estudio se realiza para tratar de conocer de manera precisa la causa por la cual su hijo presenta un trastorno de debilidad muscular (o trastorno neuromuscular que significa enfermedades que afectan al músculo o sistema nervioso y que tienen diversas causas de origen genético) con la finalidad de brindar un pronóstico con relación a evolución y de información a la familia con relación a cómo se transmitió la enfermedad.

### **¿Quiénes pueden participar en este estudio?**

En ese estudio pueden participar todos los pacientes de Instituto Nacional de Pediatría que cursen con alguna alteración neuromuscular de causa no establecida y que así lo deseen.

### **¿Quiénes no podrán participar en este estudio?**

Aquellos pacientes que no deseen participar.

### **¿En qué consiste el estudio y que se le pedirá a su hijo(a) que haga?**

Se le extraerá a su hijo una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica tomada por personal calificado y con todas las normas de seguridad e higiene que se requieren como el uso de material estéril y desechable así como uso de guantes. De esta muestra se obtendrá el material genético (ADN) de su hijo (a) y de esta se analizarán las regiones o gen de interés que pudieran estar implicadas en el origen o etiología del trastorno neuromuscular que padece. En caso de que ya contemos de una muestra del ADN genómico de su hijo bajo nuestro resguardo y con calidad adecuada, la cual usted autorizó que se utilizará anteriormente para el diagnóstico genético de distrofias musculares tipos Duchenne/Becker, ésta podría ser utilizada para el presente estudio, sin la necesidad de requerir una segunda toma de sangre periférica por punción venosa a su hijo, siempre y cuando usted lo autorice mediante la firme del presente consentimiento.

### **¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados de esta investigación implicará algún gasto económico para su paciente o familiares.

### **¿Qué beneficio puede esperar mi hijo(a)?**

Los beneficios del presente estudio serán en algunos casos, conocer la causa genética de las manifestaciones de la debilidad muscular que presenta su hijo y que previamente permanecían sin diagnóstico preciso, al contar con una causa



definida se podrá establecer mejor el pronóstico de la enfermedad así como el riesgo de que otro familiar la herede.

### **¿Mi hijo(a) puede negarse a participar en este estudio y se le puede pedir a mi hijo (a) que abandone el estudio?**

La participación de su hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, pueden abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

### **¿Quién va a tener la información de los datos de mi hijo(a)?**

Los datos personales de su hijo (a) en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa de su hijo (a) recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto, tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de ADN)?**

Quedará codificada bajo una clave que no incluya el nombre y datos clínicos de su hijo (a) en el contenedor de dicha muestra. La muestra será conservada hasta su análisis genético en refrigeración y bajo llave; así mismo, ésta quedará por un periodo indefinido bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud y esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al conocimiento de los trastornos neuromusculares de etiología no establecida si usted así lo autoriza, para lo cual los investigadores del INP lo recontactarían, preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Los resultados que se obtengan de este estudio se le informarán en la consulta externa de Genética a través de uno de los investigadores responsables.

Si se tiene alguna duda puede comunicarse con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.



### **ANEXO 3. HOJA DE ASENTIMIENTO INFORMADO (CASO ÍNDICE)**

**Título: “Delineación del espectro mutacional del gen *DMD* responsable de distrofinopatías: Identificación de mutaciones infrecuentes por Amplificación Múltiple de Sondas ligadas (MLPA) y Secuenciación Automatizada.”**

#### **¿Para qué se realiza este estudio?**

El presente estudio se realiza para tratar de conocer la causa genética por la cual presentas debilidad muscular (o trastorno neuromuscular que significa enfermedades que afectan al músculo y/o sistema nervioso cuya causa es de origen hereditario) con la finalidad de brindarte un pronóstico con relación al curso de la enfermedad que presentas y para dar información a tu familia con relación a cómo se transmitió la enfermedad que tú padeces.

#### **¿Quiénes pueden participar en este estudio?**

Pueden participar todos los pacientes que así lo deseen del Instituto Nacional de Pediatría que cursen con debilidad muscular en la cual los doctores que te atienden, no puedan definir la causa que la origina.

#### **¿Quiénes no podrán participar en este estudio?**

Aquellos pacientes que no deseen participar.

#### **¿En qué consiste este estudio y que se te pedirá que hagas?**

Se te tomará una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica por personal calificado y con todas las normas de seguridad e higiene que se requieren como el uso de material estéril y desechable así como uso de guantes. De esta muestra se obtendrá tú material genético (ADN) y de este se analizarán las regiones o gen de interés que pudieran tener mutaciones o defectos genéticos que expliquen la causa de la debilidad muscular que padeces. En caso de que dispongamos de una muestra de ADN genómico tuyo bajo nuestro resguardo y con calidad adecuada, la cual fue utilizada anteriormente para el diagnóstico genético de distrofias musculares tipos Duchenne/Becker, ésta podría ser utilizada para el presente estudio, sin la necesidad de requerir una segunda toma de sangre, siempre y cuando tú nos autorices utilizarla mediante la firma del presente consentimiento.

#### **¿Quién pagará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados de esta investigación implicará algún gasto económico para ti o tus familiares.

#### **¿Qué beneficios puedo esperar?**

Los beneficios en algunos casos serán el conocer la causa genética de la debilidad muscular que presentas y que previamente permanecían sin diagnóstico preciso, al contar con una causa definida se podrá establecer mejor

el pronóstico y planear mejor el tratamiento de tu enfermedad, así como el riesgo de que otro de tus familiares la hereden.

### **¿Puedo negarme a participar en este estudio y puedo abandonar el estudio?**

Tu participación es total y absolutamente voluntaria, puedes abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en tu atención médica en cualquier servicio de la Institución.

### **¿Quiénes van a tener la información de mis datos?**

Tus datos personales en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con otras personas como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con tu autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto, tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

### **¿Qué se va a hacer con la muestra de sangre que ya no ocupen?**

Quedará codificada bajo una clave que no incluya tu nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra. La muestra será conservada hasta su análisis genético en refrigeración y bajo llave; así mismo, SI TÚ LO AUTORIZAS (ver al final de este formato), ésta quedará por un periodo indefinido bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud y esta muestra sólo podrá ser empleada para otras investigaciones relacionadas a enfermedades que cursan con debilidad muscular, siempre y cuando tú lo autorices con la firma del asentimiento informado y esa investigación nueva se encuentre autorizada por nuestro Hospital, para lo cual los investigadores del INP te contactarían bajo el principio de conservar la confidencialidad de la información derivada.

### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Los resultados que se obtengan de este estudio se te informarán en la consulta externa de Genética a través de uno de los investigadores responsables.

Si se tiene alguna duda puedes comunicarte con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

## DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione, que decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente este formato y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Así mismo entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente si no quiero participar, ello no afectará en mi atención médica brindada dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí o mis papás.

En caso de que autorice mi participación en esta investigación, también decidiré si autorizo o no que mi muestra de material genético quede bajo custodia por un tiempo indefinido en el Laboratorio Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría para futuras investigaciones relacionadas a identificar la causa genética de enfermedades neuromusculares, siempre y cuando se me haga llegar la firma del asentimiento informado correspondiente para participar en una nueva investigación autorizada por el Hospital y que se me informe de los resultados obtenidos, salvaguardando el beneficio de esta información en el tratamiento y pronóstico de mi enfermedad:

Marca con una cruz la opción que desees	<b>SÍ ACEPTO</b>	<b>NO ACEPTO</b>
RESGUARDO INDEFINIDO DE MI MUESTRA DE MATERIAL GENÉTICO		

Atentamente

---

Nombre del paciente

Fecha y Firma

---

Nombre del testigo

Fecha y Firma

---

Nombre del testigo

Fecha y Firma

Obtuvo el asentimiento:

---

Nombre

Fecha

Investigadores responsables: Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza y Dra. Ariadna González del Ángel. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

## **ANEXO 4. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (PARA FAMILIARES DE 1ER GRADO)**

**Título: “Delineación del espectro mutacional del gen *DMD* responsable de distrofinopatías: Identificación de mutaciones infrecuentes por Amplificación Múltiple de Sondas ligadas (MLPA) y Secuenciación Automatizada.”**

### **¿Para qué se realiza este estudio?**

El presente estudio se realiza para tratar de conocer de manera precisa la causa genética por la cual su hijo o hermano (a) presenta un trastorno de debilidad muscular (o trastorno neuromuscular que significa enfermedades que afectan al músculo o sistema nervioso y que tienen diversas causas de origen genético) con la finalidad de brindar un pronóstico con relación a evolución y de información a la familia con relación a cómo se transmitió la enfermedad.

### **¿Quiénes pueden participar en este estudio?**

En ese estudio pueden participar todos los familiares de primer grado (padres y hermanos), de los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico confirmado de la distrofia muscular de Duchenne o Becker por mutaciones dañinas en el gen *DMD* y que así lo deseen.

### **¿Quiénes no podrán participar en este estudio?**

Aquellos familiares que no deseen participar en el estudio.

### **¿En qué consiste el estudio y que se me pedirá que haga?**

Se le extraerá una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica tomada por personal calificado y con todas las normas de seguridad e higiene que se requieren como el uso de material estéril y desechable así como uso de guantes. De esta muestra se obtendrán su material genético (ADN) y de esta se analizará el gen de interés que está implicado en el origen o etiología del trastorno neuromuscular que padece su familiar.

### **¿Quién sufragará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados de esta investigación implicará algún gasto económico para el paciente o sus familiares.

### **¿Qué beneficio puedo esperar?**

Los beneficios del presente estudio serán conocer si es Usted portador de una información genética alterada con riesgo de tener hijos (a) con el tipo de debilidad muscular que presenta su familiar, así como informarle la posibilidad de realizarse diagnóstico prenatal en futuros embarazos.

### **¿Puedo negarme a participar en este estudio?**

Su participación es total y absolutamente voluntaria, pueden abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de su hijo (a) o hermano (a) en cualquier servicio de la Institución.

### **¿Quiénes van a tener información de mis datos?**

Sus datos personales en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto, tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

### **¿Qué se va a hacer con la muestra de sangre que ya no ocupen?**

Quedará codificada bajo una clave que no incluya tu nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra. La muestra de tu material genético será conservada hasta su análisis en refrigeración y bajo llave; así mismo, SI TÚ LO AUTORIZAS (ver al final de este formato), ésta quedará por un periodo indefinido bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud y esta muestra sólo podrá ser empleada para otras investigaciones relacionadas a enfermedades que cursan con debilidad muscular, siempre y cuando tú lo autorices con la firma del asentimiento informado y esa investigación nueva se encuentre autorizada por nuestro Hospital, para lo cual los investigadores de este Hospital te contactarían bajo el principio de conservar la confidencialidad de la información derivada.

### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Los resultados que se obtengan de este estudio se te informarán en la consulta externa de Genética a través de uno de los investigadores responsables.

Si se tiene alguna duda puede comunicarse con los investigadores responsables: Dr. Miguel Ángel ÁlcantaraOrtigoza y Dra. Ariadna González del Ángel. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.





## **ANEXO 5. HOJA DE ASENTIMIENTO INFORMADO (HERMANO (A) DEL CASO ÍNDICE)**

**Título: “Delineación del espectro mutacional del gen *DMD* responsable de distrofinopatías: Identificación de mutaciones infrecuentes por Amplificación Múltiple de Sondas ligadas (MLPA) y Secuenciación Automatizada.”**

### **¿Para qué se realiza este estudio?**

El presente estudio se realiza para intentar de conocer la causa genética por la cual tu hermano presenta un cuadro de debilidad muscular (o trastorno neuromuscular que significa enfermedades que afectan al músculo y/o sistema nervioso y que son hereditarias) con la finalidad de brindar un tratamiento más adecuado y de acuerdo a la causa que la origina, así como la evolución que se espera de ella. De igual forma, el estudio podría dar información valiosa para tí y tu familia relacionada a cómo se transmitió la enfermedad genética.

### **¿Quiénes pueden participar en este estudio?**

Pueden participar todos los hermanos (as) de los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico confirmado de una distrofia muscular de Duchenne o Becker por alteraciones que ocurren en un gen llamado *DMD* y que así lo deseen

### **¿Quiénes no podrán participar en este estudio?**

Aquellos hermanos de los pacientes con diagnóstico confirmado de una distrofia muscular de Duchenne o Becker por mutaciones dañinas en el gen *DMD* que no deseen participar.

### **¿En qué consiste el estudio y que se me pedirá que haga?**

Se extraerá una muestra de 3 a 5 ml de sangre periférica tomada por personal calificado y con todas las normas de seguridad e higiene que se requieren como el uso de material estéril y desechable así como uso de guantes. De esta muestra se obtendrán tú material genético (ADN) y de esta se analizará el gen de interés que está implicado en el origen o etiología del trastorno de debilidad muscular que padece tu hermano.

### **¿Quién pagará los gastos del estudio?**

Ninguno de los estudios derivados de esta investigación implicará algún gasto económico para ti o tus familiares.

### **¿Qué beneficio puedo esperar?**

Los beneficios del presente estudio serán conocer si eres portador de una información genética alterada que haga que la enfermedad de tu hermano se repita en ti, en tus hijos o en otros de tus familiares.

### **¿Puedo negarme a participar en este estudio y puedo abandonar el estudio?**

Tu participación es total y absolutamente voluntaria, puedes abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención médica que se le da a tu hermano en cualquier servicio de la Institución.

### **¿Quiénes van a tener la información de mis datos?**

Tus datos personales en el estudio, serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con otras personas como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con su autorización expresa y por escrito. La información necesaria para el análisis de los resultados, puede ser evaluada y revisada únicamente por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, toda la información clínica e impresa recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto, tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas (extracción de ADN)?**

Tu muestra de material genético quedará codificada bajo una clave que no incluya tu nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra. La muestra será conservada hasta su análisis genético en refrigeración y bajo llave; así mismo, ésta quedará por un periodo indefinido bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud, y esta muestra sólo podrá ser empleada para futuros estudios de investigación encaminados al conocimiento de los trastornos neuromusculares de etiología no establecida si así lo autoriza, para lo cual los investigadores del INP te recontactarían, preservando siempre la confidencialidad de la información derivada.

### **¿Puedo conocer los resultados del estudio?**

Los resultados que se obtengan de este estudio se te informarán en la consulta externa de Genética a través de uno de los investigadores responsables.

Si se tiene alguna duda puede comunicarse con los investigadores responsables: Dra. Ariadna González del Ángel y Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

## DECLARACIÓN DE ASENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione, decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente este formato y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio y mis preguntas han sido contestadas. Así mismo entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente si no quiero participar, ello no afectará en mi atención médica brindada dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí ni mis papás.

Atentamente

---

Nombre del Hermano (a)

---

Fecha y Firma

---

Nombre del testigo

---

Fecha y Firma

---

Nombre del testigo

---

Fecha y Firma

Obtuvo el asentimiento:

---

Nombre

Fecha

Investigadores responsables: Dr. Miguel Ángel Álcantara Ortigoza y Dra. Ariadna González del Ángel. Laboratorio de Biología Molecular, 9° Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel 10-84-09-00 Ext. 1306

Presidente del Comité de Ética: Dra. Matilde Ruiz García. Servicio de Neurología Pediátrica. Tel 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

**Anexo 6. Secuencias de primers que se utilizarán en el estudio molecular de Secuenciación Automatizada. (Secuencias tomadas de Marquis-Nicholson, 2013)**

Primers designed vía Batch PD			Primers designed vía Batch PD		
Exón	Forward	Reverse	Exón	Forward	Reverse
1	TTGGGATCACTC ACTTTCCC	AAGAAATCATGTG TTTAGTTCTATCG	41	CTTGCAAGTCGGT TGATGTG	TGAGGGAAACCACTC ACTTTC
2	CCCCAAACCAGC ATCACTC	TGCACAGCTAAAA TAAATGACAC	42	TGGAGGAGGTTTC ACTGTTAGG	ATTTAAGTCAATTGTT CTGGCAC
3	TTTCAAAGGGG ATAATCGTG	TTGCTGTTTCAAT CAGTACCTAGTC	43	CACCATTTGCTAC CTTTGGG	CTGAAATAAATTCTA CAGTTCCTG
4	GGTTTCATTTCTA GTAGATTGTCGG G	AGCCCTCACTCAA ACATGAAG	44	TGCAACCTTCCAT TTAAAATCAG	TTCCATCACCTTCA GAACC
5	TTGCAACTAGGC ATTTGGTC	CACATTTGTTTCA CACGTCAAG	45	TTTCTTTGCCAGT ACAACCTGC	TTAGTGCCTTTCACC CTGC
6	TTGGCCCTAAAAT TTCTATTTATCAC	TGCAACGTTAGAT CAATGTGG	46	ATGTTTGTGTCCC AGTTTGC	TAATGGGCAGAAAAC CAATG
7	TTCTGGGCTCAA AGGATCTG	GCTCCATCCATAG GGCATAAC	47	CAAGGTAGTTGGA ATTGTGCTG	ACATACCAGCCTCCT CCCC
8	TTTTAGGCCTCAT TCTCATGTTC	TGAAGCAAATTG AAAAGGTTTAG	48	ATTTTGGCTTATG CCTTGAG	TGATACCAAATGAGA AAATTCAGTG
9	TTCTACCATGTTG GAAAGTAGTCC	CGAGGAGATAAAA GGCACTG	49	AAATTGATCTGCA ATACATGTGG	TTTCACTGATTATAAA TAGTCCACGTC
10	TTCGATTCATCAT TTAATGTACTGG	CAAGGATGTAAGA GAGTAATTGAGG	50	TTCACCAAATGGA TTAAGATGTTT	TTTTCTCTCACCC AGTCATC
11	CAAACACACACC GATTTACC	GGGAACAACTG AGAATCGTAAC	51	TTGGCTCTTTAGC TTGTGTTTC	CTGGTGGGAAATGG TCTAGG
12	CCCAAATGCGAA CATTCC	CATCAACCATGTC ATCTGTGTTAC	52	AAGTGTTTTGGCT GGTCTCAC	AAAAGGTAACATTAT GGACTGAAAATC
13	AGAAAATTGGCTT GGAATGG	TCTTTAAATCACA GCACTTCAGC	53	AACATAAATGTGA GATAACGTTTGG	TTCAGCTTTAACGTG ATTTTCTG
14-15	GTCCCTTCCAAC TCTAGCG	AAAACAAAGTTGA AAATCCACC	54	ACGAAGTATTTTA AGACACTCCAAC	CAGTTTCACCACCC ATTATTAC
16	CTATAGTGGTGTA TGGAATGCAAC	AAACTAATCTGGT TGCTTCTTTTG	55	TTGTTGCTTAAAG GAAGAGCTG	TCCTCCTTGTCCAAA TACCG
17	CTTTGCCACTCCA AGCAGTC	CCAACAAAACCTGC TGTAATGAG	56	TCCAAATTCACAT TCATCGC	CCAGTTACTTGTGCT AAGACAATGAG

18	ACTAATAGAGGT GTCAGGCAGG	GCACGGAGTTTAC AAGCAGC	57	TTTCAATGGAATT GTTAGAATCATC	AAAATAGTCACTGGA TTACTATGTGC
19	CAGAGTGAAACA TCTTAAGGCTTG	CAGCTGATAAATA TGAACCTATGTG	58	ACAAGTTCTGAGC ACCCAGG	TCCGTCACCACTGAT CCTTC
20	GATCATTCTTTTC AGTCTGTGGG	TGGAAATTGCCAA GAAATACC	59	AAAAGCCGTTAAT CAGTAGGTTAC	TTGTGGGAAGATAAA CACTGCAC
21	TTAAGCTAAACTT GCCTTACTGC	TACCTTCTGGATT TCCCCAC	60	ACTGGCACTGCAC CCTAAAG	CCTATCCTCACAAAT ATTACCATGAAC
22	GGAAAACATGGC AAAGTGTG	TGCTCAATGGGCA AACTACC	61	CGAGTCTGGAATA CTATATACGGTAA G	TTGGCCTTCTCTTC CTAAC
23	CATCTACTTTGTT TACATGTTTGAAT C	AAGATGCTGAAG GTCAAATGC	62	TGTTGTCTTTCT GTTTGCG	TAGGCCAGGCTAATG TCGC
24	TGGGCCTGTGTT TAGACATAAC	GGGAGAGGAGAG CAAATCC	63	ATTCCGAATGGTT CAAAGC	CACCCTTGAACAAT CTAGTGATG
25	TGCCATCAGTCC CAATTTTAC	CGGTGAAGGGAG ACATTAGG	64	GTTATTGGCAAAT CACTGGG	TGCAGCTGTTTCTCC CCTC
26	TCTGATCCCAT GAGTTATTTTC	TCTTAGAACCCAGG AAAGAGCAG	65	GGCACTGAAAG GAAGTTTTAC	TGTACGCTAAGCCTC CTGTG
27	TCTAACTGGGAT GTTGTGAGAAAG	GCCAAAGTTGTTT TGCACTG	66	AAGTGTTTACCCT CTAGGAAAGG	TCATTTCCCATCTAG AACTAGGG
28	TGCATTTTGAATT ACCTGCTAC	CTCTTGGGTTGTT TTCTTTGG	67	TTGCTACTGGAAT TGAGTTGG	AGAAAACGAAGCTCT GTGGG
29	CAAGTTTTAAGTT CTCAGTCCGC	CAGTGTCTGGCAT TGGATTG	68	TGCCTTCTTTCT TTCATCC	CTAACAGCAACTGGC ACAGG
30	AAAAGGTGATTGT GGAAGAGTC	CAAATCAGTGAAT CAAACAACC	69	TTCTTTGGGAATT TGATTTCG	AAAAGTGAATTTAT CCCAGGTG
31	GGTGGTTGAGGA GAGTTTCTG	TGTCCTCAAATCC AATCTTGC	70	GGGCAGAAGACT GGAGTGG	GCTGAGAGGAGTTC AAATATACATC
32	CCAGTTATTGTTT GAAAGGCAAA	AATGAGGAAAGTC AAGGGGTA	71	TTTTGCGGCTGAG TTTGC	AGAACCAAGCGAGC GAATG
33	TGCAAAAGCTAG ATATTGACCAC	CRTAATAAGCAGA GCCTCACTG	72	TGTATAACATAAC TGTGTGGTGGG	GGAATCAGACAAGTT TGGGG
34	ACAAACGATGTC ATCTGCCC	CATGGTCCTGAAA AGCACAG	73	CAGGAATCTTCGA TTAGGTCTTG	TGTGCTATCCTACCT CTAAATCCC
35	CAGAAAGCCGTT TCATAAGC	TTTTCAAACACAG AATTGTTACTGG	74	CCCAAAGCAAAT AAGGGG	AAGATTCTGGCACT TTTCTATG
36	TGACCAGTAACA ATTCTGTGTTTG	CTGAACGGAGTTT ACATTGGG	75	TTTGCTTGCTGTT CTTCGG	TCATTTGCAGGCAC ATACC
37	GCTCACACGCTC TGTTTGG	AGAGTACTGCGC AACCTTCG	76	AAAATTTATGAGT CCTGAGTGTGTAT C	ACGGCCAAATATTCA TGTC

38	AATGCATGTGATT AGTTTAGCAAC	TGTGCTCTGAAAA TTCAGTTGG	77	AATCATGGCCCTT TAATATCTG	GGGTAGGGAAGCGA GTGG
39	TGGGAGGAAACT TATTTTCAAAC	CCATAACTTTTAA GCAACACATCG	78	TGGTAAAAGAAGC AAATTGGTATG	GCTGCAAGTGGAGA GGTGAC
40	AATAACTGCAGC CAGAAGTGC	GAAGTCGTCCATA TACCGATAAGTC	79	TTCCCAAATGGCA AAGAAAC	TCTGCTCCTTCTTCA TCTGTC

## Bibliografía

1. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.* 2016; 53(3): 145-151.
2. Alcántara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutierrez G, Saldaña Y, Maulen I, Lee R, Macías M, Orozco L. High frequency of *de novo* deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin Genet.* 1999; 55(5): 376-380.
3. Alcántara MA, García-Cavazos R, Hernández-U E, González-del Ángel A, Carnevale A, Orozco L. Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Ann Genet.* 2001; 44(3): 149-153.
4. Bermúdez-López C, García-de Teresa B, González-del Ángel A, Alcántara-Ortigoza MA. 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): 93-97.
5. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1): 77-93.
6. Coral-Vázquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman S, Salamanca F, Montañez C. Analysis of dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res.* 1993; 24(1): 1-6.
7. Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizbera A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(20): 3779-94.
8. Dastur RS, Kachwala MY, Khadiolkar SV, Hegde MR, Gaitonde PS. Identification of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene and female carrier status in western India using combined methods of multiplex polymerase chain reaction and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Neurol India.* 2011; 59(6): 803-9.
9. Domingos J, Sarkozy A, Scoto M, Muntoni F. Dystrophinopathies and Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neuropediatrics.* En imprenta 2017.

10. Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(6): 373-8.
11. Ferlini A, Neri M, Gualandi F. The medical genetics of dystrophinopathies: molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice. *Neuromuscul Disord.* 2013; 23(1): 4-14.
12. Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(4):931-9.
13. Flanigan KM. The Muscular Dystrophies. *Semin Neurol.* 2012; 32(3): 255-263.
14. Flanigan KM. Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol Clin.* 2014; 32(3): 671-88.
15. González-Herrera L, Gamas-Trujillo PA, García-Escalante MG, Castillo-Zapata I, Pinto-Escalante D. Identifying deletions in the dystrophin gene and detecting carriers in families with Duchenne's/Becker's muscular dystrophy. *Rev Neurol.* 2009; 48(2): 66-70.
16. Grimm T, Kress W, Meng G, Müller CR. Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2012; 31(3):179-83.
17. Hendriksen JG, Vles JS. Neuropsychiatric disorders in males with Duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Child Neurol.* 2008; 23(5): 477-81.
18. Hotta A. Genome Editing Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2. 2015; 2(4): 343–355.
19. Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 2005; 6(1): 29-35.
20. Kinnett K, Rodger S, Vroom E, Furlong P, Aartsma-Rus A, Bushby K. Imperatives for Duchenne MD: a simplified guide to comprehensive care for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Curr.* 2015; 7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542198/>.
21. Kohli S, Saxena R, Thomas E, Singh J, Verma IC. Gene changes in Duchenne muscular dystrophy: Comparison of multiplex PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification techniques. *Neurol India.* 2010; 58(6): 852-6.



22. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, Djuriscic M, Breuning MH, White SJ, den Dunnen JT. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(11): 1231-4.
23. López-Hernández LB, Gómez-Díaz 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. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(3): 5334-46.
24. Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, Govoni A, Ghezzi S, Gandossini S, Sciacco M, Ciscato P, Bordoni A, Tedeschi S, Fortunato F, Luchinni V, Cereda M, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. 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: 37.
25. Mah JK, Selby K, Campbell C, Nadeau A, Tarnopolsky M, McCormick A, Dooley JM, Kolski H, Skalsky AJ, Smith RG, Buckley D, Ray PN, Yoon G. A population-based study of dystrophin mutations in Canada. *Can J Neurol Sci.* 2011; 38(3): 465-74.
26. Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2014; 24(6): 482–91.
27. Mah JK, Korngut L, Fiest KM, Dykeman J, Day LJ, Pringsheim T, Jette N. A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. *Can J Neurol Sci.* 2016; 43(1): 163-77.
28. Marquis-Nicholson R, Lai D, Lan CC, Love JM, Love DR. 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: 908317.
29. Mavrogeni S, Markousis-Mavrogenis G, Papavasiliou A, Kolovou G. Cardiac involvement in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *World J Cardiol.* 2015; 7(7):410-4.
30. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003; 2(12): 731–40.
31. Nouri N, Fazel-Najafabadi E, Salehi M, Hosseinzadeh M, Behnam M, Ghazavi MR, Sedghi M. 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: 72.
32. Ryder S, Leadly RM, Armstrong N, Westwood M, de Kock S, Butt T, Jain M, Kleijnen J. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017; 12(1): 79.
  33. Sakthivel Murugan SM, Arthi C, Thilothammal N, Lakshmi BR. Carrier detection in Duchenne muscular dystrophy using molecular methods. *Indian J Med Res.* 2013; 137(6): 1102-10.
  34. Schreiber-Katz O, Klug C, Thiele S, Schorling E, Zowe J, Reilich P, Nagels KH, Walter MC. Comparative cost of illness analysis and assessment of health care burden of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Germany. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9: 210.
  35. Schwartz M, Hertz JM, Sveen ML, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology.* 2005; 64(9): 1635-7.
  36. Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, Awano H, Zhang Z, Yamauchi Y, Nishio H, Matsuo M. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center. *J Hum Genet.* 2010; 55(6): 379-88.
  37. Taylor PJ, Maroulis S, Mullan GL, Pedersen RL, Baumli A, Elakis G, Piras S, Walsh C, Prósper-Gutierrez B, De La Puente-Alonso F, Bell CG, Mowat DR, Johnston HM, Buckley MF. 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): 368-72.
  38. Verma PK, Dalal A, Mittal B, Phadke SR. Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy. *Indian J Hum Genet.* 2012; 18(1): 91-4.
  39. Wein N, Alfano L, Flanigan KM. Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Pediatr Clin North Am.* 2015; 62(3): 723-42.
  40. White SJ, Aartsma-Rus A, Flanigan KM, Weiss RB, Kneppers AL, Lalic T, Janson AA, Ginjaar HB, Breuning MH, den Dunnen JT. Duplications in the DMD gene. *Hum Mutat.* 2006; 27(9): 938-45.
  41. Wicklund MP. The Muscular Dystrophies. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2013; 19(6): 1535–70.
  42. Yang J, Li SY, Li YQ, Cao JQ, Feng SW, Wang YY, Zhan YX, Yu CS, Chen F, Li J, Sun XF, Zhang C. MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Med Genet.* 2013; 14: 29.