Sociedad Neurológica Argentina
Filial de la Federación Mundial de Neurología

Neurología Argentina

www.elsevier.es/neurolarg



Artículo original

Análisis del espectro mutacional de la distrofia muscular de Duchenne en un grupo de pacientes colombianos

Mary García-Acero[a], *Tatiana Pineda*[b], *Mariana Guerra-Torres*[a], *Reggie García-Robles*[a,c], *Paola Ayala-Ramírez*[a], *Tatiana Buitrago*[c], *Alisson Poveda*[a] y *Fernando Suárez-Obando*[a,d,*]

[a] *Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia*
[b] *Biotecnología y Genética, Biotecgen S. A., Bogotá, Colombia*
[c] *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia*
[d] *Servicio de Genética, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, Colombia*

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:
Recibido el 25 de febrero de 2018
Aceptado el 4 de mayo de 2018
On-line el 8 de junio de 2018

Palabras clave:
Distrofias musculares
Distrofia muscular de Duchenne
Mutación
Análisis de secuencia de ADN
Secuenciación de nucleótidos de alto rendimiento
Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples

R E S U M E N

Introducción: La distrofia muscular de Duchenne (OMIM: 310200, ORPHA: 98896) es una miopatía hereditaria, recesiva, ligada a X. Es el desorden neuromuscular de etiología genética más frecuente, con una incidencia de uno por cada 3.500 hombres y una prevalencia global de 4,78 por cada 100.000 personas.

Métodos: Se llevó a cabo una evaluación clínica de 63 pacientes con distrofia muscular de Duchenne en un centro de referencia de Colombia. Se realizó a todos los sujetos un análisis molecular a través de MLPA y una secuenciación masiva en paralelo.

Resultados: En 47 de los 62 sujetos (75%) se detectaron variantes tipo deleción/duplicación de exones en el gen de la distrofina, mediante MLPA. Se encontraron 33 probandos con deleciones (53,2%) y 14 casos de duplicaciones (22,5%) de uno o más exones. El estudio de secuenciación del gen *DMD* por la técnica de secuenciación masiva en paralelo fue realizado en 15 individuos (24,2%) con MLPA negativo. Se evidenciaron mutaciones sin sentido (nonsense) en 6 casos (9,6%), mutaciones que afectan el marco de lectura en 7 casos (11%) y mutaciones que afectan el splicing en 2 probandos (3,2%). No se encontraron mutaciones missense. Las variantes se distribuyeron a lo largo del gen y se encontraron 5 variantes que no habían sido previamente reportadas, identificadas en 7 individuos.

Conclusiones: El diagnóstico molecular de mutaciones puntuales a través de secuenciación masiva paralela permitió alcanzar de manera eficiente la confirmación diagnóstica, definiendo para los casos negativos para deleción/duplicación, la asesoría adecuada y la implementación de un manejo terapéutico apropiado.

© 2018 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Neurológica Argentina.

* *Autor para correspondencia.*
Correo electrónico: fernando.suarez@javeriana.edu.co (F. Suárez-Obando).

https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2018.05.001
1853-0028/© 2018 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Neurológica Argentina.

Analysis of the mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in a group of Colombian patients

Keywords:
Muscular dystrophies
Muscular dystrophy of Duchenne
Mutation
DNA sequence analysis
High-throughput nucleotide sequencing
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

A B S T R A C T

Introduction: Muscular dystrophy of Duchenne (OMIM: 310200, ORPHA: 98896) is a recessive X-linked primary myopathy. It is the most frequent neuromuscular disorder of genetic etiology, with an incidence of one per 3,500 men and an overall prevalence of 4.78 per 100.000 people.

Methods: A clinical evaluation of 63 patients with Duchenne muscular dystrophy was carried out in a Colombian reference center. We performed all the subjects, molecular analysis through MLPA and massive sequencing in parallel.

Results: In 47 of the 62 subjects (75%), deletion/duplication variants of exons were detected in the dystrophin gene, using MLPA. We found 33 probands with deletions (53.2%) and 14 cases of duplications (22.5%) of one or more exons. The sequencing study of the *DMD* gene by the mass sequencing technique in parallel was performed in 15 individuals (24.2%) with negative MLPA. There were nonsense mutations in 6 cases (9.6%), mutations affecting the reading frame in 7 cases (11%) and mutations affecting splicing in 2 cases (3.2%). No missense mutations were found. The variants were distributed throughout the gene, and five variants were found that had not been previously reported, identified in 7 individuals.

Conclusions: The molecular diagnosis of point mutations through massively parallel sequencing allowed to reach the diagnostic confirmation efficiently, defining for the negative cases for deletion/duplication, the adequate advice and the implementation of appropriate therapeutic management.

© 2018 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Neurológica Argentina.

Introducción

Las miopatías son un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan el músculo; se clasifican en miopatías primarias (distrofias musculares, miopatías congénitas y miopatías metabólicas) y miopatías adquiridas (de origen endocrinológico, metabólico, reumatológico, inflamatorio o secundario al uso de medicamentos)[1]. Las distrofias musculares más frecuentes son las de origen genético y se caracterizan por degeneración y debilitamiento progresivo, principalmente del músculo esquelético[2]. Las mutaciones que originan estos trastornos afectan proteínas de la membrana plasmática, de la matriz extracelular o proteínas de la membrana nuclear, alterando la integridad de la célula y generando ciclos sucesivos de degeneración y regeneración de la fibra muscular, con consecuencias deletéreas, como la atrofia muscular y el posterior reemplazo de la fibra por tejido graso y fibroso[3].

La distrofia muscular de Duchenne (DMD, OMIM: 310200, ORPHA: 98896) es una miopatía hereditaria, recesiva, ligada a X. Es el desorden neuromuscular de etiología genética más frecuente, con una incidencia de uno por cada 3.500 hombres y una prevalencia global de 4,78 por cada 100.000[4,5]. Tiene un espectro de severidad variable, que incluye desde una presentación muy severa, como la DMD, hasta una presentación atenuada, como es el caso de la distrofia muscular de Becker (DMB). La forma severa se caracteriza por un desgaste muscular proximal progresivo, que comienza alrededor de los 3 años de edad y se caracteriza clínicamente por retraso en el desarrollo motor, debilidad proximal, pseudohipertrofia de los gastrocnemios, elevación en los niveles de creatina cinasa (CK) en sangre y cambios miopáticos en la electromiografía. Alrededor de los 12 años de edad, el paciente requiere el uso de silla de ruedas para su movilización. La enfermedad culmina con insuficiencia respiratoria, falla cardiaca y muerte prematura alrededor de los 20 años de edad del sujeto afectado[3,5]. En el caso de la DMB, esta inicia sus manifestaciones entre los 20 y los 30 años de edad, con compromiso leve del músculo esquelético, y su morbilidad más relevante es la falla cardiaca y las arritmias asociadas[6]; las arritmias tienen una amplia variedad de presentación clínica, que incluye: falla cardiaca en el adulto joven, muerte súbita cardiaca o incluso anormalidades subclínicas[7].

El gen causante de la DMD/DMB (Xp21.2) es uno de los más largos del genoma humano (≈2,4 Mb) y está compuesto por 79 exones[8]. El gen *DMD* (Xp21.2-p21.1) codifica la proteína intracelular distrofina, que participa dentro de un complejo de proteínas relacionado con la resistencia al estrés mecánico, generado durante la contracción muscular[9]. Se han descrito diversas formas de mutaciones en el gen *DMD;* entre el 65 y el 70% de los casos se debe a deleciones de uno o más exones, mientras que las duplicaciones comprenden entre el 7 y el 18%. El resto de los casos se deben a mutaciones puntuales[10,11].

Actualmente solo se dispone de manejo paliativo para la DMD, el cual se basa en terapia física, el uso de apoyos ortopédicos y el tratamiento de las complicaciones respiratorias y cardiacas, junto con la administración de glucocorticoides[12]. Algunos estudios clínicos han indicado que los glucocorticoides pueden prolongar la marcha y mejorar la función y la

fortaleza muscular[13,14]. Sin embargo, generan varios efectos adversos, sin modificar la función de la proteína distrofina y, por ende, sin impactar significativamente sobre la etiología de la enfermedad y su pronóstico a largo plazo[14]. En este contexto, han surgido terapias potenciales para la DMD, siendo las más prometedoras los oligonucleótidos antisentido que inducen salto del exón (exon skipping)[15–17] y las terapias de salto de codón de parada temprano originadas en mutaciones sin sentido[18]. De tal modo que ante la especificidad de los tratamientos es necesaria la caracterización molecular de la enfermedad, tanto para la consejería genética como para evaluar el uso de manejo farmacológico[19]. Por otra parte, la caracterización por grupos poblacionales permite establecer prevalencias globales y comparar las frecuencias de variantes genéticas entre grupos humanos[20].

El presente estudio recoge el espectro mutacional de un grupo de pacientes colombianos con diagnóstico de DMD, contribuyendo a la caracterización molecular de la DMD/DMB y ampliando el conocimiento sobre el espectro y las frecuencias de mutaciones de la enfermedad.

Población y métodos

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, de Bogotá D. C. (Colombia) y del Hospital Universitario San Ignacio. Todos los sujetos se sometieron al proceso de consentimiento informado y asentimiento informado de los menores de 18 años.

Población

Se incluyeron 62 sujetos masculinos remitidos al Instituto de Genética Humana (Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana) por sospecha clínica de DMD. Los motivos de sospecha clínica fueron debilidad muscular progresiva, niveles elevados de CK, hipertrofia de gastrocnemios, signo de Gowers positivo, cambios miopáticos en la electromiografía y antecedentes familiares. Después de proveer el consentimiento informado, se extrajo a cada paciente ADN de leucocitos a partir de una muestra de sangre periférica utilizando el método de extracción Salting Out según lo descrito por Miller et al.[21]. Para cada sujeto se realizó análisis por amplificación de sondas por ligación múltiple (MLPA) para deleciones y duplicaciones del gen de la distrofina. En los casos en los que el MLPA no detectó deleciones o duplicaciones, se procedió a realizar la secuenciación del gen.

Análisis por amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples

La técnica de MLPA se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando el kit SALSA MLPA P034 y P035 (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos). El kit SALSA P034 contiene sondas para los exones 1-10, 21-30, 41-50 y 61-70 del gen de la distrofina, mientras que el kit SALSA P035 contiene sondas para los exones 11-20, 31-40, 51-60 y 71-79. Inicialmente, 15 ng de ADN fueron denaturados y durante la noche se hibridaron las sondas de la mezcla P034 y P035. Posteriormente, con la enzima ligasa 65, se llevó a cabo el proceso de ligamiento de las sondas y, finalmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers específicos SALSA FAM PCR primers. Los productos amplificados y el estándar de tamaño se mezclaron y se corrieron en un sistema de análisis genético ABI 3100 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.). El análisis se realizó por medio de Coffalyser.Net software (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos).

Análisis por secuenciación masiva en paralelo

El ADN genómico fue enriquecido para las regiones seleccionadas (coordenadas genómicas ChrX:31 047 266 a 33 139 594 NM_004006, hg19) utilizando un protocolo basado en hibridación, y se secuenció utilizando la tecnología Illumina®. Todas las regiones seleccionadas tenían una profundidad mayor o igual a 50× y un umbral mínimo de confianza de mapeo de Q30. Las lecturas fueron alineadas contra la secuencia de referencia (GRCh37) y los cambios fueron identificados e interpretados en el contexto de un único transcrito clínicamente relevante. Todas las variantes patogénicas y probablemente patogénicas fueron confirmadas por secuenciación de Sanger. La clasificación de las variantes se realizó de acuerdo con los criterios de la ACMG[22] y se utilizaron como referencia las bases de datos Leiden Open Variation Database[23], UMD-DMD[24] y Proyecto 1000 genomas[25]. Para el análisis *in silico* de la patogenicidad de las mutaciones, se aplicaron los algoritmos SIFT[26], PolyPhen-2[27] y Align-GVGD[28,29].

Resultados

Un total de 62 pacientes con sospecha clínica de DMD/DMB fueron confirmados por análisis molecular (MLPA o secuenciación). La edad promedio de valoración de los individuos fue de 9 años, con un rango de 8 meses a 27 años. La edad de comienzo de los síntomas fue menor de 4 años en el 79% de los pacientes. Los síntomas iniciales de la enfermedad fueron: caídas frecuentes, debilidad muscular progresiva, dificultad para levantarse, dificultad para subir escaleras, dolor muscular y retardo del neurodesarrollo asociado a niveles elevados de CK (tabla 1). En el momento del estudio 22 pacientes (35,4%) habían perdido la marcha, el más temprano a la edad de

Tabla 1 – Manifestaciones clínicas de pacientes con distrofia muscular de Duchenne (n = 63)

Manifestación clínica	Individuos afectados (%)
Retardo del desarrollo psicomotor	58,8
Trastorno de la marcha	88
Pérdida de la marcha	41
Contracturas en flexión	47
Escoliosis	39
Apnea del sueño	23
Soporte ventilatorio	17
Dificultad en la alimentación	17
Cardiomiopatía dilatada	23
Trastorno eléctrico	5,8
Compromiso óseo	17
Fracturas patológicas	23

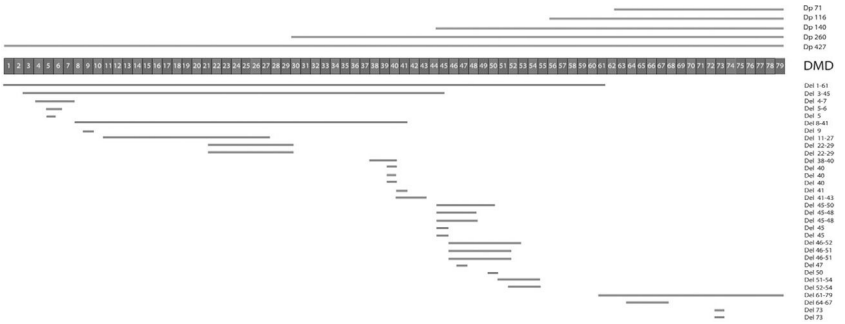


Figura 1 – Deleciones detectadas en los sujetos analizados.
La barra numerada representa el gen de la distrofina con cada uno de sus exones. Se aprecia la distribución de las deleciones detectadas en los pacientes. Las líneas superiores (encima del gen) representan las diversas isoformas del gen. Es evidente que el espectro de las deleciones se extiende a lo largo del gen, sin embargo, se aprecia una mayor frecuencia de estas alrededor de los exones 37 a 55. Las deleciones afectan también dichas isoformas (por ejemplo, isoforma Dp71 afectada por deleciones en exones 62-79) explicando, probablemente, el retardo del desarrollo psicomotor y el déficit cognitivo y que estas manifestaciones no solo se deban, de manera secundaria al déficit propio originado en la alteración muscular.

6 años, con un promedio de pérdida de marcha, para todo el grupo, de 9 años. El compromiso cardiaco (fracción de eyección inferior al 55%) se desarrolló a una edad media de $14 \pm 3{,}1$ años. Ninguno recibió trasplante cardiaco. El 33% de los probandos reportó algún antecedente familiar de enfermedad neuro muscular, lo que incluyó hermanos y primos. En relación con casos familiares, se evaluaron en el estudio 7 parejas de hermanos, un par de primos hermanos de una sola familia y 2 hermanos y un primo de otra familia.

Análisis por MLPA

En 47 de los 62 sujetos (75%) se detectaron variantes tipo deleción/duplicación de exones en el gen de la distrofina, mediante MLPA. Se encontraron 33 probandos con deleciones (53,2%) y 14 casos de duplicaciones (22,5%) de uno o más exones. Se encontraron 5 duplicaciones de un solo nucleótido y 2 deleciones, de uno y 5 nucleótidos. La relación entre duplicación y deleción fue de 0,41 (15/34), siendo las deleciones 2 veces más frecuentes que las duplicaciones, evidenciando que la deleción y la duplicación no son eventos recíprocos.

Las deleciones de un solo exón se presentaron en 12 casos (19%), y las deleciones de más de un exón, en 21 sujetos (33%). Las grandes deleciones (más de 10 exones) se presentaron en 6 casos (9,6%). El 42% de la muestra presenta deleciones grandes entre los exones 45 y 54. De todos los exones, el 47 fue el más frecuentemente suprimido. Se observó un caso que presentó una gran deleción de 61 exones. El 50% de los casos presentó duplicaciones entre los exones 5 y 16. Las duplicaciones de un solo exón se presentaron en 5 casos (8%). Las duplicaciones de menos de 6 exones se representaron en 10 casos (16%). No se encontraron duplicaciones en los exones 67-79. Se encontró un caso de duplicación en tándem (duplicación de los exones 5-22 y 46-52) (figs. 1 y 2).

Secuenciación de probandos con MLPA negativo

El estudio de secuenciación del gen *DMD* por la técnica de secuenciación masiva en paralelo fue realizado en 15 individuos (24,2%) con MLPA negativo. Se evidenciaron mutaciones sin sentido (nonsense) en 6 casos (9,6%), mutaciones que afectan el marco de lectura en 7 casos (11%) y mutaciones que afectan el splicing en 2 probandos (3,2%). No se encontraron mutaciones missense. Las variantes se distribuyeron a lo largo del gen y se encontraron 5 variantes que no habían sido previamente reportadas, identificadas en 7 individuos (tabla 2). La descripción de todas las mutaciones se aprecia en la tabla 3.

Discusión

La DMD es una miopatía de origen genético de herencia recesiva ligada a X, causada por mutaciones en el gen de la distrofina (Xp21.2). Afecta principalmente a los hombres, sin embargo, las mujeres portadoras pueden manifestar debilidad muscular y elevación de niveles de CK[30]. Los pacientes incluidos en el presente análisis fueron exclusivamente hombres. En este estudio, las mutaciones patogénicas en el gen de la distrofina se identificaron en 62 individuos colombianos con sospecha clínica de DMD/DMB: un 53,3% de los casos por deleción, un 22,5% de los casos por duplicación y un 24,2% de los casos con mutación puntual. En 7 de los probandos (11%) se identificaron mutaciones puntuales que no habían sido previamente reportadas.

Un estudio previo realizado en Colombia detectó un porcentaje menor de deleciones (31%), sin embargo, dicho estudio utilizó únicamente PCR múltiple (17 exones y promotor)[31]. Un estudio reciente del espectro mutacional de la DMD en España reportó deleciones en el 46% de los casos[32], mientras que otro estudio en la India reportó deleciones en el 68% de los casos utilizando MLPA[33], similar a lo reportado en Polonia (65%)[34], mientras que en Brasil una cohorte presentó un 58% de deleciones[35]. El menor porcentaje de la serie española puede deberse a un sesgo de selección según los autores[32]. A pesar de la variación de serie a serie, las deleciones son la principal causa de mutación del gen de la DMD/DMB. En general, se considera que las grandes deleciones del gen son responsables de más del 65% de los casos de DMD[36]. Las deleciones no tienen una distribución al azar a lo largo del gen, sino que se agrupan en regiones proclives o hot spots. Alrededor del

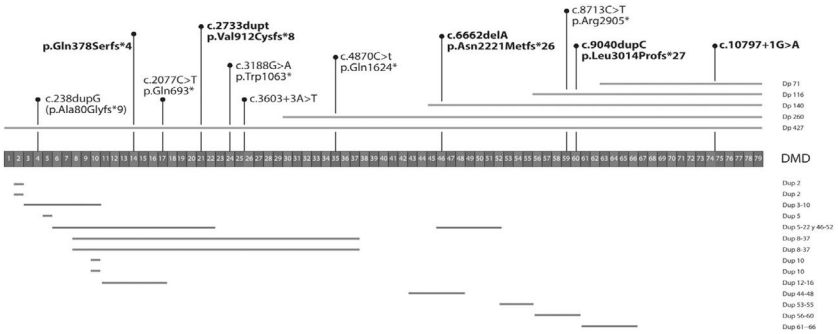


Figura 2 – Duplicaciones y mutaciones puntuales detectadas en los sujetos analizados.
La barra numerada representa el gen de la distrofina con cada uno de sus exones. Se aprecia la distribución de las duplicaciones y mutaciones puntuales detectadas. Las líneas superiores (encima del gen) representan las diversas isoformas del gen. Las mutaciones puntuales en negrita indican las mutaciones que no había sido descritas previamente. El espectro mutacional se extiende a lo largo de todo el gen. Como en el caso de las deleciones, las duplicaciones y las mutaciones puntuales afectan también dichas isoformas, contribuyendo al fenotipo variable que incluye el déficit psicomotor y el déficit cognitivo de algunos de los casos aquí reportados.

Tabla 2 – Resultados de secuenciación de 15 individuos con MLPA (n = 63)

Individuos con el cambio	Exón/intrón	Secuenciación	Cambio de proteína
1	Exón 35	c.4870C>T	Q1624*
1	Exón 59	c.8713C>T	R2905*
2[a]	Exón 24	c.3188G>A	W1063*
2[b]	Exón 17	c.2077C>T	Q693*
3[c]	**Exón 60**	c.9040dupC	L3014Pfs*27
1	**Exón 46**	c.6662delA	N2221Mfs*26
1	**Exón 14**	c.1132_1136del	Q378Sfs*4
1	Exón 4	c.238dupG	A80G*9
1	**Exón 21**	c.2733dupT	V912Cfs*8
1	Intrón 26	c.3603+3A>T	NA
1	**Intrón 75**	c.10797+1G>A	NA

[a] Dos individuos afectados que son hermanos.
[b] Dos individuos afectados que son primos hermanos.
[c] Tres individuos afectados, dos de los cuales son hermanos y el tercero es primo segundo.

80% de las deleciones se concentran entre los exones 44 y 52[37] y alrededor del 20% comprende los exones 1 al 19[38], similar a lo descrito en el presente estudio. Las duplicaciones contribuyen con alrededor del 14% de los casos[39] y entre el 10 y el 30% se deben a pequeñas deleciones o inserciones, mutaciones puntuales o defectos en el splicing[40]. En la base global de mutaciones DMD (TREAT-NMD DMD)[39] se ha identificado que alrededor del 10% de las causas de la enfermedad se deben a mutaciones puntuales; la descripción de mutaciones nuevas como las aquí descritas contribuye a dibujar el espectro mutacional de la enfermedad.

El fenotipo depende de la localización de la mutación en el gen y no necesariamente del tamaño de la deleción o de la duplicación; una deleción que afecte el marco de lectura, independiente del tamaño, produce una mutación severa, mientras que una deleción que no afecte el marco de lectura produce un fenotipo más leve asociado con DMB[4]. Entre los primeros signos para sospechar DMD se incluyen el retraso en la marcha, la marcha inestable y en puntas, la dificultad para subir escaleras, la debilidad muscular progresiva, la pseudohipertrofia de gastrocnemios y la incapacidad para levantarse desde el suelo sin usar los brazos (signo de Gowers)[41]. En la mayoría de los probandos de este estudio se ha descrito el antecedente de retraso en el desarrollo psicomotor, lo que se puede explicar tanto por el componente de déficit muscular como por el posible papel de la distrofina en el desarrollo y la perfusión cerebral y como agente neuroinmunomodulador[42]. Las mutaciones en el gen *DMD* pueden conducir a un largo espectro de fenotipos clínicos que están estrechamente correlacionados con las alteraciones moleculares y con la severidad de la alteración en la función proteica causada por la mutación[43], sin embargo, la correlación fenotipo-genotipo no es directa, en especial los aspectos relacionados con las manifestaciones neurológicas, debido principalmente a las 6 isoformas cerebrales de la distrofina, las cuales juegan un papel relevante en la maduración y el remodelamiento de las sinapsis neuronales[44]. En el presente estudio se logró determinar que en 28 casos (45%) el retraso del desarrollo estaba presente como antecedente, sin embargo, este hallazgo puede ser altamente inespecífico, debido a la diversidad de manejos recibidos (terapias físicas) o manifestaciones sutiles no identificadas previamente. Los signos clínicos descritos en el grupo estudiado forman parte del espectro clínico usualmente reportado, sin embargo, no

Tabla 3 – Descripción molecular y aspectos clínicos principales del grupo de pacientes

Individuo	Exón deletado	Exón duplicado	Mutación	Nomenclatura de proteínas	Isoforma	Edad síntomas (años)	Retraso desarrollo	Pérdida marcha (años)	Soporte ventilatorio	Cardiomiopatía dilatada	Déficit cognitivo
1[a]	73	-	c.10329_10394del	p.R3443Rfs*2	E	2	No	13	No	No	No
2	-	-	c.4870C>T	p.Q1624*	ABCDE	5	No	13	No	Sí	No
3[b]	-	-	c.9040dupC	p.L3014Pfs*27	DE	6	No	9	Sí	No	No
4[b]	-	-	c.9040dupC	p.L3014Pfs*27	DE	6	No	11	Sí	No	No
5	6-7	-	c.358_649del	p.V120Mfs*13	A	5	No	11	No	Sí	No
6[c]	-	-	c.2077C>T	p.Q693*	A	1	No	9	Sí	No	No
7	-	-	c.3603+3A>T	p.K1202Rfs*13	A	3	Sí	-	No	No	Sí
8	-	53-55	c.7661_8218dup	p.N2740Lfs*22	ABC	0,6	Sí	9	Sí	No	Sí
9	45-50	-	c.6439_7309del	p.Q2147Lfs*9	ABC	1	No	-	No	No	No
10	51-70	-	c.7666_10421del	p.R2556Lfs*15	ABCDE	2	Sí	-	No	No	Sí
11[a]	22-29	-	c.2804_4071del	p.I935Sfs*9	A	4	Sí	-	No	NS	No
12[a]	22-29	-	c.2804_4071del	p.I935Sfs*9	A	2	No	12	No	NS	No
13[a]	-	-	c.3188G>A	W1063*	A	7	No	9	No	No	No
14[a]	-	-	c.3188G>A	W1063*	A	1	No	8	Sí	No	Sí
15	64-67	-	c.9489_10023del	p.E3163Hfs*33	ABCDE	3	Sí	-	No	No	Sí
16	38-40	-	c.5326_5739del	p.A1776_K1913del	AB	1,5	Sí	-	No	NS	Sí
17	61-79	-	c.9085_11055del	p.V3029_M3685del	ABCDE	0,6	Sí	9	NS	No	Sí
18	46-52	-	c.6615_7660del	p.A2205Sfs*2	ABC	1,6	Sí	-	No	No	No
19[a]	46-51	-	c.6615_7542del	p.L2206Qfs*23	ABC	1,2	Sí	9	Sí	No	Sí
20[a]	46-51	-	c.6615_7542del	p.L2206Qfs*23	ABC	1,16	Sí	-	No	NS	No
21[b]	-	-	c.9040dupC	p.L3014Pfs*27	DE	1,6	Sí	-	No	NS	NS
22	9	-	c.831_960del	p.I278Afs*6	A	1,5	No	8	No	No	No
23	3-45	-	c.94_6614del	p.F32_R2205del	ABC	2	Sí	-	No	No	No
24[a]	73	-	c.10329_10394del	p.R3443Sfs*3	ABCDE	1,2	Sí	-	No	No	No
25[c]	-	-	c.2077C>T	Q693*	A	3	No	-	No	No	No
26[a]	-	8-37	c.649_5325dup	p.D217_I1775dup	AB	2	No	-	No	No	Sí
27[a]	-	8-37	c.649_5325dup	p.D217_I1775dup	AB	1	No	-	No	Sí	No
28	-	5-22 y 46-52	c.265_2949dup y c.6615_7660dup	p.V89_Q983dup y p.R2205_I2254	ABC	0,6	No	-	No	NS	NS
29	45-48	-	c.6439_7098del	p.Q2147_G2366del	ABC	3	Sí	-	No	No	No
30	8-41	-	c.640_6395del	p.D217Afs*1	AB	0,75	Sí	7	Sí	NS	Sí
31	11-27	-	c.1150_3786del	p.G384_Q1262del	A	2	Sí	-	No	No	No
32	-	12-16	c.1332_1993dup	p.I665Ffs*3	A	0,5	Sí	-	No	No	Sí
33	-	10	c.961_1139dup	p.H321_E383dup	A	3	Sí	9	Sí	No	No
34	-	-	c.2733dupT	V912Cfs*8	A	3	No	9	No	No	No
35	-	-	c.6662delA	N2221Mfs*26	ABC	ND	ND	-	-	-	-
36	-	-	c.8713C>T	V912Cfs*8	C	2	Sí	6	No	No	No
37	-	-	c.10797+1G>A	P3600Dfs*43	E	2	Sí	10	No	No	No
38	41-43	-	c.5740_6290del	p.Q1914Afs*3	AB	ND	ND	-	-	-	-
39	47	-	c.6762_6912del	p.L2255Gfs*7	ABC	ND	ND	-	-	-	-
40	40	-	c.5587_5739del	p.D1863Gfs*14	ABC	ND	ND	-	-	-	-

Tabla 3 – (*continuación*)

Individuo	Exón deletado	Exón duplicado	Mutación	Nomenclatura de proteínas	Isoforma	Edad síntomas (años)	Retraso desarrollo	Pérdida marcha (años)	Soporte ventilatorio	Cardiomiopatía dilatada	Déficit cognitivo
41	-	44-48	c.6625_7261dup	p.G2097_K2151dup	ABC	0,75	Sí	-	No	No	Sí
42	-	3-10	c.371_1231dup	p.F32_E383dup	A	ND	ND	-	-	-	-
43	-	61-66	c.9361_9842dup	p.V3029_Y3217dup	ABCDE	ND	ND	-	-	-	-
44[a]	40	-	c.5587_5739del	p.D1863Gfs*14	AB	4	Sí	9	No	No	Sí
45[a]	40	-	c.5587_5739del	p.D1863Gfs*14	AB	1,5	Sí	6	No	No	No
46	-	56-60	c.8218_9085dup	p.N2739_Q3031dup	ABCD	ND	ND	-	-	-	-
47	51-54	-	c.7310_8027del	p.S2437Wfs*2	ABC	3	Sí	10	No	No	No
48	5	-	c.265_357del	p.V89Gfs*5	A	ND	ND	-	-	-	-
49[a]	45	-	c.6439_6614del	p.E2147Gfs*1482	ABC	5	Sí	-	No	No	No
50[a]	45	-	c.6439_6614del	p.E2147Gfs*1482	ABC	5	Sí		Sí	No	No
51	50	-	c.7201_7308del	p.R2401Sfs*1250	ABC	3	No	8	No	Sí	Sí
52	52-54	-	c.7543_8027del	p.A2515Gfs*3	ABC	ND	ND	-	-	-	-
53	41	-	c.5740_5922del	p.E1914Sfs*5	AB	ND	ND	-	-	-	-
54	-	2	c.32_93dup	p.Y11_K31dup	A	0,6	Sí	-	No	No	No
55	45-48	-	c.6439_7098del	p.Q2147_G2366del	ABC	ND	ND	-	-	-	-
56	-	10	c.961_1139dup	p.H321_383Edup	A	ND	ND	-	-	-	-
57	1-61	-	c.1_9203del	p.M1_3055Tdel	ABCD	ND	ND	-	-	–	-
58	4-7	-	c.187_649del	p.P63Mfs*13	A	5	No	-	No	No	No
59	-	2	c.32_93dup	p.Y11_K31dup	A	4	No	-	No	No	Sí
60	-	5	c.265_357dup	p.V89Lfs*3	A	1,3	Sí	-	No	No	No
61	-	-	c.1132_1136del	Q378Sfs*4	A	1,6	Sí	-	No	No	Sí
62	-	-	c.238dupG	A80Gfs*9	A	4	No	-	No	No	Sí

Isoformas de la distrofina: A = Dp427; B = Dp260; C = Dp140; D = Dp116; E = Dp71.

[a] Pareja de hermanos afectados.

[b] Una pareja de hermanos y un primo segundo.

[c] Una pareja de primos hermanos.

es posible hacer una adecuada correlación fenotipo-genotipo debido a que fueron remitidos con diversos tiempos de evolución del cuadro clínico y con tratamientos disímiles.

La correlación fenotipo-genotipo es incierta; a pesar de que se conoce la localización de las isoformas y en algunos casos su función, la deleción de ciertas regiones no se comporta de forma similar en todos los pacientes. Se ha descrito que los pacientes con compromiso de regiones terminales del gen *DMD* (exones 62-79) por alteración de la isoforma Dp71 cursan con déficit cognitivo, esto debido al potencial de afectar la expresión de un número creciente de isoformas por efectos perjudiciales acumulativos[45]; en nuestra cohorte el 50% de los individuos con deleción de la parte distal de la proteína (6 pacientes) cursaban con déficit cognitivo. Respecto al resto de las isoformas comprometidas y el fenotipo, no se encontró una relación específica fenotipo-genotipo.

Aunque la biopsia muscular (inmunohistoquímica o inmunoblot) juega un papel importante en el diagnóstico[46], la caracterización molecular de la enfermedad es necesaria para la consejería genética, el pronóstico y para el eventual manejo farmacológico de ciertas mutaciones. El diagnóstico molecular de la DMD incluye la PCR múltiple, sin embargo, esta solo detecta deleciones en un grupo de exones, no detecta rearreglos genéticos ni mutaciones puntuales. Algunas de estas falencias se superan con la técnica de MLPA, que identifica deleciones/duplicaciones en los 79 exones del gen *DMD*, delimita el tamaño de estas mutaciones y determina el estado de portador en las mujeres. Diversos estudios han mostrado su beneficio diagnóstico frente a la PCR múltiple[47].

En el caso de pacientes con sospecha clínica de DMD, sin evidencia de deleción/duplicación, se debe optar por la secuenciación del gen, en donde se evalúan variantes en la secuencia exónica; sin embargo, no detecta mutaciones en el 2% de los casos con rearreglos complejos o cambios intrónicos profundos[48]. Actualmente solo se dispone de manejo paliativo para la DMD, el cual se basa en terapia física, el uso de apoyos ortopédicos, el tratamiento de las complicaciones y la administración de glucocorticoides. Algunos estudios clínicos han indicado que los glucocorticoides pueden prolongar la marcha y mejorar la función y la fortaleza muscular[13,14]. Sin embargo, generan varios efectos adversos, sin modificar la función de la proteína distrofina y, por ende, sin impactar significativamente sobre la etiología de la enfermedad[14].

En este contexto, han surgido terapias potenciales para la DMD, siendo las más prometedoras los oligonucleótidos antisentido que inducen salto exonal[15–17] y las terapias de salto de codón de parada temprano originadas en mutaciones sin sentido[18,49]. Es así como es necesaria la caracterización molecular de la enfermedad, tanto para la consejería genética como para evaluar el uso de manejo farmacológico[19]. Por otra parte, la caracterización por grupos poblacionales permite establecer prevalencias globales y comparar las frecuencias de variantes genéticas entre grupos humanos[20].

El diagnóstico molecular de mutaciones puntuales a través de la secuenciación masiva paralela permitió alcanzar de manera eficiente la confirmación diagnóstica, definiendo para los casos negativos para deleción/duplicación la asesoría adecuada y la implementación de un manejo terapéutico apropiado.

Autoría

MGA: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito, incluyendo la veracidad y la integridad de los datos y los resultados.

TP: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, realización de pruebas moleculares, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito, incluyendo la veracidad y la integridad de los datos y los resultados.

MGT: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, redacción del artículo, valoración clínica de los sujetos y realización de árboles familiares, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito, incluyendo la veracidad y la integridad de los datos y los resultados.

RGR: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito, incluyendo la veracidad y la integridad de los datos y los resultados.

PAR: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, realización de pruebas moleculares y manejo de muestras, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito, incluyendo la veracidad y la integridad de los datos y los resultados.

TB: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, realización de pruebas moleculares, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito, incluyendo la veracidad y la integridad de los datos y los resultados.

AP: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito.

FSO: diseño del estudio, recogida y análisis de los datos, redacción del artículo, aprobación de la versión final del mismo. Es responsable de todos los aspectos del manuscrito.

Financiación

El presente estudio fue financiado en parte por una donación de los Laboratorios Vitalchem de Colombia y PTC Therapeutics y por el Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, Proyecto de investigación-Vicerrectoría de Investigación: 7034.

Conflicto de intereses

Ninguno que declarar por parte de los autores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Oliveira J, Gonçalves A, Taipa R, Melo-Pires M, Oliveira ME, Costa JL, et al. New massive parallel sequencing approach

improves the genetic characterization of congenital myopathies. J Hum Genet. 2016;61:497–505.
2. Laing NG. Genetics of neuromuscular disorders. Crit Rev Clin Lab Sci. 2012;49:33–48.
3. Rahimov F, Kunkel LM. The cell biology of disease: Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. J Cell Biol. 2013;201:499–510.
4. Verma Dalal A, Mittal B, Phadke SR. Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy. Indian J Hum Genet. 2012;18:91–4.
5. Mah JK, Korngut L, Dykerman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2016;24:482–91.
6. Chiang DY, Allen HD, Kim JJ, Valdes SO, Wang Y, Pignatelli RH, et al. Relation of cardiac dysfunction to rhythm abnormalities in patients with Duchenne or Becker muscular dystrophies. Am J Cardiol. 2016;117:1349–54.
7. Ho R, Nguyen ML, Mather P. Cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy: Overview. World J Cardiol. 2016;8:356–61.
8. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. Neuron. 1989;2:1019–29.
9. Gao QQ, McNally EM. The dystrophin complex: Structure, function, and implications for therapy. Compr Physiol. 2015;5:1223–39.
10. Juan-Mateu J, González-Quereda L, Rodriguez MJ, Baena M, Verdura E, Nascimento A, et al. DMD mutations in 576 dystrophinopathy families: A step forward in genotype-phenotype correlations. PLoS One. 2015;10:e0135189.
11. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. Hum Mutat. 2009;30:1657–66.
12. Mah JK. Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016;12:1795–807.
13. Wein N, Alfano L, Flanigan KM. Genetics and emerging treatments for Duchenne and Becker muscular dystrophy. Pediatr Clin North Am. 2015;62:723–42.
14. Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Cochrane Database Syst Rev. 2016;5:CD003725.
15. Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. Adv Drug Deliv Rev. 2015;87:104–7.
16. Goemans NM, Tulinius M, van den Hauwe M, Kroksmark A, Buyse G, Wilson RJ, et al. Long-term efficacy, safety, and pharmacokinetics of drisapersen in Duchenne muscular dystrophy: Results from an open-label extension study. PLoS One. 2016;11:e0161955.
17. Syed YY. Eteplirsen: First global approval. Drugs. 2016;76:1699–704.
18. Roy B, Friesen WJ, Tomizawa Y, Leszyk JD, Zhuo J, Johnson B, et al. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:12508–13.
19. Haas M, Vlcek V, Balabanov P, Salmonson T, Bakchine S, Markey G, et al. European Medicines Agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. Neuromuscul Disord. 2015;25:5–13.
20. Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2014;24:482–91.
21. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.
22. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med. 2013;15:733–47.
23. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. Hum Mutat. 2011;32:557–63.
24. Tuffery-Giraud S, Béroud C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel-Calemard L, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: A model of nationwide knowledgebase. Hum Mutat. 2009;30:934–45.
25. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. Nature. 2015;526:75–81.
26. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc. 2009;4:1073–81.
27. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010;7:248–9.
28. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. J Med Genet. 2006;43:295–305.
29. Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: A comparison of three sequence analysis based methods. Nucleic Acids Res. 2006;34:1317–25.
30. Lee SH, Lee JH, Lee KA, Choi YC. Clinical and genetic characterization of female dystrophinopathy. J Clin Neurol. 2015;11:248–51.
31. Silva C, Fonseca D, Restrepo C, Contreras N, Mateus H. Deleciones en el gen de la distrofina en 62 familias colombianas: correlación genotipo-fenotipo para la distrofia muscular de Duchenne y Becker. Colomb Med (Cali). 2004;35:191–8.
32. Vieitez I, Gallano P, González-Quereda L, Borrego S, Marcos I, Millán JM, et al. Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases. Neurologia. 2017;32:377–85.
33. Murugan S, Chandramohan A, Lakshmi BR. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis. Indian J Med Res. 2010;132:303–11.
34. Zimowski JG, Massalska D, Holding M, Jadczak S, Fidziańska E, Lusakowska A, et al. MLPA based detection of mutations in the dystrophin gene of 180 Polish families with Duchenne/Becker muscular dystrophy. Neurol Neurochir Pol. 2014;48:416–22.
35. De Almeida PAD, Machado-Costa MC, Manzoli GN, Ferreira LS, Rodrigues MCS, Bueno LSM, et al. Genetic profile of Brazilian patients with dystrophinopathies. Clin Genet. 2017;92:199–203.
36. Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. J Mol Diagn. 2005;7:317–26.
37. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell. 1987;51:919–28.
38. Shomrat R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Am J Med Genet. 1994;49:369–73.

39. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. Hum Mutat. 2015;36:395–402.
40. Chaturvedi LS, Mukherjee M, Srivastava S, Mittal RD, Mittal B. Point mutation and polymorphism in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. Exp Mol Med. 2001;33:251–6.
41. Chang RF, Mubarak SJ. Pathomechanics of Gowers' sign: A video analysis of a spectrum of Gowers' maneuvers. Clin Orthop Relat Res. 2012;470:1987–91.
42. Rae MG, O'Malley D. Cognitive dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: A possible role for neuromodulatory immune molecules. J Neurophysiol. 2016;116: 1304–15.
43. Vengalil S, Preethish-Kumar V, Polavarapu K, Mahadevappa M, Sekar D, Purushottam M, et al. Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification: Genotype-phenotype correlation in a large cohort. J Clin Neurol. 2017;13: 91–7.
44. Cuisset JM, Rivier F. [Central manifestations of dystrophinopathies] French. Arch Pediatr. 2015;22, 12S58-12S62.
45. Milic Rasic V, Vojinovic D, Pesovic J, Mijalkovic G, Lukic V, Mladenovic J, et al. Intellectual ability in the Duchenne muscular dystrophy and dystrophin gene mutation location. Balkan J Med Genet. 2015;17:25–35.
46. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. N Engl J Med. 1988;318:1363–8.
47. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. Int J Mol Sci. 2012;13:3245–76.
48. Abbs S, Tuffery-Giraud S, Bakker E, Ferlini A, Sejersen T, Mueller CR. Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Neuromuscul Disord. 2010;20:422–7.
49. Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. Muscle Nerve. 2014;50:477–87.