



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Análisis del efecto de la variante nueva
c.901-6 903del en el gen COL6A2 en la
expresión del mRNA en una paciente con
distrofia muscular de Bethlem.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

Dra. Yanen Zaneli Rios Lozano

TUTORES:

Dr. Rodrigo Moreno Salgado

Dr. Oscar Medina Contreras

CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2024





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

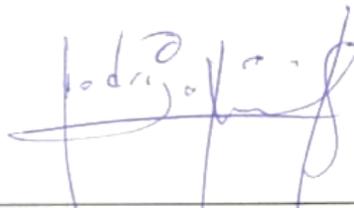
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

Hospital Infantil de México Federico Gómez
Instituto Nacional de Salud
Ciudad de México a 02 de junio del 2023

Hoja de recolección de firmas del protocolo de tesis: "Análisis del efecto de la variante nueva c.901-6_903del en el gen COL6A2 en la expresión del mRNA en una paciente con distrofia muscular de Bethlem.



Dr. Rodrigo Moreno Salgado
Jefe del Departamento de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dr. Oscar Medina Contreras
Investigador en Ciencias Médicas D.
Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dedicatorias

A mi hijo, quien desde su llegada me inspira a ser una mejor versión de mi todos los días, a ser más empática, tolerante y amorosa. Gracias Román por llenarme de besos y decirme que me amas. Eres mi motor y mi inspiración cada día. Te amo.

A mi esposo, quien cada día me sorprende con sus ganas de aprender cosas nuevas y con su curiosidad me invita a ser mejor, quien me apoyo desde el día en el que decidí ser genetista y siempre ha estado a mi lado echándome porras y ayudándome a descubrir en mi cosas que ni yo conocía. Te amo por siempre.

A mis padres, quienes nunca me han dejado de demostrar que siempre contaré con ellos. Nunca terminaré de agradecer todo, siempre tendrán mi apoyo y admiración. Los amo.

A mis amigos y hermanos de residencia quienes con sus risas me ayudaron a que los días difíciles fueran mejores.

Al Dr. Oscar que ha guiado mi camino desde hace 7 años que llegue a este hospital durante mi servicio social.

A mis maestros, por compartir conmigo su conocimiento y poder guiarme.

Yanen

Contenido

Marco teórico	5
Antecedentes	24
Planteamiento del problema	25
Pregunta de investigación	26
Justificación	27
Hipótesis	28
Objetivos	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos	29
Metodología	30
Plan de análisis estadístico	33
Descripción de variables	34
Resultados	38
Discusión	46
Conclusión	50
Perspectivas	51
Cronograma de actividades	52
Limitaciones del estudio	53
Referencias	54
Anexos	61

Análisis del efecto de la variante nueva c.901-6_903del en el gen COL6A2 en la expresión del mRNA en una paciente con distrofia muscular de Bethlem.

Marco teórico

Introducción

El sistema musculoesquelético cumple una variedad de funciones como sostener el cuerpo, permitir el movimiento y la protección a órganos. Dentro de los elementos que lo conforman se encuentran los huesos, cartílagos, tendones, ligamentos u otros tejidos conectivos que conectan las articulaciones, cuyos movimientos son favorecidos por el musculo esquelético el cual se conecta a las estructuras óseas cercanas para poder transducir la fuerza generada mediante la contracción muscular.

El tejido conectivo tiene la función principal de sostener y unir tejidos y órganos, está compuesto por fibroblastos y matriz extracelular (MEC), la cual va a ser importante para la adhesión celular, estabilidad y regeneración. El colágeno es un componente importante de la matriz extracelular, da el soporte a muchos tejidos. Existen diferentes tipos de colágeno que forman parte de la MEC como el tipo I, II, III, VI, IX, XI (Di Martino et al., 2023).

El colágeno tipo VI, es una proteína de la MEC en el estroma, forma una estructura micro fibrilar sobre la membrana basal (Bönnemann, 2011a)

Las miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI representan un grupo de distrofias musculares con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y son causadas por variantes en uno de los genes que codifican para las cadenas α del colágeno VI (Bönnemann, 2011a).

Estos trastornos son únicos entre las miopatías hereditarias en el sentido de que son trastornos híbridos con características clínicas atribuibles tanto al músculo como al tejido conjuntivo. Son trastornos paradigmáticos de la 'miomatriz', la matriz extracelular del músculo, y destacan la importancia de la miomatriz en el funcionamiento y mantenimiento del músculo (Bönnemann, 2011a).

El colágeno tipo VI forma parte de la matriz extracelular a nivel muscular, está formada por tres cadenas peptídicas α , la A1, A2 y A3 las cuales son codificadas por los genes *COL6A1*, *COLA2* y *COL6A3* respectivamente, los dos primeros se ubican en el locus 21q22.3 y el último en 2q37 (Caldú-Agud et al., 2020).

La presencia de variantes patogénicas en los genes que codifican para alguna de las cadenas del colágeno tipo VI provocan una síntesis anormal de colágeno tipo VI o en cantidades insuficientes llevando a degradación de la matriz extracelular que rodea las células musculares, provocando los fenotipos de miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI, con manifestaciones clínicas muy variables, en este se incluye la miopatía de Bethlem y la distrofia muscular congénita de Ullrich (Panadés-de Oliveira et al., 2019).

Las miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI tienen una prevalencia de $<1/100.0000$, con patrón de herencia autosómico dominante y recesivo. Actualmente se clasifica dentro del gran grupo de distrofias musculares de cinturas (LGMD D5 y R22, según el modelo de herencia) (Idoux et al., 2019).

Historia

La miopatía de Bethlem fue descrita por primera vez en 1976 por J. Bethlem y H. Wijngaarden quienes informaron sobre 3 familiar con una miopatía benigna con patrón de herencia autosómico dominante que presentaba contracturas en los dedos, codos y tobillos, así como debilidad y atrofia de los músculos del tronco y extremidades, con progresión lenta, sin embargo, actualmente se sabe que en realidad se trata de una distrofia muscular más que una "miopatía" ya que la

histología del musculo muestra cambios distróficos típicos como la degeneración y regeneración, con reemplazo de musculo por grasa y tejido conectivo fibroso, datos compatibles con una distrofia muscular.(Bethlem & Wijngaarden, 1976).

La distrofia muscular congénita de Ullrich, se describió por primera vez en 1930, inicialmente como una distrofia muscular esclerótica atónica congénita (Nihei et al., 1979).

Para 1978 se describió a otra familia de ascendencia polaca en la que 6 miembros en 4 generaciones padecían el trastorno descrito 2 años antes. Posteriormente se fueron describiendo nuevos casos, con las mismas características clínicas, algunos con presencia de torticolis, con niveles de creatina quinasa elevados y alteraciones a nivel histopatológico, con reemplazo de tejido muscular por tejido graso. Para 1994 Merlini y colaboradores sugieren que el dato característico son las contracturas de los últimos 4 dedos (Merlini et al., 1994), ese mismo año, se reportó el caso de una madre e hija afectadas con contracturas y debilidad proximal leve, con distrofia y necrosis con regeneración de fibras en la biopsia muscular y una tomografía que mostró disminución del volumen de los músculos paravertebrales y menor densidad en músculos proximales (Tohyama et al., 1994).

En el 2005, se describió en una revisión clínica los datos más característicos, las contracturas musculares como sello característico, así como lesiones dermatológicas como hiperqueratosis folicular, cicatrización queloide y cicatrices atróficas (Lampe & Bushby, 2005).

El fenotipo intermedio de estas alteraciones en la colágena tipo VI, se describió en el 2011 y también se propusieron criterios de función motora y pulmonar para distinguir el fenotipo intermedio (Foley et al., 2013).

Epidemiología

La epidemiología internacional de la distrofia muscular de Bethlem no es bien conocida, ya que a menudo es infradiagnosticada o mal diagnosticada. Sin embargo, algunos estudios han estimado que la prevalencia es inferior a 1 en 1 millón de personas (S. S. Lee et al., 2022; Panadés-de Oliveira et al., 2019). Otros autores reportan una prevalencia en el norte de Inglaterra de 0.13:100 000 (Norwood et al., 2009).

Y en Japón y Australia, el fenotipo intermedio representa la segunda forma más común de distrofia muscular congénita después de la distrofia muscular de Fukuyama y las α -dístroglicanopatías, respectivamente (Okada et al., 2007; Peat et al., 2008).

En nuestro país no existen reportes acerca de los datos epidemiológicos de la distrofia muscular de Bethlem, de Ullrich o del fenotipo intermedio.

Manifestaciones clínicas

Los datos clínicos de los trastornos relacionados con el colágeno tipo 6 representan un amplio espectro de fenotipos superpuestos. La edad de inicio de los síntomas suele ser desde los 2 años hasta la séptima década de la vida.

A nivel neuromuscular la debilidad muscular proximal es uno de los datos cardinales, así como la hipotonía, atrofia y debilidad en los músculos proximales, contracturas articulares múltiples en flexión a nivel distal en dedos, muñecas, codo y tobillo, hipermovilidad distal, hiperlaxitud de la articulación distal sobre todo en las articulaciones interfalángicas distales de las manos y la metacarpofalángica del pulgar (Caldú-Agud et al., 2020).

Se ha descrito también, hipotonía congénita, torticolis, sobreposición de las manos y pies con manos con las muñecas en flexión y tobillo en dorsiflexión, cifoescoliosis temprana, cara redondeada con eritema facial en mejillas (Foley et al., 2021).

A nivel dermatológico también presentan datos clínicos muy característicos, como hiperqueratosis folicular, cicatrización queloide y/o atróficas o en “en papel de cigarrillo”, las cuales pueden ser desencadenadas por lesiones leves(S. S. Lee et al., 2022).

Los datos clínicos menos frecuentes son la insuficiencia respiratoria, aunque la mayoría de los pacientes tienen parámetros de función respiratoria disminuidos, generalmente no requieren ventilación no invasiva, en algunos casos esta es necesaria en mayores de 50 años, se puede establecer una correlación entre la capacidad vital forzada y la función del músculo esquelético, pero no con la edad (Angelini, 2020).



Figura 1. Fotografías clínicas de los principales hallazgos en las distrofias musculares relacionadas con el colágeno tipo VI. (Victor et al., 2017).

A nivel cardíaco, las anomalías en la conducción se describen en el 10% de los pacientes, los niveles de CK pueden estar normales o elevarse hasta 10 veces su valor basal.

Clasificación

El espectro de manifestaciones clínicas de las miopatías relacionadas con el colágeno tipo -VI es muy heterogéneo, por lo que se ha establecido una clasificación de acuerdo con su severidad:

1. Distrofia muscular de Bethlem: Se refiere al fenotipo más leve de este grupo de miopatías, clínicamente presentan debilidad muscular proximal, contracturas articulares, hipotonía, retraso de hitos motores durante la primer infancia y la afección respiratoria no es un dato frecuente. Prenatalmente pueden estar ya presentes la hipotonía. En la adultez, los pacientes continúan con debilidad proximal, contracturas de los codos, tendón de Aquiles y flexores largos de los dedos. La progresión clínica es lenta, incluso en mayores de 50 años, aún se conserva la deambulación, aunque pueden requerir ayuda.
2. Distrofia muscular de Ullrich: Este es el espectro de mayor gravedad, los pacientes pueden presentar debilidad congénita, hipotonía, contracturas en articulaciones proximales, hiperlaxitud en articulaciones distales, movimientos prenatales disminuidos. Aunque algunos pacientes pueden lograr la deambulación, esta, suele perderse entre los 10 y 11 años. Todos los pacientes presentan insuficiencia respiratoria en etapas tempranas, suele ser grave y amerita ventilación no invasiva nocturna.
3. Fenotipo intermedio: Aunque logran deambulación independiente después de los 11 años, no logran correr, saltar o subir escaleras sin ayuda. La insuficiencia respiratoria suele tener un inicio más tardío que en Ullrich,

requiriendo ventilación no invasiva a finales de la adolescencia(Foley et al., 2021).

Biopsia muscular

Si bien, no existen datos específicos en las biopsias musculares de pacientes con alteraciones del colágeno tipo 6, se pueden encontrar reportes de cambios miopáticos crónicos inespecíficos al inicio de la enfermedad y con la evolución clínica se podrán encontrar cambios como degeneración, regeneración y reemplazo de tejido muscular por grasa y tejido conjuntivo fibroso. Si se utilizan anticuerpos dirigidos contra el colágeno tipo VI se puede encontrar una expresión disminuida o una localización alterada. Como se puede observar en la figura 1, el colágeno se marca con rojo la laminina γ -1 en verde y cuando estos colocaliza se observa una coloración amarilla. En a, son imágenes de un control sano y en b de un paciente con un fenotipo intermedio de miopatías relacionadas con el colágeno tipo 6. En b se puede observar la falta de colocalización entre el colágeno tipo VI y los componentes de la membrana basal, sugiriendo una función inadecuada de la proteína a nivel muscular (Bönnemann, 2011a).

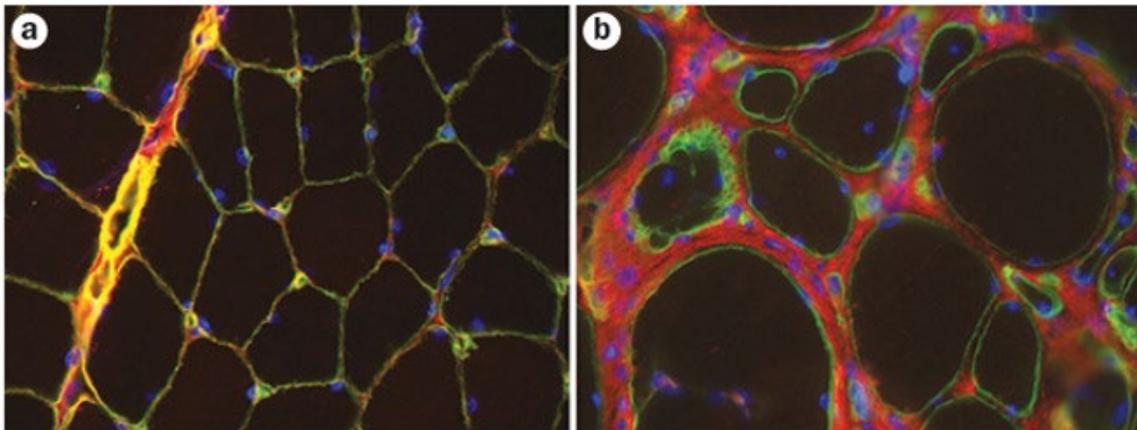


Figura 2. Inmunohistoquímica del colágeno tipo VI en biopsias musculares de un paciente con fenotipo intermedio de miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI.

Estudios de imagen.

La resonancia magnética y el ultrasonido muscular pueden brindar datos que orienten hacia alteraciones del colágeno tipo VI, sobre todo para la distrofia muscular de Bethlem. En esta, el musculo que con mayor frecuencia se ve afectado en los estudios de imagen, es el vasto lateral, se observa un borde de señal anormal a lo largo de la periferia con preservación de la parte central (“patrón de afuera hacia adentro”). Otro musculo afectado es el recto femoral, con señal anormal dentro de un área central del musculo, rodeada por musculo de apariencia normal (“patrón de nube central”). En la figura 2 se muestran imágenes de resonancia magnética de 4 pacientes con Distrofia muscular de Bethlem, con conservación de la parte central del vasto lateral y bordes con aumento de la señal, asi como aumento en la parte central del recto femoral (Mercuri et al., 2005).

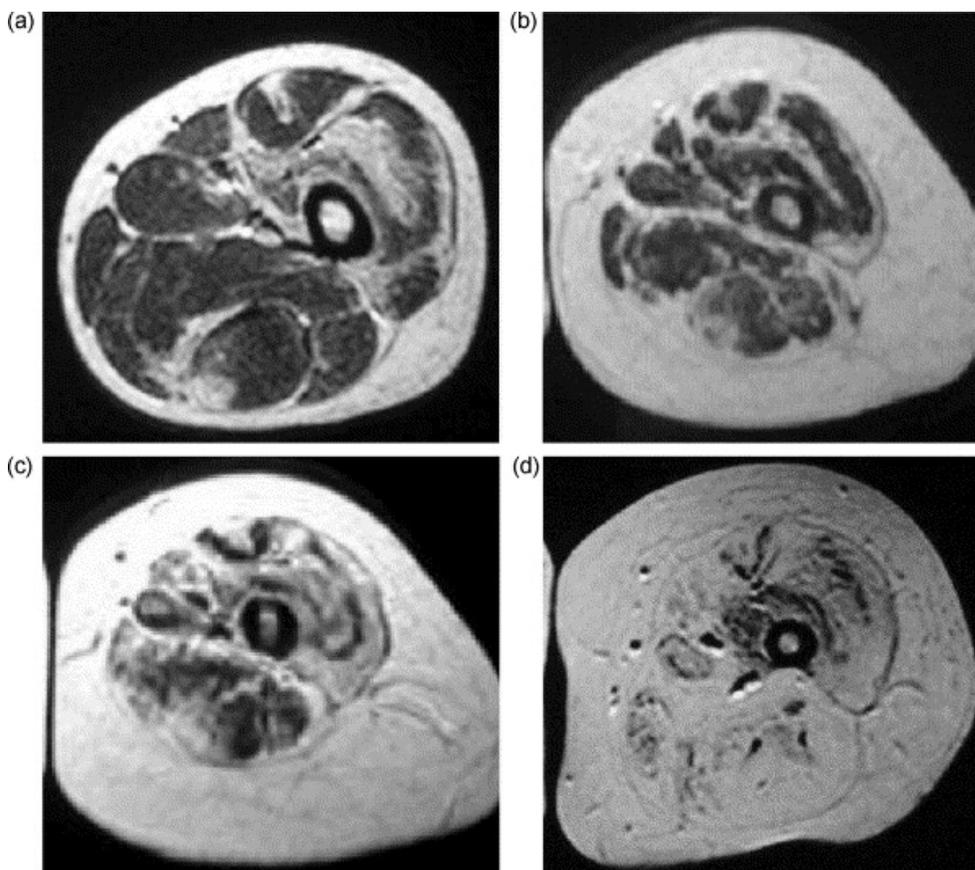


Figura 3. IRM. Imágenes transversales ponderadas en T1, de cuatro pacientes con Distrofia muscular de Bethlem.

Gen COL6A2

El locus se ubica en 21q22.3, codifica para la subunidad alfa-2 del colágeno tipo VI. Se mapeo por primera vez en 1988 y en ese mismo año se estudió su función (Klewer et al., n.d.).

Gen	Proteína	Locus	Exones	Mb	Da	aa
COL6A1	Cadena alfa-1 del colágeno VI	21q22 .3	35	23.2	108529	1028
COL6A2	Cadena alfa-2 del colágeno VI	21q22 .3	29	34.7	108579	1019
COL6A3	Cadena alfa-3 del colágeno VI	2q37 .3	44	90.1	343669	3177

Tabla 1. Diferencias entre los genes de las cadenas alfa del colágeno tipo VI.

Proteína COL6A2

El colágeno tipo VI forma parte de la matriz extracelular en el musculo, está conformada por tres cadenas peptídicas, A1, A2 y A3 que son codificadas por los genes *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*.

La proteína colágeno VI es el componente principal de la matriz extracelular a nivel muscular, participa en mantener la estabilidad muscular ya que permite establecer la unión entre la lámina basal y la matriz intersticial que rodea. Requiere de su ensamblaje para que las cadenas α se combinen y formen tetrámeros de COL6 que serán secretados a la membrana extracelular (Aguti et al., 2020).

Fisiopatología y bases moleculares

Recientemente, se han descrito las celopatías de las células satélite, es decir, aquellos trastornos musculares cuyas variantes patogénicas provocan disfunción de las células satélite de manera directa o indirecta. Las células satélites, son el nombre con el que se conoce a las células madre musculares, cuya función principal se enfoca en el crecimiento y homeostasis del musculo esquelético para su adecuada función, reparación y regeneración. La unidad funcional del musculo esquelético es la fibra muscular (miofibra)(Martino et al., 2023).

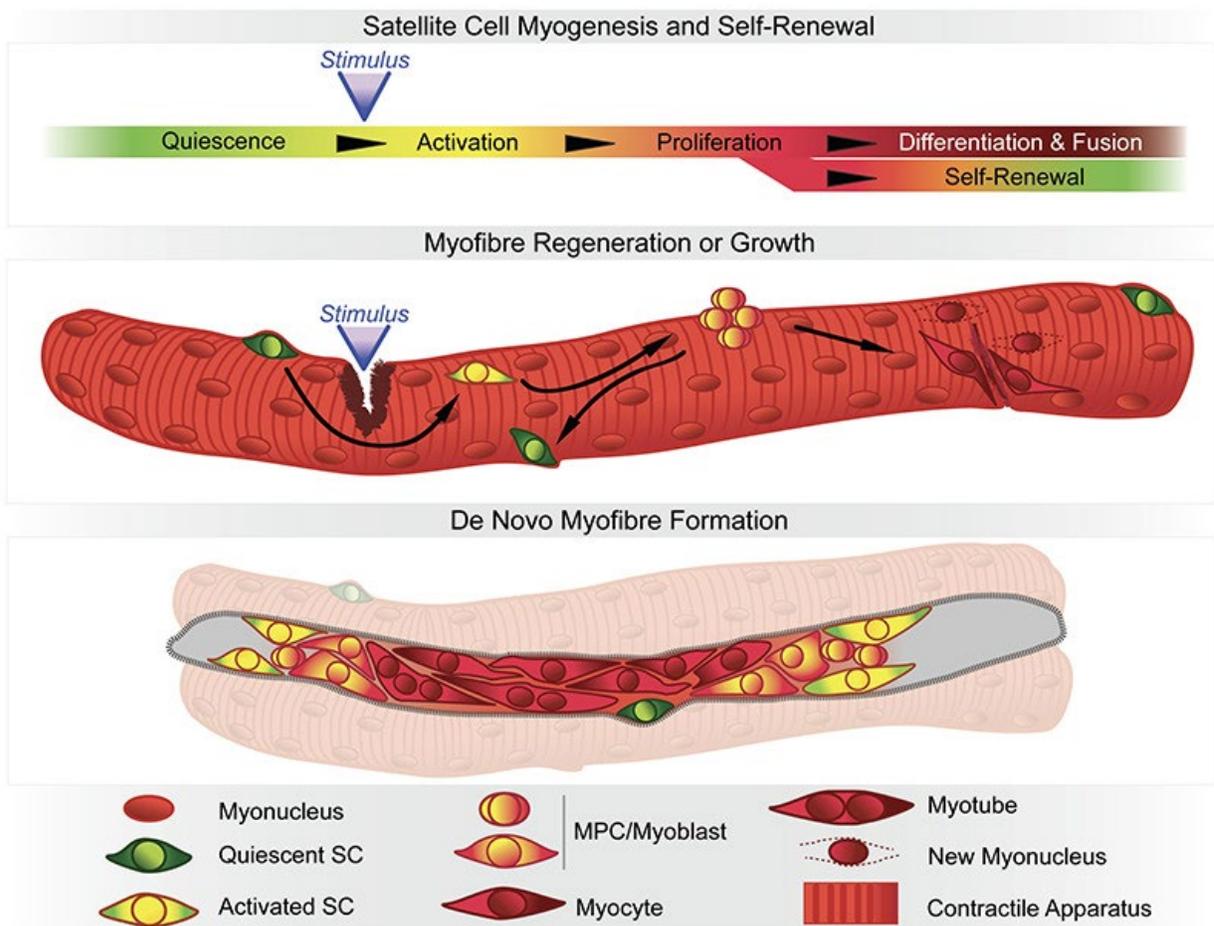


Figura 4. Dinámica de las células satélite a nivel muscular.

En la figura 2 se puede observar en color verde a las células satélite que por lo general se encuentran en estado quiescente, ubicadas entre la lámina basal y el plasmalema. Tras sufrir alguna lesión o como respuesta a algunas señales de crecimiento, estas células se activan (ilustradas en color amarillo) y comienzan a proliferar, generando una población de células progenitoras musculares (MPC) conocidas como mioblastos (en color anaranjado), que posteriormente entraran a diferenciación celular para convertirse en miocitos (ilustrados de color rojo). Los miocitos posteriormente se fusionarán con fibras musculares multinucleadas preexistentes, o bien, formarán miofibras nuevas. Del total de la progenie de las células satélite, una parte es retiradas del ciclo celular y entra nuevamente en reposo, lo que mantendrá la autorrenovación y regeneración a lo largo de la vida (Ganassi & Zammit, 2022).

Las variantes patogénicas en estos genes producen una síntesis alterada del colágeno tipo VI o en menor cantidad por lo que la matriz extracelular alrededor de las células musculares se degrada (Caldú-Agud et al., 2020).

Al existir una cadena de colágeno VI alterada, esta ejerce un efecto dominante negativo durante la formación de los tetrámeros, llevando así a un ensamblaje defectuoso de la proteína a nivel intracelular (Aguti et al., 2020).

Las variantes con efecto dominante negativo, representan del 50-75% en los casos con fenotipo grave o de Ullrich y 100% de los casos del fenotipo leve o de Bethlem (Aguti et al., 2020).

Modelos de estudio

El uso de modelos animales para el estudio de las patologías es una metodología ampliamente utilizada. En el caso de la miopatía de Bethlem (BM), los modelos murinos no han logrado reproducir las variantes patogénicas que ya se han encontrado en humanos. Existe un reporte de un modelo murino con debilidad muscular distal y disminución de la fuerza de agarre (Meehan et al., 2017).

También existe un modelo de pez cebra (*col6a1^{Δex14}*) que se ha catalogado como el único modelo animal estandarizado para el estudio de esta patología. Este modelo tiene una de las variantes patogénicas más frecuentes que provoca el salto del exón 14 en el mRNA que codifica para la cadena α1 del colágeno tipo VI (*col6a1^{Δex14}* fish) la cual se manifiesta con una estructura alterada del retículo sarcoplásmico y mitocondrias con alteración en los canales iónicos y niveles de calcio (Idoux et al., 2019).

Patrón de herencia

Inicialmente se describió un patrón de herencia autosómico dominante, pero en el 2009 se describió el primer reporte de 2 pacientes no relacionados, cada uno de los cuales era heterocigoto compuesto para una variante trunca y una variante sin sentido en *COL6A2* (Gualandi et al., 2009).

En el fenotipo intermedio y de Ullrich, se ha descrito mosaicismo somático y germinal. En el caso del patrón de herencia autosómico dominante, si uno de los padres tiene la variante patogénica identificada en el paciente y está afectado, el riesgo para los hermanos del paciente de heredar la variante es del 50% por cada embarazo de los padres e independientemente del sexo del producto, en el caso que los padres no sean portadores de la variante y este sea un caso *de novo* en la familia, las posibilidades de transmitir la variante patogénica es igual al riesgo de la población general, pero no se debe descartar la presencia de mosaicismo somático o germinal en los padres (Bönnemann, 2011a).

En la herencia autosómico recesiva, si está confirmado que ambos padres son heterocigotos para una variante patogénica, cada hermano del paciente afectado, tiene un riesgo del 25% de estar afectado, 50% de ser portador y 25% de no estar afectado y no ser portador, estos riesgos son por cada embarazo de los padres e independientemente del sexo del producto (Foley et al., 2021).

Diagnóstico

No existen a la fecha criterios para el diagnóstico clínico. El diagnóstico se establece en un paciente con los datos clínicos sugestivos, imágenes musculares, estudios inmunohistoquímicos y mediante la identificación de variantes patogénicas heterocigotas o bialélicas en *COL6A1*, *COL6A2* o *COL6A3* mediante pruebas genéticas moleculares (Bönnemann et al., 2014).

Estas pruebas moleculares, pueden incluir el análisis de genes únicos, panel multigénico, secuenciación de exoma, secuenciación de genoma completo, según el fenotipo de cada paciente. Estos análisis pueden detectar deleciones e inserciones intragénicas pequeñas, así como variantes en sitios de empalme. Sin embargo, también se deben considerar los análisis de deleción/duplicación intragénicas en caso de no obtener resultados en los primeros análisis y si el fenotipo del paciente es muy sospechoso de una miopatía relacionada con el colágeno VI (Fan et al., 2018a).

Para el caso de *COL6A1*, la frecuencia de variantes patogénicas identificadas es del 35-38%, para *COL6A2*, del 44-46% y para *COL6A3* del 18-19%, de todos los casos de miopatías relacionadas con el colágeno tipo 6. En los tres genes, la tasa de detección por secuenciación de próxima generación es mayor al 99% y menor al 1% para el caso de los análisis de deleción/duplicación (Allamand et al., 2011).

Esto apoya la idea de que ante un caso sospechoso en un paciente con datos clínicos muy sugestivos de miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI, con técnicas de secuenciación se obtienen tasas diagnósticas muy altas.

Diagnósticos diferenciales

Existe una larga lista de trastornos que cursan con contracturas articulares que deben ser tomados en cuenta como parte de los diagnósticos diferenciales de la

distrofia muscular de Bethlem, entre ellos, se encuentran la Calpainopatía, debido a variantes en *CAPN3*, con patrón de herencia AR y AD y que cursa clínicamente con atrofia de los músculos peri escapular y bíceps y las contracturas suelen ser más graves (Forsting et al., 2022).

La distrofia muscular de Emery-Dreifuss, por variantes en *EMD*, *FHL1*, *LMNA*, con patrón de herencia ligado al X y AD que se presenta con contracturas articulares en la primera infancia, atrofia muscular acompañada de debilidad con progresión lenta así como afección cardíaca (Heller et al., 2020). La miopatía por variantes en *FHL1*, con patrón de herencia ligado al X, cuyo dato histológico característico es la presencia de cuerpos reductores y clínicamente presentan debilidad muscular temprana, grave con insuficiencia respiratoria en edades tempranas (Borch et al., 2022).

La distrofia muscular por variantes en *LAMA2*, distintivamente tiene afección en SNC, con alteraciones de la sustancia blanca, niveles altos de creatina cinasa (CK) y neuropatía desmielinizante (Angelini, 2020; Bönnemann et al., 2014).

La miopatía por variantes en *TTN*, de herencia autosómico-recesiva que se presenta con artrogriposis y alteraciones en la resonancia magnética muscular con contraste (Oates et al., 2018).

Por las lesiones cutáneas que pueden presentar los pacientes con distrofia muscular de Bethlem; la acroangiodermatitis, un trastorno angioproliferativo benigno, de extremidades inferiores, es parte de los diagnósticos diferenciales, ya que, debido a que las cadenas de colágeno VI, se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos, muy probablemente esto contribuya a la fisiopatología de esta entidad (S. S. Lee et al., 2022).

Existen otros trastornos a tomar en cuenta como parte de los diagnósticos diferenciales como lo es, Ehlers-Danlos por variantes en *COL12A1*, ya que pueden compartir datos con el fenotipo grave e intermedio como cifoescoliosis, hipotonía, laxitud articular, retraso de hitos motores, piel blanda. También otros subtipos de Ehlers-Danlos como el causado por variantes en *PLOD1*, *FKBP14*, *COL1A1*,

COL5A1, *COL5A2*. Otra entidad que se debe considerar es el síndrome de Marfan, por variantes en *FBN1*, ya que pueden presentar hiperlaxitud articular, retraso de hitos motores y piel blanda (Bönnemann et al., 2014).

Tratamiento y seguimiento

Actualmente no existe un tratamiento para las miopatías relacionadas con el colágeno tipo 6, se da un manejo multidisciplinario según las afecciones que presenten los pacientes. En el caso de la miopatía de Bethlem, para aquellos pacientes que requieren ventilación mecánica no invasiva (VMNI) mediante presión positiva (BiPAP) sobre todo al dormir, por lo que requieren valoración por neumología y cardiología, para la prevención de la sobrecarga cardiaca derecha así como fisioterapia respiratoria (Foley et al., 2013). En caso de presentar escoliosis y contracturas como en el tendón de Aquiles; seguimiento por ortopedia y manejo quirúrgico en caso de ser necesario. Terapia ocupacional para el manejo de la afección articular. Para las alteraciones en la piel, seguimiento por dermatología (Victor et al., 2017).

Los pacientes con miopatía de Bethlem requieren seguimiento anual con pruebas de función pulmonar, polisomnografía, vigilancia de la progresión de la escoliosis con radiografías anuales, evaluación cardiaca anual con ecocardiograma y electrocardiograma así como evaluación anual de fisioterapia (Foley et al., 2021).

Se han estudiado algunos enfoques utilizando un oligonucleótidos antisentido gamper (ASO) o RNAs de interferencia pequeños (siRNA) para disminuir el efecto dominante negativo en variantes en *COL6A* asociadas a distrofia muscular congénita de Ullrich (Aguti et al., 2020).

Clasificación de variantes genéticas

El desarrollo e implementación de la secuenciación de siguiente generación de alto rendimiento en el ámbito clínico y de investigación ha permitido mejorar las tasas de diagnóstico molecular. Sin embargo, esto también ha traído consigo una mayor complejidad para la interpretación de las variantes de secuencia encontradas, por lo que el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG), en el 2020 publicó los estándares técnicos para la interpretación y el informe de variantes de secuencia, el cual va dirigido a las pruebas genéticas implementadas en laboratorios clínicos, para el genotipado, análisis de genes individuales, paneles, exomas y genomas.

Dentro de la terminología que se sugiere utilizar, para la clasificación de las variantes, en trastornos con herencia Mendeliana o clásica, tenemos:

1. Variante patogénica: Cambio en la secuencia de nucleótidos sobre una secuencia de referencia que repercute negativamente en el fenotipo del paciente.
2. Variante probablemente patogénica: De acuerdo con la secuencia se es probable que haya relevancia, pero tiene que confirmarse
3. Variante de significado incierto: Diferencia entre la secuencia de un individuo, sobre una secuencia de referencia que no se reconoce la relevancia patogénica.
4. Variante probablemente benigna: De acuerdo con la secuencia se es probable que no haya ninguna relevancia, pero tiene que confirmarse.
5. Variante benigna: La secuencia de nucleótidos no tiene ninguna relevancia en la producción de productos funcionales, por lo tanto, tampoco en el fenotipo del paciente.

También se sugiere utilizar el término variante para reemplazar los términos “mutación” y “polimorfismo”, ya que estos solían crear confusión debido a su

atribución incorrecta a efectos patogénicos o benignos. En las tablas 1 y 2 se muestran los criterios propuestos para la clasificación de variantes patogénicas y benignas, respectivamente (Richards et al., 2015a).

Evidencia de patogenicidad	Categoría
Muy fuerte	Sin sentido, <i>frameshift</i> .
Fuerte	Establecimiento del daño <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> en el gen o en su producto.
Moderada	Cambio localizado en puntos calientes.
De soporte	Fenotipo familiar altamente sospechoso.

Tabla 2. Criterios propuestos por la ACMG para la clasificación de las variantes patogénicas.

Evidencia de benignidad	Categoría
Fuerte	Evidencia en estudios <i>in vitro</i> donde no se demuestra alteración del producto funcional.
De soporte	<i>In frame</i> en regiones altamente repetidas que no altera el producto funcional.

Tabla 3. Criterios propuestos por la ACMG para la clasificación de las variantes benignas.

Procesamiento del mRNA

El proceso de splicing o empalme alternativo es un mecanismo que permite que un solo gen genere múltiples RNA y así regular la expresión génica postranscripcional, así el 95% de los genes que contienen intrones sufren una o más formas de empalme alternativo. Dentro de los tipos de empalmes alternativos están: Omisión de exón, retención de intrones, selección de sitios de empalme alternativos en 5' y 3' y el empalme mutuamente excluyente. El empalme alternativo es modulado por secuencias reguladoras en cis llamadas potenciadores o silenciadores del empalme las cuales se unen a proteínas reguladoras (Ule, J, et al., 2019).

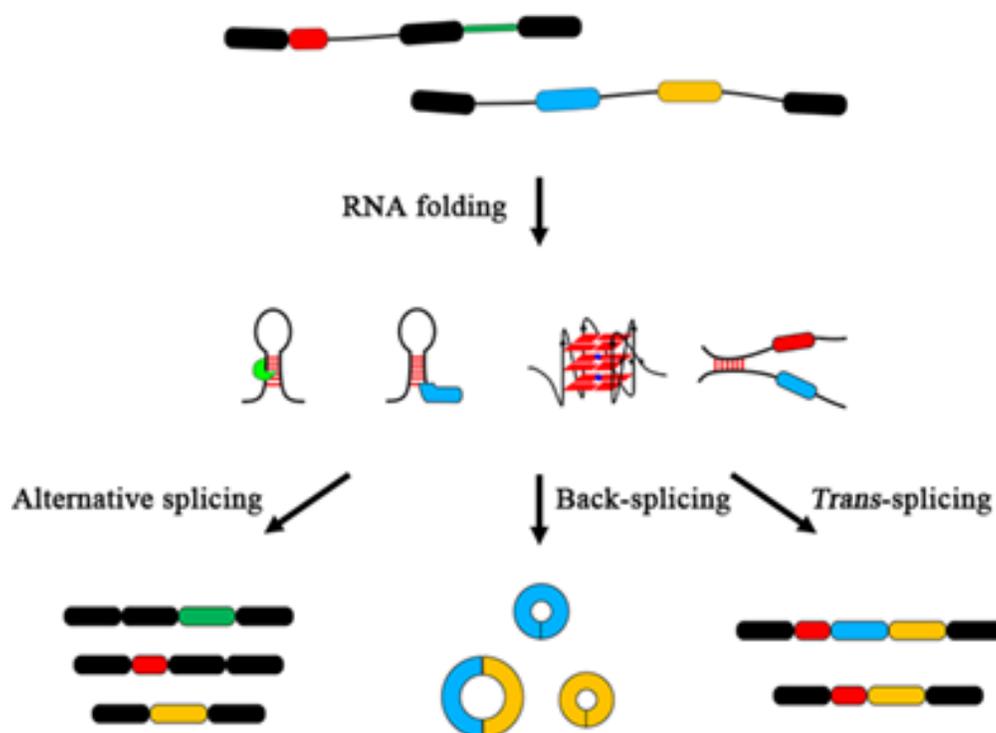


Figura 5. Procesamiento del RNA.

Dentro del empalme, recientemente se han encontrado eventos de empalme alternativos de RNA no codificante así como empalme alternativo no canónico. Por ejemplo, en RNA largo no codificante (lncRNA) genera diferentes tipos de RNA mediante sitios de empalme alternativos 5' y retención de intrones. Dentro del empalme no canónico (Empalme inverso), permite generar RNA circular (circRNA), el cual es un RNA no codificante que se genera después del empalme del pre-mRNA en el que un empalme localizado corriente debajo de 5' (Sitio donador del splicing) se une a un sitio de splicing corriente arriba de 3' (Sitio aceptor de splicing), generando así una transcripción de RNA circular con un enlace fosfodiéster 3'-5' (Xu B, et al., 2021).

Una deleción en un sitio de empalme puede tener un efecto significativo en el procesamiento del ARN. El empalme es el proceso mediante el cual se eliminan los intrones del pre-mRNA y los exones se unen para formar el mRNA maduro. El empalme ocurre en sitios específicos llamados sitios de empalme, que se encuentran en los límites entre los intrones y los exones. Una deleción en un sitio de empalme puede dar como resultado que uno o más intrones permanezcan en el mRNA maduro, lo que lleva a la producción de proteínas anormales.

Cuando ocurre una mutación en el sitio de empalme, la transcripción de mRNA posee información de estos intrones que normalmente no debería incluirse. Se supone que se eliminan los intrones, mientras que se expresan los exones. La eliminación del sitio de empalme da como resultado que uno o más intrones permanezcan en el mRNA maduro y puede conducir a la producción de proteínas anormales (Halperin et al., 2021).

Antecedentes

En el departamento de genética del Hospital Infantil de México se han visto en consulta tres niños con sospecha de alteraciones de la colágena. Los datos se resumen en la tabla 4, que se muestra a continuación.

Manifestación clínica	Paciente de este protocolo	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Hitos motores retrasados	✓	✓	✓	✓
Hipotonía	✓	✓	✓	✓
Debilidad muscular proximal	✓	✓	✓	✓
Contracturas articulares distales (Codos, tendón de Aquiles, interfalángicas)	✓	✓	✓	✓
Progresión lenta	✓	X	X	✓
Dificultad para la deambulación, subir escaleras	✓	✓	X	✓
Cifoescoliosis	X	✓	X	X
Displasia congénita de cadera	X	✓	X	✓
Afección respiratoria	X	✓	✓	X
Alteraciones dermatológicas (Eritema facial, cicatrices atróficas, queloides, hiperqueratosis folicular)	✓	✓	X	X

Tabla 4. Comparación de datos clínicos entre la paciente de este protocolo y 3 pacientes del HIMFG del Departamento de genética.

Planteamiento del problema

El colágeno VI es un componente importante de la matriz extracelular que forma una red microfibrilar que se encuentra en estrecha asociación con la célula y la membrana basal circundante. El colágeno VI también se encuentra en el espacio intersticial de muchos tejidos, incluidos músculos, tendones, piel, cartílagos y discos intervertebrales. Por lo tanto, las variantes en genes que codifican para el colágeno VI dan como resultado trastornos con afectación combinada de músculo y tejido conjuntivo con una clínica muy heterogénea. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de las miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI ya que eso puede ayudarnos a mejorar nuestra comprensión de estos trastornos. A pesar de que a nuestra institución acude un gran número de pacientes con trastornos musculoesqueléticos, es muy probable que no se estén diagnosticando todos los casos de distrofias musculares por alteraciones en el colágeno tipo VI, por lo que el estudio la nueva variante c.901-6_903del en *COL6A2*, permitirá ampliar el conocimiento tanto clínico como molecular sobre esta enfermedad y también sentará las bases para el estudio y análisis de futuros casos en nuestra institución.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las manifestaciones clínicas y el efecto en la expresión del mRNA de la variante nueva c.901-6_903del en el gen *COL6A2* en una paciente con distrofia muscular de Bethlem?

Justificación

Las miopatías relacionadas con el colágeno tipo VI son un grupo de trastornos genéticos raros, causados por variantes en los genes que codifican para la colágena tipo VI, una proteína esencial tanto para la estructura como para la función de los músculos. Estos trastornos pueden presentarse con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, aunado a esto, la baja frecuencia con la que suelen reportarse hace más complejo su diagnóstico. A nivel internacional existen reportes de caso y series de pacientes, sin embargo, en nuestro país, no contamos con esta información.

La importancia de estudiar este tipo de distrofias musculares nos permitirá comprender mejor las causas moleculares y el papel del colágeno tipo VI a nivel muscular, ya que actualmente, no existen intervenciones terapéuticas farmacológicas. Por lo que el estudio de estas distrofias musculares puede ayudar mejorar nuestra comprensión de estos trastornos y ayudar en el desarrollo de herramientas tanto diagnósticas como terapéuticas.

Hipótesis

Si el empalme es el proceso mediante el cual se eliminan los intrones del pre-RNA y los exones se unen para formar un mRNA maduro y si las deleciones del sitio de empalme pueden tener un efecto significativo en el procesamiento del RNA, entonces la variante c.901-6_903del en el gen *COL6A2* interrumpirá el proceso normal de empalme y dará como resultado una proteína COL6A2 anormal que resultará en una funcionalidad alterada del colágeno tipo VI con manifestaciones clínicas relacionadas con esta proteína.

Objetivos

Objetivo general

Analizar las manifestaciones clínicas y el efecto en la expresión del mRNA de la variante nueva c.901-6_903del en el gen *COL6A2* en una paciente con distrofia muscular de Bethlem.

Objetivos específicos

1. Describir las manifestaciones clínicas que la paciente presento.
2. Describir las alteraciones en los resultados de imagen realizados en la paciente.
3. Analizar el tipo de variante encontrada en la paciente en el estudio de secuenciación de segunda generación.
4. Desarrollar un modelo de estudio que permita analizar mediante ensayos de biología molecular la región afectada por la variante encontrada.
5. Confirmar la variante a través de secuenciación tipo Sanger.
6. Medir el efecto de la variante respecto a un control sanos, mediante el análisis del mRNA

Metodología

El diseño del estudio consiste en un estudio experimental, prospectivo, transversal. La población de estudio consiste en una paciente femenina del Hospital Infantil de México Federico Gómez vista en el departamento de genética, en el periodo de marzo del 2022.

La paciente fue elegida debido a que inicialmente contaba con datos sugerentes de alteraciones del colágeno; sin embargo, no contaba con un diagnóstico definitivo, por lo que se realizó exploración física completa e historia clínica completa, con toma de fotografías clínicas autorizadas por la paciente y por su madre.

Se obtuvo consentimiento y asentimiento informado por la madre y paciente, se brindó asesoramiento genético preprueba y se tomó muestra de sangre periférica para realizar secuenciación de segunda generación de un panel de genes de alteraciones musculoesqueléticas que incluyó 131 genes.

En una cita posterior, se hizo entrega de resultados y se brindó asesoramiento genético, debido a que inicialmente la variante obtenida: c.901-6_903del en el gen *COL6A2* se reportó como probablemente patogénica, fue necesario realizar estudio de segregación a ambos padres.

El resultado de segregación fue negativo, por lo que esto le dio más puntos de patogenicidad a la variante y fue reclasificada a patogénica.

Posteriormente, se le invitó a participar en este proyecto (a la paciente y a un control sano), se tomaron muestras de sangre periférica, 4 mL en tubos con EDTA. Se extrajo DNA con el kit Quick-DNA Miniprep Plus Kit y RNA con el kit Quick-RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research) de acuerdo con los protocolos facilitado por el proveedor (**Anexo E y F**). Las muestra fueron almacenadas en la Unidad de Investigación epidemiológica en endocrinología y nutrición del HIMFG, a -80°C hasta su utilización.

Se diseñaron 5 pares de oligonucleótidos (sentido y antisentido), para el exón 6, 7, 8 y 9 del gen *COL6A2* (**Anexo G**).

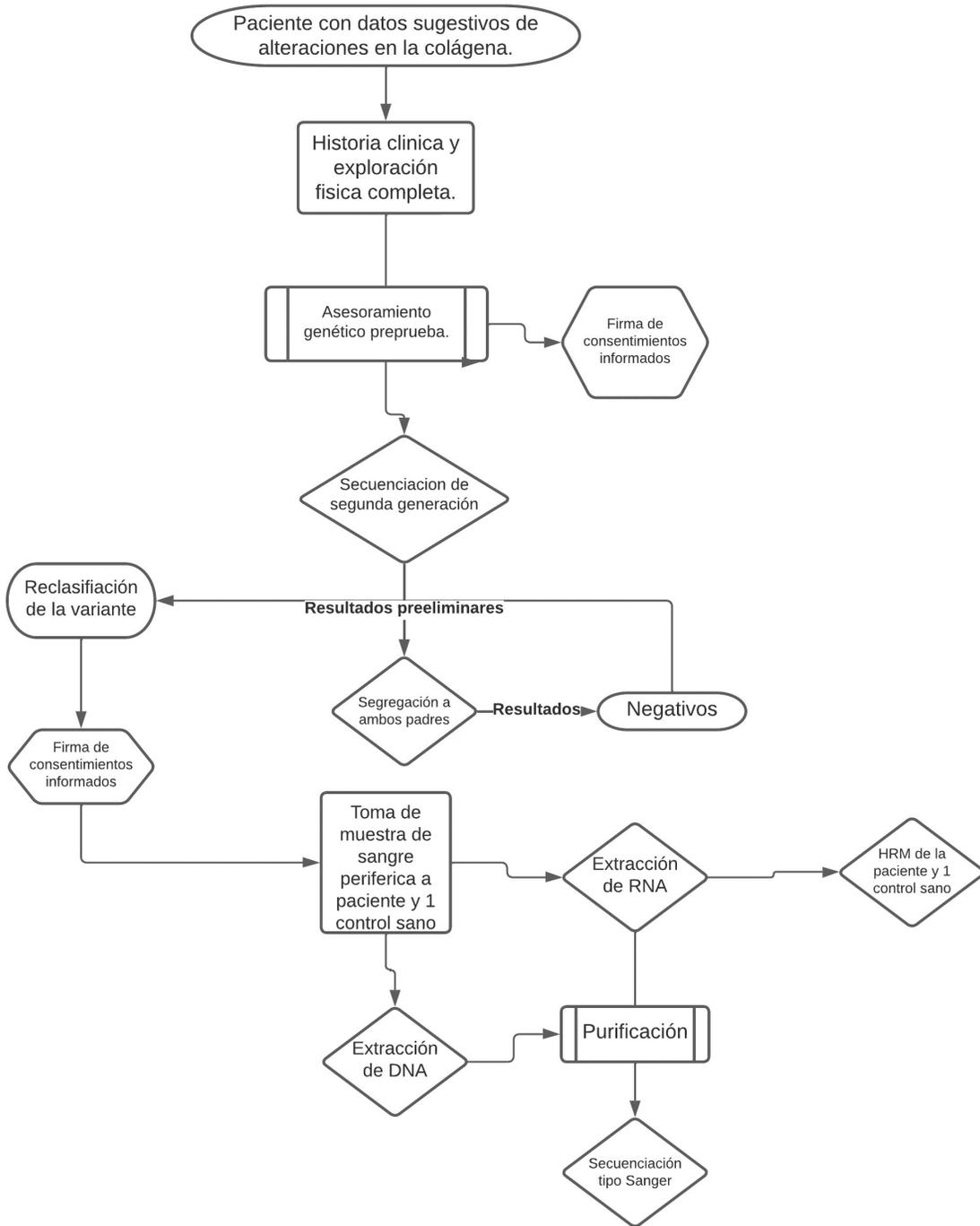
Se amplificó gDNA con los primers mencionados, y se realizó un gel de agarosa al 3% en dónde se corrieron 100 µg de gDNA de la paciente y un control sano, con los siguientes pares de primers: 7F-9R, 7F-8R, 8F-9R para comparar el tamaño de la banda entre paciente y control.

Posteriormente se elaboró un gel de agarosa al 3% en dónde se corrió durante 25 minutos a 100 V, 100 µg de gDNA y 100 µg de cDNA de COL6A2 de la paciente, para confirmar integridad y peso molecular, posteriormente la banda fue purificada y enviada para su secuenciación tipo Sanger.

Estas muestras junto con los primers fueron enviadas para realizar secuenciación tipo Sanger a un laboratorio privado.

Paralelamente se realizó High Resolution Melting (HRM) del cDNA de la paciente y el control sano, para evidenciar cambios en la secuencia del RNA mensajero.

Diagrama de flujo de la metodología.



Plan de análisis estadístico

Se realizará una comparación no paramétrica en los niveles de expresión del mRNA entre la paciente del protocolo y un control sano así como descripción de los datos clínicos.

Descripción de variables

Variable	Definición	Tipo de variable	Unidad de medición
Sexo	Condición de un individuo que lo distingue entre masculino y femenino.	Cualitativa, nominal dicotómica	Hombre/Mujer
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento	Cuantitativa continua	Años
Miopatías relacionadas con el colágeno tipo 6	Grupo continuo de fenotipos clínicos superpuestos con distrofia muscular de Bethlem en el extremo más leve, distrofia muscular congénita de Ullrich (UCMD) en el extremo más grave y un fenotipo entre UCMD y distrofia muscular de Bethlem. denominado COL6-RD intermedio	Cualitativa nominal policotómica	Debilidad muscular proximal Contracturas articulares en los codos, los tendones de Aquiles y los flexores largos de los dedos. Hipotonía Hitos motores retrasados Afectación respiratoria Cicatrización queiloide Cicatrización el papel de cigarro Queratosis folicular
Debilidad muscular	Pérdida de la fuerza muscular	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia
Contracturas articulares	Tensión permanente de los músculos, los tendones, la piel y los tejidos cercanos que hacen que las articulaciones se acorten y se vuelvan rígidas.	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia
Hipotonía	Disminución de la tensión o del tono muscular, o de la	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia

	tonicidad de un órgano.		
Hitos motores retrasados	Comportamientos o destrezas físicas observadas en lactantes y niños a medida que crecen y se desarrollan. Voltearse, gatear, caminar y hablar se consideran todos hitos o acontecimientos fundamentales.	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia
Dificultad respiratoria (Disnea)	Afección que involucra una sensación de dificultad o incomodidad al respirar o la sensación de no estar recibiendo suficiente aire.	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia
Queratosis folicular	También conocida comúnmente como queratosis pilaris, es una afección dermatológica benigna que se caracteriza por la formación de pequeñas protuberancias ásperas y escamosas en la piel, por un exceso de producción de queratina.	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia
Cicatrices atróficas	Cicatrices que se sitúan por debajo de la superficie de la piel circundante. Estas pequeñas depresiones se producen cuando la	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia

	cantidad formada del nuevo tejido conectivo es insuficiente debido a la desorganización del proceso de curación.		
Cicatrices queloides	Las cicatrices hipertróficas y los queloides son respuestas hiperproliferativas del tejido conectivo frente a diferentes estímulos, entre los que se incluyen la inflamación, la infección y los traumatismos cutáneos (sobre todo las quemaduras y las heridas quirúrgicas).	Cualitativa nominal Dicotómica	Presencia o ausencia
Variante Genética	Cualquier cambio en la secuencia del ADN de una célula	Cualitativa nominal policotómica	Sanger HRM NGS
High Resolution Melting (HRM)	El análisis de fusión de alta resolución (análisis HRM) es el análisis cuantitativo de las curvas de fusión de los fragmentos de ADN del producto después de la amplificación por PCR	Cuantitativa continua	Secuencia de nucleótidos Temperatura
Exones	una región del genoma que finaliza con una molécula de ARNm.	Cuantitativa continua	Amplificación de los exones que lo flanquean
Secuenciación tipo Sanger	el ADN blanco es copiado muchas veces y se hacen fragmentos de	Cuantitativa continua	Secuencia de nucleótidos

	diferentes longitudes. Nucleótidos fluorescentes que actúan como "terminadores de cadena" marcan los extremos de los fragmentos y permiten la determinación de la secuencia.		
Temperatura	El grado Celsius representa una unidad de medida de la temperatura que hace coincidir el punto de fusión del agua a presión del nivel del mar con su cero (0 grados Celsius) y su punto de ebullición con el valor de 100 grados Celsius. Se expresa con el símbolo "°C".	Cuantitativa continua	Grados Celsius

Resultados

Manifestación clínica	Presente/Ausente
Hitos motores retrasados	✓
Hipotonía	✓
Debilidad muscular proximal	✓
Contracturas articulares distales (Codos, tendón de Aquiles, interfalángicas)	✓
Progresión lenta	✓
Dificultad para la deambulaci3n, subir escaleras	✓
Cifoescoliosis	X
LCC	X
Afecci3n respiratoria	X
Alteraciones dermatol3gicas (Eritema facial, cicatrices hipertr3ficas o queloides, hiperqueratosis folicular)	✓

Tabla 5. Manifestaciones clínicas y edad de inicio en la paciente.

Fotografías clínicas



Figura 6a. Fotografías clínicas. Tomadas previo consentimiento y asentimiento informado de la paciente y su madre.

Estudios de imagen



Figura 7. Serie ósea completa.

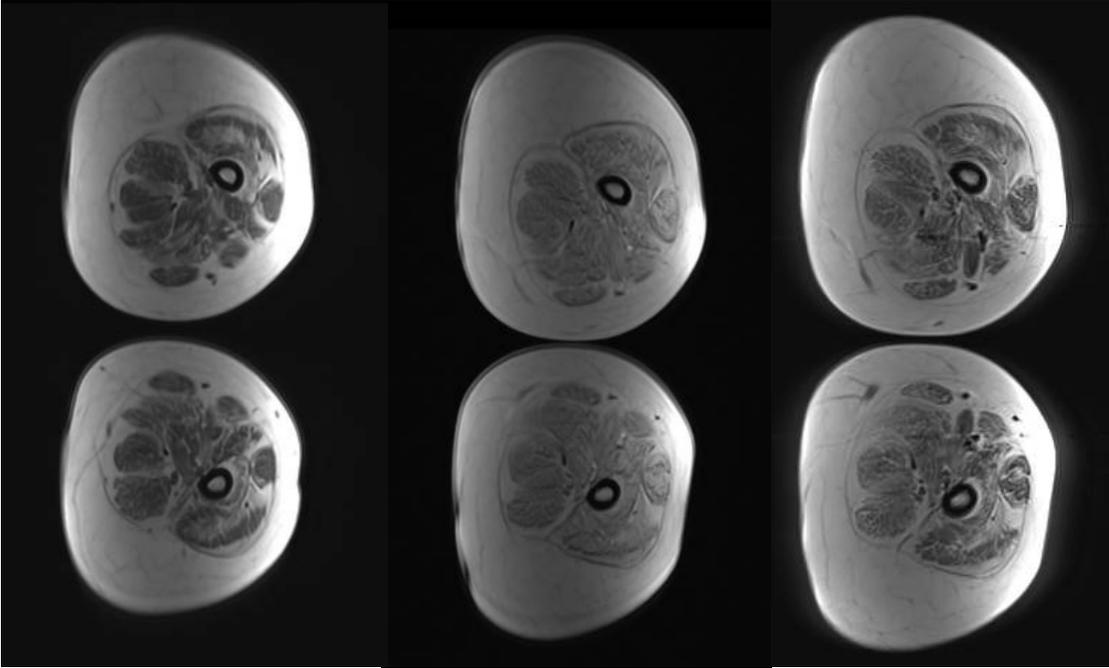


Figura 8. Imágenes de IRM de musculo.

Resultados de secuenciación de panel de alteraciones neuromusculares.

AMENDED REPORT

This report supersedes RQ2376955 (07.09.2021), includes new information from family studies and updates the interpretation of previously reported variant(s).

- Testing was performed on submitted parental samples and showed that neither parent carries the COL6A2 variant. This variant most likely occurred de novo. When considering familial testing, please note that germline mosaicism in one of the parents cannot be excluded.

Updated Interpretations

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	PRIOR VARIANT CLASSIFICATION	NEW VARIANT CLASSIFICATION
COL6A2	c.901-6_903del (Splice site)	heterozygous	Likely Pathogenic	PATHOGENIC



RESULT: POSITIVE

One Pathogenic variant identified in COL6A2. COL6A2 is associated with a spectrum of autosomal dominant and recessive collagenopathies.

Additional Variant(s) of Uncertain Significance identified.

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION
COL6A2	c.901-6_903del (Splice site)	heterozygous	PATHOGENIC
DYSF	c.3296A>G (p.Glu1099Gly)	heterozygous	Uncertain Significance
NEB	c.10080G>T (p.Trp3360Cys)	heterozygous	Uncertain Significance
NEB	c.25112T>C (p.Val8371Ala)	heterozygous	Uncertain Significance

Figura 9. Resultado de secuenciación de segunda generación.

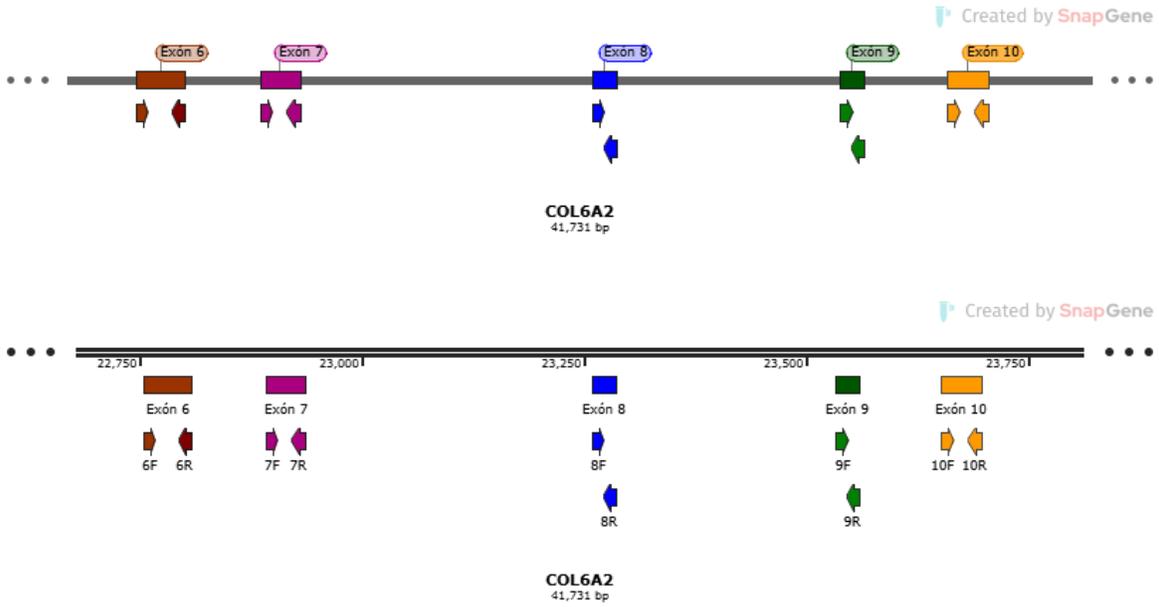


Figura 10. Diseño de la estructura del gen.

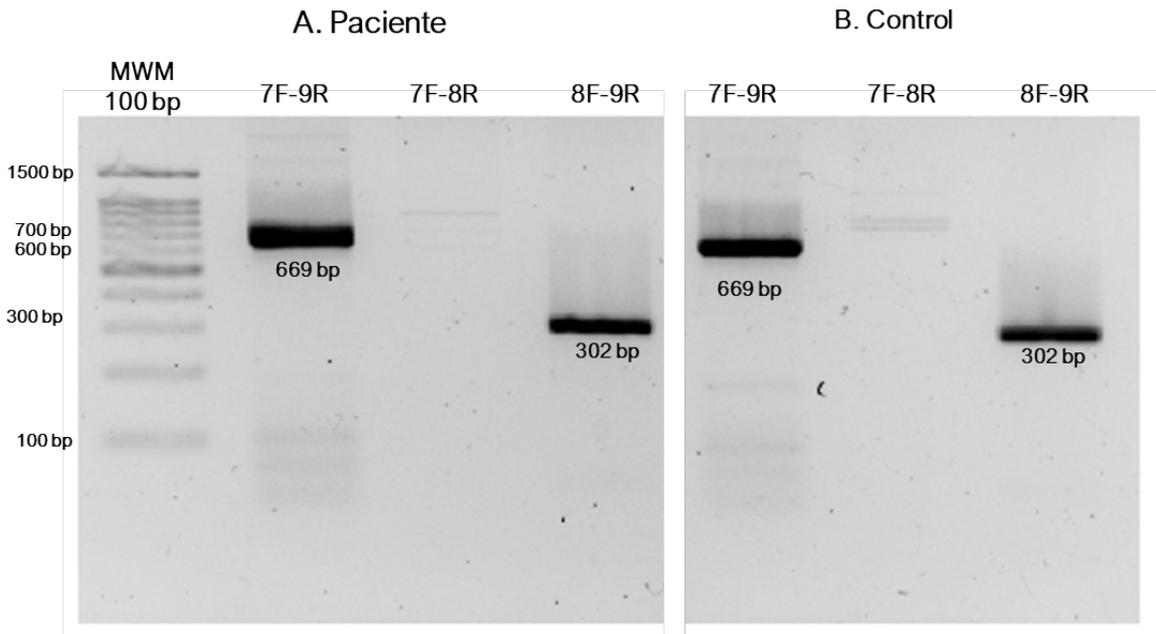


Figura 11. Gel de agarosa al 3% con gDNA de COL6A2, A. Paciente, B. Control, en ambas: 7F-9R, 7F-8R, 8F-9R.

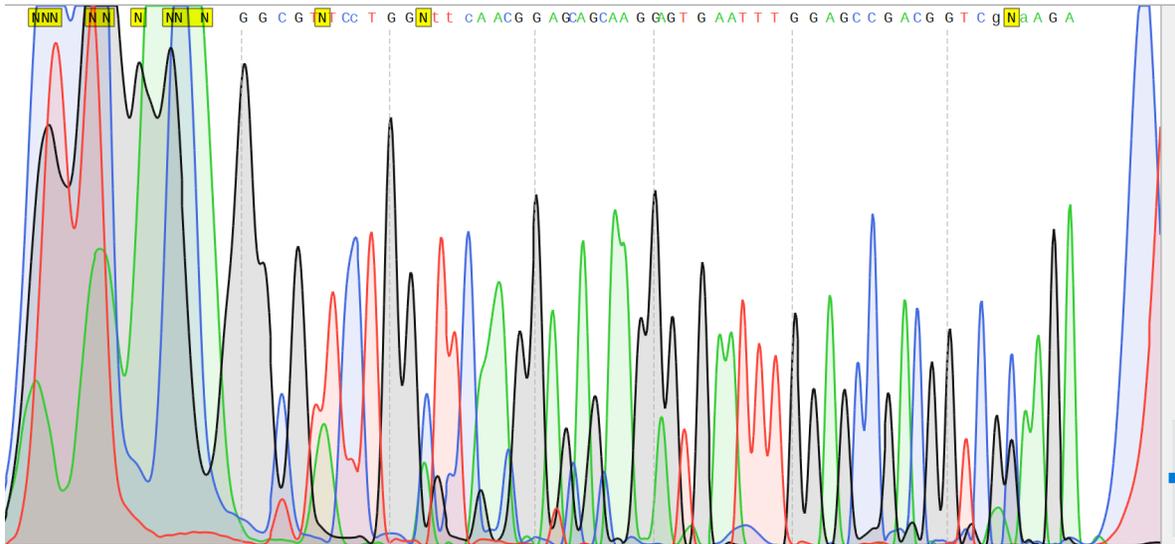


Figura 14. Electroferograma de secuenciación tipo Sanger del cDNA de COL6A2. 7F



Figura 15. Alineamiento de la secuenciación tipo Sanger del cDNA de COL6A2.

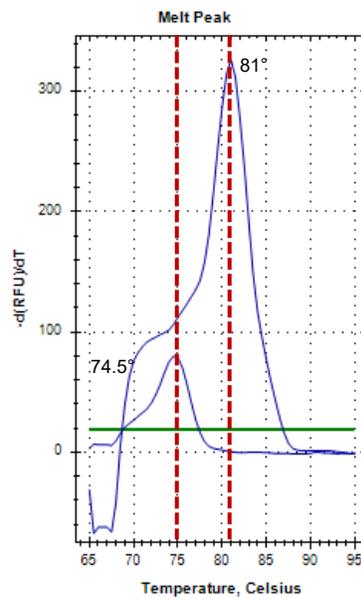


Figura 16. Amplificación de cDNA, dónde se observan las diferencias en el tamaño de las curvas entre cDNA de la paciente y un control sano.

Discusión

De acuerdo con Bönneman y colaboradores, en la distrofia muscular de Bethlem los síntomas suelen ser más leves. Los pacientes cuentan con antecedente de hipotonía, deformidades en los pies y torticollis. Aunque la gran mayoría de las contracturas suelen resolverse en los primeros 2 años, para la primera década de la vida y adolescencia la contractura del tendón de Aquiles y codos suelen hacerse evidentes junto con la afección de la columna vertebral con rigidez. En extremidades superiores, las contracturas de los flexores largos de los dedos impiden la extensión completa del dedo y con el paso del tiempo los pacientes presentaran debilidad muscular proximal así como enfermedad pulmonar restrictiva que podría resultar en insuficiencia respiratoria, sobre todo si hay asociación con apnea obstructiva del sueño (Bönnemann, 2011b).

En el caso de nuestra paciente, la exploración física (Figura 1), revelo una cara con mejillas sonrojadas, extremidades superiores con hiperlaxitud distal, pliegues palmares ausentes, camptodactilia del 5to dedo en mano izquierda y dificultad para la flexión y extensión. En extremidades inferiores la presencia de cicatriz de Zetoplastia del tendón de Aquiles, metatarsos prominentes, braquidactilia y primer dedo más ancho, acompañado de dificultad para la deambulación, datos que coinciden con lo reportado a nivel internacional (Fan et al., 2018b).

Nuestra paciente también presentó alteraciones en la piel, con cicatrización queloide en codo izquierdo y queratosis folicular en extremidades superiores como lo descrito por Fan Y et al (Fan et al., 2018b).

A nivel esquelético, como lo reportado por Mohassel y colaboradores, nuestra paciente presentó una ligera escoliosis con convexidad a la derecha en las vértebras torácicas (Figura 6). La escoliosis es un hallazgo que suele hacerse más evidente con el paso del tiempo en los pacientes con distrofia muscular de Bethlem (Mohassel et al., 2018)

De acuerdo con Mercuri y colaboradores quienes sugirieron que de manera inicial a pacientes en quienes se tenga sospecha clínica de distrofia muscular por alteraciones en el colágeno tipo VI, se incluye la Resonancia magnética muscular ya que se podrían encontrar algunos datos sugestivos. Dentro de este estudio, se recomienda incluir a los músculos vasto lateral y femoral, con afectación en la periferia del musculo y preservación relativa de la parte central. En el caso de nuestra paciente, las imágenes de resonancia magnética muscular, coinciden con los hallazgos reportados ya que se logra observar preservación relativa de la parte central y los patrones descritos (Figura 7) (Mercuri et al., 2005, 2010).

El resultado de la secuenciación inicial de segunda generación de un panel de alteraciones neuromusculares, reporto una variante probablemente patogénica, que de acuerdo con los estándares publicados por el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica en el 2020 y posterior a realizar estudios de segregación en ambos padres se reclasifico por el laboratorio y se reportó como patogénica, el resto de variantes continúan como de significado incierto ya que dos de ellas fueron reportadas en la madre y una en el padre, lo que hace menos probable que participen en el fenotipo de la paciente(Richards et al., 2015b).

La variante reportada se ubica en el gen *COL6A2* c.901-6_903del, es decir, se eliminaron 9 pares de bases. Los nucleótidos deletados incluyen a los ocho últimos del intrón 7 y el primero del exón 8, afectando presuntivamente el sitio de empalme (Figura 8, Anexo B, C y D).

Según Baralle y colaboradores, las variantes en sitios de splicing o empalme pueden ser difíciles de detectar y pueden tener como efectos alteraciones en el procesamiento de corte y empalme del mRNA precursor o pre RNA. Los efectos de este tipo de variantes pueden ser una omisión completa del exón, retención del intrón o introducción de un nuevo sitio de empalme dentro de un exón o intrón (Baralle & Baralle, 2005).

Por el tipo de variante encontrada en nuestra paciente y a que presuntivamente afectaba al exón 8, decidimos diseñar 5 pares de primers dos exones antes y dos

exones después, es decir para el exón 6, 7 8, 9 y 10, todos en dirección forward (F) y reverse (R) (Figura 9).

Nuestra paciente no mostro diferencias aparentes en el tamaño de las banda correspondiente a la amplificación del exón 8, al ser comparada con un control sano (Figura 10), esto podría ser explicado ya que el tamaño de bases que se perdieron en la paciente es muy pequeño, para poder ser visualizado mediante esta técnica (P. Y. Lee et al., 2012).

La secuenciación tipo Sanger, logro detectar la pérdida de exones al final del intrón 7 (Figura 12), sin embargo, no muestra la pérdida esperada según los hallazgos de la secuenciación de segunda generación. Esto puede explicarse por qué en realidad los nucleótidos perdidos no fueron amplificados ni detectados mediante la secuenciación Sanger, hecho que hace menos posible a que se deba a que durante la amplificación la Polimerasa utilizada pierda fidelidad al tratarse de una región ubicada al final del intrón (Gargis et al., 2014; Hjelm et al., 2010).

Posterior a comparar mediante el alineamiento del DNA genómico de la secuencia consenso de *COL6A2* con la secuenciación en dirección 7F y 9R, se pudo corroborar que en el primer nucleótido del exón 8 se mantiene entre la secuencia consenso y la secuenciación en dirección 7F; sin embargo, en la dirección 9F no se identificó ningún nucleótido, recordemos que la deleción de nuestra paciente abarca el primer nucleótido del exón 8 y los 8 previos del intrón 7 y la secuencia eliminada abarca 9 nucleótidos: GCCCCCAGG.

A diferencia del los resultados obtenidos en la secuenciación del DNA genómico (gDNA), el RNA mensajero o cDNA si logró detectar la deleción, lo que reafirma que existe una mayor cantidad de mRNA WT respecto a los que tienen la variante (Figura 13), esto se puede explicar ya que nuestra paciente tiene la variante en estado heterocigoto, es decir que solo uno de sus alelos muestra la variante (Alelo afectado), pero el otro alelo no presenta dicha variante (Alelo *wild-type*, WT) (Morlan et al., 2009).

Por lo anterior, recurrimos a otra técnica que nos permitiera observar el efecto de la variante tanto en el alelo afectado como en el WT, así los histogramas que encontramos mediante esta técnica tanto en la paciente como en el control sano, nos confirmaron que el cambio en la curva de melting, medido a través del punto más alto al cual inicio la amplificación, medida en grados Celsius, razón por la cual se eligió este método ya que es más sensible para detectar cambios a partir de un solo nucleótido (Figura 15) (Moncada & Pancrazzi, 2022).

Conclusión

Clínicamente, la paciente mostraba los datos reportados por otros autores, para distrofia muscular de Bethlem como lo son: Lograr la deambulaci3n en la adolescencia, aunque requiere ayuda y fue sometida a una Zetoplastia del Tend3n de Aquiles y fasciotomía plantar bilateral. En cuanto a su funci3n respiratoria, a pesar de tener disnea leve en decúbito supino, no ha requerido uso de ventilaci3n mecánica no invasiva. En nuestra instituci3n no se realiz3 biopsia muscular, pero contaba con una Biopsia fuera de esta Instituci3n la cual reporto solo cambios morfol3gicos compatibles con daño miopático. Los niveles de CK no son específcos para este tipo de colagenopatías y nuestra paciente contaba con niveles normales. Esto confirma la importancia de la sospecha clínica para poder dirigir el diagnóstico molecular, el cual fue positivo en nuestra paciente.

En cuanto al análisis de los efectos de la variante en el RNA mensajero del gen *COL6A2*, podemos concluir que para este tipo de variantes en estado heterocigoto, existen otras herramientas que pueden ser más sensibles que la secuenciación tipo Sanger, como lo es el HRM, la cual es rápida y de bajo costo y nos permitió detectar cambios en la curva de melting entre el paciente y el control, debido a que este ensayo es más sensible para detectar cambios desde un solo nucleótido, ese cambio en la curva podría explicarse debido a la deleción que presenta nuestra paciente.

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que aparentemente no se afecta el sitio de corte y empalme debido al tamaño pequeño de la deleción y a que es una variante en estado heterocigoto, por lo que el alelo WT sea probablemente el que vemos en la secuenciación tipo Sanger.

No encontramos resultados que concuerden con alteraciones como salto del ex3n o retenci3n de intrones ya que los tamaños de las bandas observadas tanto en el paciente como en el control son del mismo tamaño.

Perspectivas

Evaluar la proteína *COL6A2* *in vitro* e *in silico*, para analizar si existe una menor cantidad de proteína a nivel global o la proteína que existe no es funcional.

Cronograma de actividades

Actividad	Periodo					
	Marzo-abril 2022	Mayo-junio 2022	Julio-agosto 2022	Septiembre-octubre 2022	Octubre-diciembre 2022	Enero-abril 2023
<i>Realización de historia clínica y toma de fotografías clínicas.</i>	✓					
<i>Presentación de caso clínico y selección de este</i>	✓					
<i>Diseño del protocolo</i>		✓				
<i>Elaboración de consentimientos informados</i>		✓				
<i>Obtención de muestras sanguíneas</i>			✓			
<i>Extracción de DNA y RNA</i>			✓			
<i>Realización de PCR y geles de agarosa.</i>				✓		
<i>Realización de Sanger y HRM</i>				✓		
<i>Redacción de tesis</i>					✓	✓

Limitaciones del estudio

Debido a que es la única paciente con este tipo de variante y a que se trata de una variante no reportada previamente, esto hace que la población de estudio sea muy pequeña.

Como técnicamente no logramos separar los alelos WT de los afectados, no logramos validar la variante encontrada por NGS mediante secuenciación tipo Sanger.

Realizar estas técnicas en DNA y RNA obtenido de tejido muscular sería importante para analizar los cambios observados en sangre periférica; sin embargo, obtener muestras de biopsias musculares de la paciente es complicado, por lo tanto, no pudimos estudiar directamente la proteína.

Referencias

- Aguti, S., Marrosu, E., Muntoni, F., & Zhou, H. (2020). Gapmer antisense oligonucleotides to selectively suppress the mutant allele in COL6A genes in dominant ullrich congenital muscular dystrophy. *Methods in Molecular Biology*, 2176, 221–230. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0771-8_16/FIGURES/2
- Allamand, V., Briñas, L., Richard, P., Stojkovic, T., Quijano-Roy, S., & Bonne, G. (2011). ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skeletal Muscle*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-30>
- Angelini, C. (2020). LGMD. Identification, description and classification. *Acta Myologica : Myopathies and Cardiomyopathies : Official Journal of the Mediterranean Society of Myology*, 39(4), 207–217. <https://doi.org/10.36185/2532-1900-024>
- Baralle, D., & Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics*, 42(10), 737–748. <https://doi.org/10.1136/JMG.2004.029538>
- Bethlem, J., & Wijngaarden, G. K. V. (1976). Benign myopathy, with autosomal dominant inheritance. A report on three pedigrees. *Brain : A Journal of Neurology*, 99(1), 91–100. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/99.1.91>
- Bönnemann, C. G. (2011a). The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nature Reviews. Neurology*, 7(7), 379–390. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2011.81>
- Bönnemann, C. G. (2011b). The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nature Reviews. Neurology*, 7(7), 379–390. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2011.81>
- Bönnemann, C. G., Wang, C. H., Quijano-Roy, S., Deconinck, N., Bertini, E., Ferreiro, A., Muntoni, F., Sewry, C., Bérout, C., Mathews, K. D., Moore, S. A., Bellini, J., Rutkowski, A., & North, K. N. (2014). Diagnostic approach to the

congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 24(4), 289–311. <https://doi.org/10.1016/J.NMD.2013.12.011>

Borch, J. d. S., Krag, T., Holm-Yildiz, S. D., Cetin, H., Solheim, T. A., Fornander, F., Straub, V., Duno, M., & Vissing, J. (2022). Three novel FHL1 variants cause a mild phenotype of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Human Mutation*, 43(9), 1234–1238. <https://doi.org/10.1002/HUMU.24415>

Caldú-Agud, R., alfaro-Torres, J., rodríguez-Valle, A., & Capablo-Liesa, J. L. (2020). [Bethlem myopathy: when the phenotype is misleading]. *Revista de Neurologia*, 71(6), 234–235. <https://doi.org/10.33588/RN.7106.2020128>

Di Martino, A., Cescon, M., D'Agostino, C., Schilardi, F., Sabatelli, P., Merlini, L., & Faldini, C. (2023). Collagen VI in the Musculoskeletal System. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5095. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065095>

Fan, Y., Liu, A., Wei, C., Yang, H., Chang, X., Wang, S., Yuan, Y., Bonnemann, C., Wu, Q., Wu, X., & Xiong, H. (2018a). Genetic and clinical findings in a Chinese cohort of patients with collagen VI-related myopathies. *Clinical Genetics*, 93(6), 1159–1171. <https://doi.org/10.1111/CGE.13230>

Fan, Y., Liu, A., Wei, C., Yang, H., Chang, X., Wang, S., Yuan, Y., Bonnemann, C., Wu, Q., Wu, X., & Xiong, H. (2018b). Genetic and clinical findings in a Chinese cohort of patients with collagen VI-related myopathies. *Clinical Genetics*, 93(6), 1159–1171. <https://doi.org/10.1111/CGE.13230>

Foley, A. R., Mohassel, P., Donkervoort, S., Bolduc, V., & Bönnemann, C. G. (2021). Collagen VI-Related Dystrophies. *GeneReviews®*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1503/>

Foley, A. R., Quijano-Roy, S., Collins, J., Straub, V., McCallum, M., Deconinck, N., Mercuri, E., Pane, M., D'Amico, A., Bertini, E., North, K., Ryan, M. M., Richard, P., Allamand, V., Hicks, D., Lamandé, S., Hu, Y., Gualandi, F., Auh, S., ... Bönnemann, C. G. (2013). Natural history of pulmonary function in collagen VI-related myopathies. *Brain*, 136(12), 3625.

<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWT284>

Forsting, J., Rohm, M., Froeling, M., Güttches, A. K., Südkamp, N., Roos, A., Vorgerd, M., Schlaffke, L., & Rehm, R. (2022). Quantitative muscle MRI captures early muscle degeneration in calpainopathy. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-23972-6>

Ganassi, M., & Zammit, P. S. (2022). Involvement of muscle satellite cell dysfunction in neuromuscular disorders: Expanding the portfolio of satellite cellopathies. *European Journal of Translational Myology*, 32(1). <https://doi.org/10.4081/EJTM.2022.10064>

Gargis, A. S., Kalman, L., & Lubin, I. M. (2014). Assay Validation. *Clinical Genomics*, 363–376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00021-6>

Gualandi, F., Urciuolo, A., Martoni, E., Sabatelli, P., Squarzoni, S., Bovolenta, M., Messina, S., Mercuri, E., Franchella, A., Ferlini, A., Bonaldo, P., & Merlini, L. (2009). Autosomal recessive Bethlem myopathy. *Neurology*, 73(22), 1883–1891. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3181C3FD2A>

Halperin, R. F., Hegde, A., Lang, J. D., Raupach, E. A., Narayanan, V., Huentelman, M., Belnap, N., Aziz, A. M., Ramsey, K., Legendre, C., Liang, W. S., LoRusso, P. M., Sekulic, A., Sosman, J. A., Trent, J. M., Rangasamy, S., Pirrotte, P., & Schork, N. J. (2021). Improved methods for RNAseq-based alternative splicing analysis. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89938-2>

Heller, S. A., Shih, R., Kalra, R., & Kang, P. B. (2020). Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, 61(4), 436–448. <https://doi.org/10.1002/MUS.26782>

Hjelm, L. N., Chin, E. L. H., Hegde, M. R., Coffee, B. W., & Bean, L. J. H. (2010). A Simple Method to Confirm and Size Deletion, Duplication, and Insertion Mutations Detected by Sequence Analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 12(5), 607. <https://doi.org/10.2353/JMOLDX.2010.100011>

- Idoux, R., Bretaud, S., Berthier, C., Jacquemond, V., Ruggiero, F., & Allard, B. (2019). Étude physiopathologique de la myopathie de Bethlem à l'aide d'un modèle de poisson zèbre - 16es JSFM : Prix Master 2018. *Médecine/Sciences*, 35, 39–42. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2019182>
- Klewer, S. E., Krob, S. L., Kolker, S. J., & Kitten, G. T. (n.d.). *Expression of Type VI Collagen in the Developing Mouse Heart*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199803\)211:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199803)211:3)
- Lampe, A. K., & Bushby, K. M. D. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *Journal of Medical Genetics*, 42(9), 673–685. <https://doi.org/10.1136/JMG.2002.002311>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 62, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lee, S. S., Hinds, B., Sprague, J., Barrio, V. R., & Mancuso, J. B. (2022). Atypical keratosis pilaris-like lesions in a patient with Bethlem myopathy. *Pediatric Dermatology*, 39(2), 309–311. <https://doi.org/10.1111/PDE.14862>
- Martino, A. Di, Cescon, M., D'Agostino, C., Schilardi, F., Sabatelli, P., Merlini, L., & Faldini, C. (2023). Collagen VI in the Musculoskeletal System. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5095. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065095>
- Meehan, T. F., Conte, N., West, D. B., Jacobsen, J. O., Mason, J., Warren, J., Chen, C. K., Tudose, I., Relac, M., Matthews, P., Karp, N., Santos, L., Fiegel, T., Ring, N., Westerberg, H., Greenaway, S., Sneddon, D., Morgan, H., Codner, G. F., ... Smedley, D. (2017). Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nature Genetics*, 49(8), 1231–1238. <https://doi.org/10.1038/NG.3901>
- Mercuri, E., Clements, E., Offiah, A., Pichiecchio, A., Vasco, G., Bianco, F., Berardinelli, A., Manzur, A., Pane, M., Messina, S., Gualandi, F., Ricci, E., Rutherford, M., & Muntoni, F. (2010). Muscle magnetic resonance imaging

- involvement in muscular dystrophies with rigidity of the spine. *Annals of Neurology*, 67(2), 201–208. <https://doi.org/10.1002/ANA.21846>
- Mercuri, E., Lampe, A., Allsop, J., Knight, R., Pane, M., Kinali, M., Bonnemann, C., Flanigan, K., Lapini, I., Bushby, K., Pepe, G., & Muntoni, F. (2005). Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 15(4), 303–310. <https://doi.org/10.1016/J.NMD.2005.01.004>
- Merlini, L., Morandi, L., Granata, C., & Ballestrazzi, A. (1994). Bethlem myopathy: early-onset benign autosomal dominant myopathy with contractures. Description of two new families. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 4(5–6), 503–511. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0960-8966(94)90091-4)
- Mohassel, P., Reghan Foley, A., & Bonnemann, C. G. (2018). Extracellular matrix-driven congenital muscular dystrophies. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, 71–72, 188–204. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2018.06.005>
- Moncada, A., & Pancrazzi, A. (2022). Lab tests for MPN. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 366, 187–220. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.02.010>
- Morlan, J., Baker, J., & Sinicropi, D. (2009). Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method. *PLOS ONE*, 4(2), e4584. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0004584>
- Nihei, K., Kamoshita, S., & Atsumi, T. (1979). A case of Ullrich's disease (Kongenitale, Atonisch-Sklerotische Muskeldystrophie). *Brain & Development*, 1(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(79\)80036-4](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(79)80036-4)
- Norwood, F. L. M., Harling, C., Chinnery, P. F., Eagle, M., Bushby, K., & Straub, V. (2009). Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain : A Journal of Neurology*, 132(Pt 11), 3175–3186. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWP236>

- Oates, E. C., Jones, K. J., Donkervoort, S., Charlton, A., Brammah, S., Smith, J. E., Ware, J. S., Yau, K. S., Swanson, L. C., Whiffin, N., Peduto, A. J., Bournazos, A., Waddell, L. B., Farrar, M. A., Sampaio, H. A., Teoh, H. L., Lamont, P. J., Mowat, D., Fitzsimons, R. B., ... Laing, N. G. (2018). Congenital Titinopathy: Comprehensive characterization and pathogenic insights. *Annals of Neurology*, *83*(6), 1105–1124. <https://doi.org/10.1002/ANA.25241>
- Okada, M., Kawahara, G., Noguchi, S., Sugie, K., Murayama, K., Nonaka, I., Hayashi, Y. K., & Nishino, I. (2007). Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology*, *69*(10), 1035–1042. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000271387.10404.4E>
- Panadés-de Oliveira, L., Rodríguez-López, C., Cantero Montenegro, D., Marcos Toledano, M. del M., Fernández-Marmiesse, A., Esteban Pérez, J., Hernández Lain, A., & Domínguez-González, C. (2019). Bethlem myopathy: a series of 16 patients and description of seven new associated mutations. *Journal of Neurology*, *266*(4), 934–941. <https://doi.org/10.1007/S00415-019-09217-Z>
- Peat, R. A., Smith, J. M., Compton, A. G., Baker, N. L., Pace, R. A., Burkin, D. J., Kaufman, S. J., Lamandé, S. R., & North, K. N. (2008). Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology*, *71*(5), 312–321. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000284605.27654.5A>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015a). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* *2015 17:5*, *17*(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015b). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and

Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/GIM.2015.30>

Tohyama, J., Inagaki, M., & Nonaka, I. (1994). Early onset muscular dystrophy with autosomal dominant heredity. Report of a family and CT findings of skeletal muscle. *Brain & Development*, 16(5), 402–406. [https://doi.org/10.1016/0387-7604\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0387-7604(94)90130-9). *Molecular Cell* 76(2), 329-345

Ulé, J., Blencowe, B., (2019). Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017>

Victor, P., De Souza, S., Sgobbi De Souza, P. V., Bortholin, T., Rafael, J., Pinheiro, S., George, F., Naylor, M., Bocca, W., De, V., Pinto, R., Souza, A., & Oliveira, B. (2017). Collagen type VI-related myopathy. *Practical Neurology*, 17(5), 406–407. <https://doi.org/10.1136/PRACTNEUROL-2017-001661>

Xu, B., Meng Y., Yongfeng, J., (2020). RNA structures in alternative splicing and back-splicing. *WIREs RNA*. 12(1), e1626. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/wrna.1626>

Anexos

Anexo A

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se invita a su hijo(a) _____ para que participe en el proyecto de investigación titulado “**Análisis del efecto de la variante nueva c.901-6_903del en el gen COL6A2 en la expresión del mRNA en una paciente con miopatía tipo Bethlem.**”, cuyo objetivo principal es determinar la patogenicidad de la variante mediante estudios funcionales, lo cual podría mejorar el conocimiento actual que se tiene de la enfermedad.

¿Cuáles son los **procedimientos** del estudio?

Si usted acepta que su hijo participe, se le pedirá una muestra de sangre, la cantidad total de sangre extraída para todo el estudio será de aproximadamente 5 ml en un tubo, lo equivalente a una cucharadita. Su hijo puede experimentar molestias similares a un piquete y podría sentir dolor, sin embargo, estas molestias son transitorias y no graves.

¿Para qué se **usarán** las muestras?

Las muestras de su hijo(a) se usarán para los fines de investigación explicados a continuación: Se realizará extracción de DNA y/o RNA, posteriormente se realizará qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa), y otros métodos de biología molecular.

¿Cuáles son los **beneficios** de participar en este estudio?

Los beneficios de este estudio son el mayor conocimiento sobre la patogenicidad de la variante que porta su hijo(a) para ampliar el conocimiento sobre las variantes relacionadas con la miopatía tipo Bethlem. Por su participación en este estudio **NO** recibirá ningún pago o beneficio económico.

¿Cuáles son los posibles **riesgos**, inconvenientes y molestias de participar en este estudio?

Los riesgos de este estudio para su hija consisten en un posible malestar en el momento de obtener la muestra de sangre, formación de hematoma o moretón y dolor.

¿Puedo decidir **participar o dejar** este estudio?

La participación en este estudio es totalmente **voluntaria**. Es de mi conocimiento que seré libre de retirar a mi hijo(a) de esta investigación en el momento que lo

desea, sin que esto afecte o le sea negada la atención necesaria para su tratamiento en esta Institución y que se me entregará una copia de esta hoja de consentimiento.

¿Qué se hará con mis **datos personales?, ¿qué pasará con mi **privacidad y confidencialidad**?**

Al firmar este formulario de consentimiento, acepta que sus datos personales se recopilen y utilicen para los fines descritos en este formulario de consentimiento. Se registrará información personal como su nombre, sexo, edad, peso corporal, altura, raza u origen étnico, datos de contacto e información médica, incluido sus antecedentes médicos y lo que suceda durante el estudio (se obtendrán datos personales sensibles, según se definen en las normas locales). Por varias razones parte de esta información estará disponible para el para las personas que trabajen en la investigación. Estas razones incluyen las siguientes: a) Para asegurarse de que el estudio se está llevando a cabo de manera correcta y precisa. b) Para efectos de pruebas científicas. C) Por motivos relacionados con la publicación de los resultados en una revista médica.

En esta Investigación se tiene un interés legítimo en usar la información relacionada con su salud y atención para estudios de investigación, cuando usted acepta participar en este estudio de investigación. Esto significa que usaremos sus datos obtenidos en el transcurso de un estudio de investigación, de las maneras necesarias para realizar, analizar y publicar el estudio de investigación

El médico del estudio, el personal del hospital y otro personal relacionado con la investigación son las únicas personas que podrán identificarlo personalmente con los datos del estudio. Solo revelarán su identidad si esto es requerido por la ley o por una urgencia médica. Si los resultados del estudio se publican en una revista médica, no se le identificará personalmente y solo se mostrarán los resultados combinados de todos los pacientes del estudio. El médico del estudio/la institución es responsable/administrador de los datos personales del sujeto y será responsable de resguardar los datos de conformidad con las normas locales.

Todas las personas que tengan acceso a sus datos personales deben seguir las reglas de confidencialidad o secreto médico profesional y serán responsables de cuidar su información y usarla adecuadamente. Se les permite compartir sus datos únicamente de forma no identificada o sin nombre, y no se les permite hacer fotocopias ni copias escritas de sus expedientes médicos. Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales, de acuerdo con la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. Tiene el derecho de solicitar un resumen de su información médica por escrito al médico del estudio. Se tomará todas las medidas prácticas para proteger la confidencialidad de su expediente del estudio, al igual que su identidad, al grado que esto sea permitido por las leyes y normas vigentes. Esto significa que sus datos personales no se harán públicos.

Publicaciones

Al finalizar el estudio, es posible que los resultados y los datos del estudio, que no incluirán ningún dato de identificación personal, se publiquen de acuerdo con los requisitos normativos. Aunque la información sobre este estudio, incluidos los resultados, puede publicarse con fines científicos, presentarse o publicarse electrónicamente (por ejemplo, en una base de datos) o presentarse a grupos científicos, su nombre e información personal no se utilizarán y su identidad no se revelará de otro modo.

¿Con quién debo ponerme en contacto en caso de preguntas, inquietudes o quejas?

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 10:00 a 13:00 hrs, al teléfono 55 5228 9917 a la extensión 9157 de lunes a viernes con el Dr. Rodrigo Moreno Salgado, que es el jefe del Departamento de Genética Médica.

Declaración de consentimiento informado

El Participante declara que:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio. Además, he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento.

He tenido la oportunidad de hacer todas preguntas que he tenido y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción y de manera adecuada.

He tenido mucho tiempo para pensar sobre el propósito y los procedimientos del estudio, los posibles riesgos y beneficios del estudio, y los otros tratamientos disponibles para mi problema de salud.

Acepto que mis muestras biológicas y mi información médica se recopilen, utilicen y revelen según se ha descrito en este formulario de consentimiento informado.

Al firmar este formulario de consentimiento, consiento o acepto voluntariamente participar en este estudio de investigación. También estoy dando mi permiso para usar y revelar mis datos personales. No puedo participar en este estudio de investigación sin dar este permiso. Si me niego a dar mi permiso, no se verá afectada la atención médica que de otro modo tengo derecho a recibir. Me entregarán un duplicado de este formulario de consentimiento firmado y fechado para que la conserve.

Por este medio, he decidido participar voluntariamente en este estudio de investigación. Tengo total libertad para dejar de participar en este estudio en cualquier momento y por cualquier motivo; la decisión de dejar de participar no afectará mi atención médica futura. Acepto seguir las instrucciones del médico del estudio y le informaré de inmediato si se presenta algún cambio en mi salud.

Me han confirmado que se me otorgará un original de éste formado

Recolección de material biológico:

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

PÁGINA DE FIRMAS

Nota: Si el sujeto no puede leer ni escribir, pondrá sus huellas dactilares y designará a otra persona que firmará en su nombre en el lugar del sujeto

Yo _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma de la madre/padre o tutor:

Nombre del niño(a):

Número de expediente:

Diagnóstico:

1. Testigo: _____

Fecha: _____

Dirección: _____

Relación con el paciente: _____

—

2. Testigo: _____

Fecha: _____

Dirección:

Relación con el paciente: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante)

He explicado al Sr(a)._____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación en seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión, de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del Investigador: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

CARTA DE ASENTIMIENTO DEL MENOR

Si tú deseas platicar con el doctor del estudio en privado, por favor pídeselo. Este formato puede contener palabras o información que tú no entiendas. Por favor pídele al doctor del estudio o al personal del estudio que te explique cualquier cosa que no entiendas.

A ti se te ha pedido participar en un estudio de investigación que se llama **“Análisis del efecto de la variante nueva c.901-6_903del en el gen COL6A2 en la expresión del mRNA en una paciente con miopatía tipo Bethlem.”** Te han pedido que participes porque tienes una enfermedad la cual es muy poco frecuente y hay muy poca información al respecto. El doctor del estudio te explicará más acerca de esta enfermedad si tuvieras alguna pregunta.

Si decides que deseas participar en este estudio, tu participación consiste en permitirnos analizar una nueva muestra de tu sangre que los médicos te tomar cuando encontraron tu enfermedad.

La decisión de participar en el estudio es para obtener más información respecto a la variante que encontramos en tus resultados previos, para así poder saber si es la causante de las alteraciones musculares que presentas.

Cualquier duda que tengas por favor pregúntale a tu doctor o a tus padres.

Si decides participar en él, es posible que puedas tener molestias o dolor en el sitio de punción o donde te tomaron la sangre o en el sitio de vacunación, si tuvieras alguna molestia por favor dile a tu doctor Si no entiendes algo, por favor pide al doctor que te lo vuelvan a explicar.

Si tú decides que no quieres participar en el estudio, no hay problema, puedes decírselo al doctor. Tú puedes terminar tu participación en el estudio en cualquier momento. Tú recibirás el mismo tratamiento y atención médica del doctor que recibías antes, y no se te tratará de manera diferente.

Si tú firmas abajo con tu nombre, significa que entiendes la información que se te presentó acerca del estudio, que todas tus preguntas fueron contestadas, y que te ofreces como voluntario para participar en este estudio. Puedes hacer preguntas en cualquier momento. Te van a dar una copia de esta hoja para que la conserves. Si tuvieras cualquier pregunta, puedes comunicarte con el Dr. Rodrigo Moreno Salgado al teléfono _____ Ext. _____ de lunes a viernes, de 10:00 a 13:00 hrs.

Nombre o firma del niño

Fecha y hora: _____

Nombre y firma del investigador

Fecha y hora: _____

TESTIGOS

Nombre y firma

Fecha y hora: _____ Relación con el participante _____

Nombre y firma

Fecha y hora: _____ Relación con el participante _____

Anexo B. Reporte completo de secuenciación de la paciente.

AMENDED REPORT

This report supersedes RQ2376955 (07.09.2021), includes new information from family studies and updates the interpretation of previously reported variant(s).

- Testing was performed on submitted parental samples and showed that neither parent carries the COL6A2 variant. This variant most likely occurred de novo. When considering familial testing, please note that germline mosaicism in one of the parents cannot be excluded.

Updated Interpretations

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	PRIOR VARIANT CLASSIFICATION	NEW VARIANT CLASSIFICATION
COL6A2	c.901-6_903del (Splice site)	heterozygous	Likely Pathogenic	PATHOGENIC



RESULT: POSITIVE

One Pathogenic variant identified in COL6A2. COL6A2 is associated with a spectrum of autosomal dominant and recessive collagenopathies.

Additional Variant(s) of Uncertain Significance identified.

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION
COL6A2	c.901-6_903del (Splice site)	heterozygous	PATHOGENIC
DYSF	c.3296A>G (p.Glu1099Gly)	heterozygous	Uncertain Significance
NEB	c.10080G>T (p.Trp3360Cys)	heterozygous	Uncertain Significance
NEB	c.25112T>C (p.Val8371Ala)	heterozygous	Uncertain Significance

About this test

Clinical summary

A Pathogenic variant, c.901-6_903del (Splice site), was identified in COL6A2.

- The COL6A2 gene is associated with autosomal dominant and recessive Bethlem myopathy 1 (BTHLM1) (MedGen UID: 331805) and Ullrich congenital muscular dystrophy 1 (UCMD1) (MedGen UID: 98046), collectively known as type VI collagenopathies (MedGen UID: 468393). Other COL6A2-related disorders have also been reported (OMIM: 120240).
- This result is consistent with a predisposition to, or diagnosis of, autosomal dominant COL6A2-related conditions.
- Type VI collagenopathies represent a clinically and genetically heterogeneous spectrum of disorders generally characterized by muscle weakness and joint contractures (PMID: 20301676, 20976770, 15689448). BTHLM1 tends to be more mild, and is associated with proximal muscle weakness and variable joint contractures (PMID: 16141002). Ankles, elbows, and long finger flexors are the most commonly affected joints (PMID: 10219778). The phenotype associated with UCMD1 is typically toward the more severe end of the spectrum, and is characterized by congenital muscle weakness, proximal joint contractures, and significant hyperlaxity of distal joints (PMID: 9545174, 12011280, 19564581). Age of onset varies from the prenatal period to adulthood, and may be partially dependent on genotype (PMID: 20976770, 19564581).
- Biological relatives have a chance of being at risk for COL6A2-related conditions and should consider testing if clinically appropriate.

A Variant of Uncertain Significance, c.3296A>G (p.Glu1099Gly), was identified in DYSF.

- The DYSF gene is associated with autosomal recessive Miyoshi muscular dystrophy type 1 (MMD1) (MedGen UID: 338128), limb-girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) (MedGen UID: 338149), and distal myopathy with anterior tibial onset (DMAT) (MedGen UID: 335706), collectively known as the dysferlinopathies (MedGen UID: 419874).
- Not all variants present in a gene cause disease. The clinical significance of the variant(s) identified in this gene is uncertain. Until this uncertainty can be resolved, caution should be exercised before using this result to inform clinical management decisions.
- Familial VUS testing is not offered. Testing family members for this variant will not contribute evidence to allow variant reclassification. Details on our VUS Resolution and Family Variant Testing Programs can be found at <https://www.invitae.com/family>.

Two Variants of Uncertain Significance, c.10080G>T (p.Trp3360Cys) and c.25112T>C (p.Val8371Ile), were identified in NEB. These variants are on the same chromosome.

- The NEB gene is associated with autosomal recessive nemaline myopathy 2 (NEM2) (MedGen UID: 342534). Additionally, the NEB gene has preliminary evidence supporting a correlation with autosomal dominant nemaline myopathy (PMID: 30679003).
- Not all variants present in a gene cause disease. The clinical significance of the variant(s) identified in this gene is uncertain. Until this uncertainty can be resolved, caution should be exercised before using this result to inform clinical management decisions.
- Familial VUS testing is not offered. Testing family members for these variants will not contribute evidence to allow variant reclassification. Details on our VUS Resolution and Family Variant Testing Programs can be found at <https://www.invitae.com/family>.

Variant details

COL6A2, Exon 8, c.901-6_903del (Splice site), heterozygous, PATHOGENIC

- This variant results in the deletion of part of exon 8 (c.901-6_903del) of the COL6A2 gene. It is expected to disrupt RNA splicing. Variants that disrupt the donor or acceptor splice site typically lead to a loss of protein function (PMID: 16199547), and loss-of-function variants in COL6A2 are known to be pathogenic (PMID: 19884007, 20976770).
- This variant is not present in population databases (ExAC no frequency).
- This variant has been observed in individual(s) with autosomal dominant COL6A2-related conditions (Invitae). In at least one individual the variant was observed to be de novo.
- Algorithms developed to predict the effect of sequence changes on RNA splicing suggest that this variant may disrupt the consensus splice site.
- For these reasons, this variant has been classified as Pathogenic.

DYSF, Exon 30, c.3296A>G (p.Glu1099Gly), heterozygous, Uncertain Significance

- This sequence change replaces glutamic acid with glycine at codon 1099 of the DYSF protein (p.Glu1099Gly). The glutamic acid residue is moderately conserved and there is a moderate physicochemical difference between glutamic acid and glycine.
- This variant is not present in population databases (ExAC no frequency).
- This variant has not been reported in the literature in individuals with DYSF-related conditions.
- Advanced modeling of protein sequence and biophysical properties (such as structural, functional, and spatial information, amino acid conservation, physicochemical variation, residue mobility, and thermodynamic stability) performed at Invitae indicates that this missense variant is not expected to disrupt DYSF protein function.
- In summary, the available evidence is currently insufficient to determine the role of this variant in disease. Therefore, it has been classified as a Variant of Uncertain Significance.

NEB, Exon 69, c.10080G>T (p.Trp3360Cys), heterozygous, Uncertain Significance

- This sequence change replaces tryptophan with cysteine at codon 3360 of the NEB protein (p.Trp3360Cys). The tryptophan residue is moderately conserved and there is a large physicochemical difference between tryptophan and cysteine.
- This variant is not present in population databases (ExAC no frequency).
- This variant has not been reported in the literature in individuals affected with NEB-related conditions.
- Algorithms developed to predict the effect of missense changes on protein structure and function are either unavailable or do not agree on the potential impact of this missense change (SIFT: "Deleterious"; PolyPhen-2: "Not Available"; Align-GVGD: "Class C0").
- Algorithms developed to predict the effect of sequence changes on RNA splicing suggest that this variant may create or strengthen a splice site.
- In summary, the available evidence is currently insufficient to determine the role of this variant in disease. Therefore, it has been classified as a Variant of Uncertain Significance.

NEB, Exon 179, c.25112T>C (p.Val8371Ala), heterozygous, Uncertain Significance

- This sequence change replaces valine with alanine at codon 8371 of the NEB protein (p.Val8371Ala). The valine residue is weakly conserved and there is a small physicochemical difference between valine and alanine.
- This variant is not present in population databases (ExAC no frequency).
- This variant has not been reported in the literature in individuals affected with NEB-related conditions.
- Algorithms developed to predict the effect of missense changes on protein structure and function are either unavailable or do not agree on the potential impact of this missense change (SIFT: "Deleterious"; PolyPhen-2: "Not Available"; Align-GVGD: "Class C0").
- In summary, the available evidence is currently insufficient to determine the role of this variant in disease. Therefore, it has been classified as a Variant of Uncertain Significance.

Genes analyzed

This table represents a complete list of genes analyzed for this individual, including the relevant gene transcript(s). If more than one transcript is listed for a single gene, variants were reported using the first transcript listed unless otherwise indicated in the report. Results are negative unless otherwise indicated in the report. Benign and Likely Benign variants are not included in this report but are available upon request. An asterisk (*) indicates that this gene has a limitation. Please see the Limitations section for details.

GENE	TRANSCRIPT	GENE	TRANSCRIPT	GENE	TRANSCRIPT
ACTA1	NM_001100.3	DES	NM_001927.3	LARGE1	NM_004737.4
ADSSL1	NM_199165.2	DMD	NM_004006.2	LDB3	NM_001080116.1;NM_001171610.1;NM_007078.3
AGRN	NM_198576.3	DNAJB6	NM_058246.3	LMNA	NM_170707.3
ALG14	NM_144988.3	DNM2	NM_001005360.2	LMOD3	NM_198271.4
ALG2	NM_033087.3	DOK7	NM_173660.4	MAP3K20	NM_016653.2
AMPD1	NM_000036.2	DPAGT1	NM_001382.3	MATR3	NM_199189.2
ANOS	NM_213599.2	DPM1	NM_003859.1	MEGF10	NM_032446.2
ATP2A1	NM_173201.3	DPM2	NM_003863.3	MICU1	NM_006077.3
B3GALNT2	NM_152490.4	DPM3	NM_153741.1	MTM1	NM_000252.2
B4GAT1	NM_006876.2	DYSF	NM_003494.3	MUSK	NM_005592.3
BAG3	NM_004281.3	EMD	NM_000117.2	MYH2	NM_017534.5
BIN1	NM_139343.2	FHL1	NM_001449.4	MYH7	NM_000257.3
CACNA1S	NM_000069.2	FKBP14	NM_017946.3	MYL2	NM_000432.3
CAPN3*	NM_000070.2	FKRP	NM_024301.4	MYO18B	NM_0032608.6
CASQ1	NM_001231.4	FKTN	NM_001079802.1	MYOT	NM_006790.2
CAV3	NM_033337.2	FLNC*	NM_001458.4	MYPN	NM_032578.3
CCDC78	NM_001031737.2	GAA	NM_000152.3	NEB*	NM_001271208.1
CFL2	NM_021914.7	GFPT1	NM_001244710.1	ORAI1	NM_032790.3
CHAT	NM_020549.4	GMPPB	NM_021971.2	PLEC	NM_000445.4;NM_201378.3
CHKB	NM_005198.4	GNE	NM_001128227.2	PNPLA2	NM_020376.3
CHRNA1	NM_000079.3	GOSR2	NM_004287.3	POMGNT1	NM_017739.3
CHRNB1	NM_000747.2	GYG1	NM_004130.3	POMGNT2	NM_032806.5
CHRNA1	NM_000747.2	GYS1	NM_002103.4	POMK	NM_032237.4
CHRNA1	NM_000747.2	HACD1	NM_014241.3	POMT1	NM_007171.3
CHRNA1	NM_000747.2	HNRNPA2B1	NM_031243.2	POMT2	NM_013382.5
CHRNA1	NM_000747.2	HNRNPDL	NM_031372.3	PREPL	NM_006036.4
CHRNA1	NM_000747.2	ISCU	NM_213595.3	PYROXD1	NM_024854.3
CHRNA1	NM_000747.2	ISPD	NM_001101426.3	RAPSN	NM_005055.4
CHRNA1	NM_000747.2	ITGA7	NM_002206.2	RXYLT1	NM_014254.2
CHRNA1	NM_000747.2	KBTBD13	NM_001101362.2	RYR1	NM_000540.2
CHRNA1	NM_000747.2	KCNJ2	NM_000891.2	SCN4A	NM_000334.4
CHRNA1	NM_000747.2	KLHL40	NM_152393.3	SELENON	NM_020451.2
CHRNA1	NM_000747.2	KLHL41	NM_006063.2		

GENE	TRANSCRIPT
SGCD	NM_000337.5
SGCG	NM_000231.2
SLC18A3	NM_003055.2
SLC5A7	NM_021815.2
SMCHD1	NM_015295.2
SMN1	NM_000344.3
SMN2	NM_017411.3
SPEG	NM_005876.4
SQSTM1	NM_003900.4
STAC3	NM_145064.2
STIM1	NM_003156.3
SYT2	NM_177402.4
TAZ	NM_000116.4
TCAP	NM_003673.3
TIA1	NM_022173.2
TK2	NM_004614.4
TNNT1	NM_003283.5
TNPO3	NM_012470.3
TOR1AIP1	NM_001267578.1
TPM2	NM_003289.3
TPM3*	NM_152263.3
TRAPPC11	NM_021942.5
TRIM32	NM_012210.3
TTN*	NM_001267550.2
VAMP1	NM_014231.3
VCP	NM_007126.3
VMA21	NM_001017980.3

Anexo C. Reporte completo de secuenciación del padre.

Reason for testing

Family history

Test performed

Sequence analysis and deletion/duplication testing of the 3 genes listed in the Genes Analyzed section.

REQUESTED VARIANTS

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION	RESULT
DYSF	c.3296A>G (p.Glu1099Gly)	heterozygous	Uncertain Significance	Detected
COL6A2	c.901-6_903del (Splice site)	N/A	Likely Pathogenic	Not detected
NEB	c.25112T>C (p.Val8371Ala)	N/A	Uncertain Significance	Not detected
NEB	c.10080G>T (p.Trp3360Cys)	N/A	Uncertain Significance	Not detected

The table above reflects the information for the requested variant(s) as of the date that this report was issued. Please see the result box for a summary of any reportable findings.



RESULT: NO PATHOGENIC VARIANTS IDENTIFIED

Variant(s) of Uncertain Significance identified.

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION
DYSF	c.3296A>G (p.Glu1099Gly)	heterozygous	Uncertain Significance

About this test

This diagnostic test evaluates 3 gene(s) for variants (genetic changes) that are associated with genetic disorders. Diagnostic genetic testing, when combined with family history and other medical results, may provide information to clarify individual risk, support a clinical diagnosis, and assist with the development of a personalized treatment and management strategy.

Anexo D. Reporte completo de secuenciación de la madre.

Reason for testing

Family history

Test performed

Sequence analysis and deletion/duplication testing of the 3 genes listed in the Genes Analyzed section.

REQUESTED VARIANTS

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION	RESULT
NEB	c.10080G>T (p.Trp3360Cys)	heterozygous	Uncertain Significance	Detected
NEB	c.25112T>C (p.Val8371Ala)	heterozygous	Uncertain Significance	Detected
COL6A2	c.901-6_903del (Splice site)	N/A	Likely Pathogenic	Not detected
DYSF	c.3296A>G (p.Glu1099Gly)	N/A	Uncertain Significance	Not detected

The table above reflects the information for the requested variant(s) as of the date that this report was issued. Please see the result box for a summary of any reportable findings.



RESULT: NO PATHOGENIC VARIANTS IDENTIFIED

Variant(s) of Uncertain Significance identified.

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION
NEB	c.10080G>T (p.Trp3360Cys)	heterozygous	Uncertain Significance
NEB	c.25112T>C (p.Val8371Ala)	heterozygous	Uncertain Significance

About this test

This diagnostic test evaluates 3 gene(s) for variants (genetic changes) that are associated with genetic disorders. Diagnostic genetic testing, when combined with family history and other medical results, may provide information to clarify individual risk, support a clinical diagnosis, and assist with the development of a personalized treatment and management strategy.

ANEXO E. Protocolo para la extracción de DNA a partir de sangre periferica.

Protocol

Reagent Preparation

- ✓ Add 1,040 μl **Proteinase K Storage Buffer** to each **Proteinase K** (20 mg) tube prior to use. The final concentration of **Proteinase K** is ~ 20 mg/ml. Store at -20°C after mixing.

Sample Processing

Resuspend cultured cell or *E. coli* pellets using **DNA Elution Buffer** or an isotonic buffer (e.g. **PBS**). For $< 1 \times 10^6$ cells, resuspend in $100 \mu\text{l}$; For $1-5 \times 10^6$ cells, resuspend in $200 \mu\text{l}$.

Biological Fluids & Cells	Solid Tissues
<ol style="list-style-type: none">1. Add up to $200 \mu\text{l}$¹ sample to a microcentrifuge tube and add: 200 μl BioFluid & Cell Buffer (Red) 20 μl Proteinase K <i>For inputs $< 200 \mu\text{l}$, proportionally decrease BioFluid & Cell Buffer (Red), and Proteinase K.</i>2. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds and then incubate the tube at 55°C for 10 minutes^{2,3}.3. Add <u>1 volume</u> Genomic Binding Buffer to the digested sample. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds. Example: Add 105 μl Genomic Binding Buffer to the 105 μl digested sample.	<ol style="list-style-type: none">1. To tissue samples (≤ 25 mg) in a microcentrifuge tube, add a solution of: 95 μl Water 95 μl Solid Tissue Buffer (Blue) 10 μl Proteinase K2. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds and then incubate the tube at 55°C for 1-3 hours or until tissue solubilizes². Mix thoroughly before proceeding³.3. Add <u>2 volumes</u> Genomic Binding Buffer to the supernatant. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds. Example: Add 400 μl Genomic Binding Buffer to the 200 μl mixture.

4. Transfer the mixture to a **Zymo-Spin™ IIC-XLR Column** in a **Collection Tube**. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute⁴. Discard the flow through and collection tube.

¹ If using $< 50 \mu\text{l}$ sample, increase the volume to $50 \mu\text{l}$ using **DNA Elution Buffer** or an isotonic buffer (e.g. **PBS**) before continuing.

² Overnight digestions are possible without affecting the integrity of the DNA.

³ To remove insoluble debris, centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Transfer aqueous supernatant to a clean microcentrifuge tube. Avoid transferring the lipid layer and pelleted cellular debris.

⁴ If the lysate is still visible on top of the matrix, centrifuge for another minute or until completely cleared.

5. Add 400 μl **DNA Pre-Wash Buffer** to the spin column in a new Collection Tube. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Empty the Collection Tube.
6. Add 700 μl **g-DNA Wash Buffer** to the spin column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Empty the Collection Tube.
7. Add 200 μl **g-DNA Wash Buffer** to the spin column. Centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Discard the Collection Tube with the flow through.
8. Transfer the spin column to a clean microcentrifuge tube. Add $\geq 50 \mu\text{l}$ **DNA Elution Buffer** or water¹ directly on the matrix. Incubate for 5 minutes at room temperature, then centrifuge at maximum speed for 1 minute to elute the DNA². The eluted DNA can be used immediately for molecular based applications or stored $\leq -20^{\circ}\text{C}$ for future use.

ANEXO F. Protocolo para la extracción de RNA a partir de sangre periférica.

(III) Total RNA Purification

- ✓ Perform all steps at room temperature and centrifugation at 10,000-16,000 x g for 30 seconds, unless specified.

1. Transfer the sample lysed in **RNA Lysis Buffer** into a **Spin-Away™ Filter¹ (yellow)** in a **Collection Tube** and centrifuge to remove the majority of genomic DNA.

Save the flow-through!

2. Add 1 volume² ethanol (95-100%) to the flow-through (1:1) and mix well.

Example: Add 300 µl ethanol to 300 µl flow-through.

Then transfer the mixture into a **Zymo-Spin™ IICG Column¹ (green)** in a **Collection Tube** and centrifuge³. Discard the flow-through.

3. **DNase I⁴ treatment** (recommended)
 - (D1) Wash the column with 400 µl **RNA Wash Buffer** and centrifuge. Discard the flow-through.
 - (D2) In a nuclease-free tube, add 5 µl **DNase I** (1 U/µl)*, 75 µl **DNA Digestion Buffer** and mix. Add mixture directly into the column matrix.
 - (D3) Incubate the column at room temperature (20-30°C) for 15 minutes.
4. Add 400 µl **RNA Prep Buffer** to the column and centrifuge. Discard the flow-through.
5. Add 700 µl **RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge. Discard the flow-through.
6. Add 400 µl **RNA Wash Buffer** and centrifuge the column for 1 minute to ensure complete removal of the wash buffer. Then carefully, transfer the column into a nuclease-free tube (not provided).
7. Add 100 µl **DNase/RNase-Free Water** directly to the column matrix and centrifuge.

Alternatively, for highly concentrated RNA use ≥ 50 µl elution.

The eluted RNA⁵ can be used immediately or stored frozen.

1 To process samples > 700 µl, columns may be reloaded.

2 To isolate large RNA species ≥ 200 nt, add 0.5 volume ethanol (95-100%) to the flow-through and mix well.

3 Optional: At this point, proteins can be purified from the flow-through (page 12).

4 Prior to use, reconstitute the lyophilized **DNase I** (Buffer Preparation, page 5). * Unit definition – one unit increases the absorbance of a high molecular weight DNA solution at a rate of 0.001 A₂₆₀ units/ml of reaction mixture at 25°C.

5 For complete removal of PCR (RT) inhibitors from plant, soil and fecal samples, use the OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (D6030).

ANEXO G. Oligonucleótidos diseñados para los exones 6, 7, 8 y 9 del gen COL6A2.

Exón 6

GGTGCCAAGGGCAACATGGGTGAGCCGGGAGAGCCTGGCCAGAAGGGAAG
ACAG

F GGTGCCAAGG
R CTGTCTTCCC

Exón 7

GGAGACCCGGGCATCGAAGGCCCCATTGGATTCCCAGGACCCAAG

F GGAGACCCGGGCATC
R CTTGGGTCCT

Exón 8

GGCGTTCCTGGCTTCAAAGGAGAGAAG

F GGCGTTCCTG
R CTTCTCTCCT

Exón 9

GGTGAATTTGGAGCCGACGGTCGCAAG

F GGTGAATTTG
R CTTGCGACCGTCGGC

Exón 10

GGGGCCCCTGGCCTGGCTGGCAAGAACGGGACCGATGGACAGAAG

F GGGGCCCTG
R CTTCTGTCCA

ANEXO H. Nucleótidos de la región del exón 7.

361 cgctgagctg gcgctacggc ggcctgcact tctctgacca ggtggaggtg ttcagcccac
421 cgggcagcga ccgggcctcc ttcacatcaaga acctgcaggg catcagctcc ttccgccgcg
481 gcaccttcac cgactgcgcg ctggccaaca tgacggagca gatccggcag gaccgcagca
541 agggcacctg ccacttcgcc gtggtcatca ccgacggcca cgtcaccggc agcccctgcg
601 ggggcatcaa gctgcaggcc gagcggggccc gcgaggaggg catccggctc ttcgccgtgg
661 cccccaacca gaacctgaag gagcagggcc tgcgggacat cgccagcacg ccgcacgagc
721 tctaccgcaa cgactacgcc accatgctgc ccgactccac cgagatcgac caggacacca
781 tcaaccgcat catcaaggct atgaaacacg aagcctacgg agagtgtctac aaggtgagct
841 gcctggaaat ccctggggccc tctggcccca agggctaccg tggacagaag ggtgccaaagg
901 gcaacatggg tgagccggga gagcctggcc agaaggggaag acagggagac cggggcatcg
961 aaggcccat tggattccca ggaccaagg gcgttcctgg cttcaaagga gagaagggtg
1021 aatttggagc cgacggtcgc aagggggccc ctggcctggc tggcaagaac gggaccgatg
1081 gacagaaggg caagctgggg cgcatcggac ctcctggctg caagggagac cctggaaacc
1141 ggggccccga cggttaccgg ggggaagcag ggagtccagg ggagcgagga gaccaaggcg
1201 gcaaggggga ccctggccgc ccaggacgca gaggggcccc gggagaaatc ggggccaagg
1261 gaagcaaggg gtatcaaggc aacagtggag ccccaggaag tcttgggtgtg aaaggagcca
1321 agggcggggc tgggccccgc ggacccaaag gcgagccggg gcgcagggga gacccccgca
1381 ccaagggcag cccaggcagc gatggcccca agggggagaa gggggaccct ggccctgagg
1441 ggccccgcgg cctggctgga gaggttggca acaaaggagc caagggagac cgaggcttgc
1501 ctggaccagc agggccccag ggagctcttg gggagcccgg aaagcagga tctcggggag
1561 accccggtga tgcaggacc cgtggagact caggacagcc agggcccaag ggagacccc
1621 gcaggcctgg attcagctac ccaggacccc gaggagcacc cggagaaaaa ggcgagccc
1681 gcccacgcgg ccccgagga ggccgaggcg actttggctt gaaaggagaa cctgggagga
1741 aaggagagaa aggagagcct gcggatcctg gtccccctgg tgagccaggc cctcgggggc
1801 caagaggagt cccaggacc gagggtgagc ccggcccccc tggagacccc ggtctcacgg
1861 agtgtgacgt catgacctac gtgagggaga cctgcgggtg ctgcgactgt gagaagcgt
1921 gtggcgcctt ggacgtggtc ttcgtcatcg acagctccga gagcattggg tacaccaact
1981 tcacactgga gaagaacttc gtcacatcaac tggcacaacag gctgggtgcc atcgctaagg
2041 accccaagtc cgagacaggg acgctgtgtg gcgtggtgca gtacagccac gagggcacct
2101 ttgaggccat ccagctggac gacgaacgta tcgactccct gtcgagcttc aaggaggctg
2161 tcaagaacct cgagtggatt gcgggcggca cctggacacc ctcagccctc aagtttgcct