

Análisis de deleciones en 15 exones situados dentro y fuera del *hot spot* mutacional del gen de la distrofina en pacientes con distrofia muscular de Duchenne

Deletion Analysis of 15 exons located outside and inside a "Hot Spot" in the Duchenne Muscular Dystrophy gene in Duchenne's Muscular dystrophy patients

Dora Janeth Fonseca, MSc,¹ Heidi Eliana Mateus, MSc,² Nora Constanza Contreras, MSc,³ Rossana Sánchez, MD,⁴ Tristana Herrera, est.,⁵ Claudia Tamar Silva, MD⁶

Resumen

Introducción. La distrofia muscular de Duchenne (DMD), y su forma alélica más leve, la distrofia muscular de Becker (DMB), es una entidad de herencia recesiva ligada al X, que se presenta con debilidad muscular, pérdida progresiva de las habilidades motoras y muerte precoz. Es causada principalmente por deleciones en el gen de la distrofina, el cual contiene 79 exones.

Objetivo. Realizar un análisis ampliado para evaluar la presencia de deleciones en 15 exones del gen de la distrofina situados dentro y fuera del *hot spot* mutacional en 58 pacientes afectados con DMD/DMB sin mutación previamente identificada.

Metodología. Amplificación, mediante PCR múltiplex, de 4 exones situados dentro y 11 fuera del *hot spot* mutacional descrito para el gen de la distrofina en 58 pacientes afectados con DMD y determinar la frecuencia de deleciones en la población analizada.

Resultados. Se encontró deleción del exón 16 en uno de los pacientes estudiados, hecho que

indica una frecuencia de 1,7%. No se observó ninguna deleción de los exones situados fuera del *hot spot* mutacional.

Recibido: diciembre 10 de 2008

Aceptado: mayo 1 de 2009

¹ Profesora principal. Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Correo electrónico: dfonseca@urosario.edu.co.

² Profesora principal. Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina. Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

³ Profesora asistente. Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina. Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

⁴ Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

⁵ Estudiante de Pregrado. Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

⁶ Profesora principal. Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

Conclusiones. La frecuencia de deleciones en los 15 exones del gen de la distrofina analizados es baja; sólo se presentó en el exón 16, el cual se encuentra localizado en el *hot spot* mutacional proximal del gen. Es importante analizar este exón en los afectados, en la medida en que aumenta la tasa de detección de deleciones en un 1,7%. Se debe analizar otro tipo de mutaciones como puntuales y duplicaciones en los afectados.

Palabras clave: deleción, distrofina, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, mutación, Colombia.

Summary

Introduction. Duchenne and Becker Muscular Dystrophies (DMD/DMB) are X-linked recessive diseases characterized by progressive muscle weakness and wasting, loss of motor skills and death after the second decade of life. Deletions are the most prevalent mutations that affect the dystrophin gene, which spans 79 exons.

Objective: Identify deletions on the dystrophin gene in 58 patients affected with DMD.

Methods: Through multiplex PCR identify deletions on the dystrophin gene in 58 patients with DMD and observe the frequency of this mutation in our population.

Results: We found deletions in 1.72% of patients (1 of 58 persons). Deletions were not the principal cause of disease in our population. It is possible that duplications and point mutations caused this illness in our patients.

Conclusions: The frequency of deletions in the 15 exons analyzed from the dystrophin gene was low. The predominant types of mutation in our patients' samples were not deletions as has been observed in the literature worldwide, therefore, it is important to determine other types of mutations as are duplications and point mutations.

Key words: DNA, dystrophin, Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, mutation, Colombia

INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD), y su forma alélica más leve, la distrofia muscular de Becker (DMB), afecta a 1 de cada 3.500 varones nacidos vivos en el mundo. Se debe a mutaciones tipo deleción, duplicación y mutación puntual del gen de la distrofina, localizado en el brazo corto del cromosoma X, en Xp21. Esta entidad presenta un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X (1-7).

El análisis molecular del gen en pacientes ha indicado que las deleciones y duplicaciones se presentan en el 66% de los casos; el resto corresponde a mutaciones puntuales (8). Las deleciones se distribuyen entre los exones 44 al 52 y del 1 al 19 (9). El análisis de 18 exones, de un total de 79 presentes en el gen, ha permitido

identificar de manera directa hasta el 98% de las deleciones (10-12). Sin embargo, en Colombia la frecuencia de deleciones en esas regiones es sólo del 31% (13). La baja frecuencia de deleciones en el *hot spot* descrito para otras poblaciones del mundo justifica el análisis en exones diferentes con el fin de encontrar el daño molecular del paciente. Este conocimiento permitirá brindar asesoramiento genético adecuado a las mujeres por línea materna del afectado. En el presente estudio se analizaron 15 exones del gen de la distrofina, localizados dentro y fuera del *hot spot* mutacional, en 58 pacientes afectados con DMD, con el fin de determinar la frecuencia de deleciones y establecer la correlación genotipo-fenotipo mediante la hipótesis del corrimiento del marco de lectura (14).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 58 pacientes remitidos a la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario, con diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne (DMD). Se diligenció y se obtuvo el consentimiento informado, previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, para la recolección de muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA. La extracción de DNA se realizó usando el método

de *salting out*, descrito por Miller en 1989. La evaluación de calidad y cantidad se efectuó a través de la técnica electroforética, con geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiplex, se amplificaron 15 exones del gen de la DMD (4 dentro y 11 fuera del *hot spot* mutacional). Los exones fueron organizados en 5 grupos, teniendo en cuenta, además de las condiciones óptimas de amplificación, el tamaño del producto amplificado esperado (Tabla 1).

Tabla 1. Organización de los sistemas *plex* para los 15 exones analizados

Sistema 2 plex	Sistema 2A	Sistema 3B	Sistema 4B	Sistema 4C
Exón 25 (259 pb)	Exón 4 (196 pb)	Exón 72 (144 pb)	Exón 28 (275 pb)	Exón 16 (290 pb)
Exón 75 (344 pb)	Exón 67 (286 pb)	Exón 73 (202 pb)	Exón 49 (439 pb)	Exón 32 (253 pb)
		v 77 (270 pb)	Exón 62 (185 pb)	Exón 34 (171 pb)
			Exón 79 (349 pb)	Exón 53 (212 pb)

Los *primers* están descritos en la base www.dmd.nl/DMD_mPCR.html. Las condiciones de PCR fueron estandarizadas en mezclas de reacción de 20 µl, que contenía: *buffer 1X*, *primers* 1,0 mM, 2,5 MgCl₂ ó 5,0 mM, según el *plex*, DNTPS 1,0 mM, 1,2 U de Taq ADN polimerasa y 100 ng de ADN. En cada montaje de PCR se analizaba de manera simultánea un control normal y un blanco de reacción. Los productos amplificados fueron corridos en geles de agarosa al 1,2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados sobre transiluminador. Los productos amplificados se compararon con la migración obtenida para un patrón de peso molecular de 50 pb (Figura 1). Las deleciones se detectaron en los pacientes a través de la observación de ausencia de los productos amplificados esperados y la frecuencia fue determinada por conteo directo.

RESULTADOS

Un paciente presentó deleción en el exon 16 (Figura 2), lo cual indica una frecuencia para la población de estudio de 1,72% (1 afectado de 58 analizados). De acuerdo con la hipótesis de correlación genotipo-fenotipo, esta deleción, que lleva a la unión de los exones 15 y 17, produciría una mutación *in frame*, la cual no afectaría el marco de lectura, por lo que se espera para el paciente un fenotipo de distrofia muscular de Becker (DMB). Sin embargo, el cuadro clínico correspondía a distrofia muscular de Duchenne (DMD), es decir, la forma severa, lo que indica una pérdida de correlación entre el genotipo y el fenotipo.

Figura 1. En el carril 1 *plex 2*, exones 25 y 75; en el carril 2 *plex 3B*, exones 72, 73 y 77; en el carril 3 *plex 3C*, exones 4, 65 y 67; en el carril 4 *plex 4B*, exones 28, 49, 62, 79; en el carril 5, marcador de peso molecular (50-500pb); en el carril 6 *plex 4C*, exones 16, 32, 34, 53 y en el carril 7, exón 16.

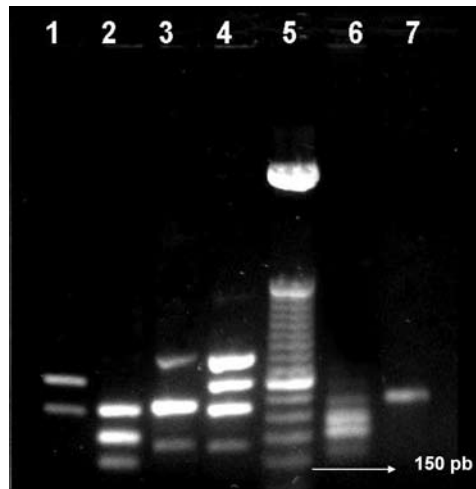
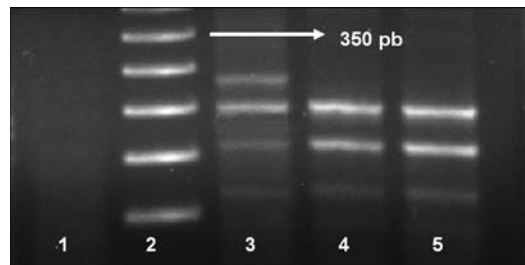


Figura 2. Amplificación del *Plex 4C*. Carril 1: blanco; carril 2: marcador de peso molecular (50-500 pb); carril 3: control normal; carril 4: paciente con DMD y delección del exon 16.



DISCUSIÓN

Dentro de las distrofias musculares, las de Duchenne y Becker son las más frecuentes. Las mujeres portadoras son sanas aunque presentan el 50% de riesgo de tener hijos afectados. Los pacientes con DMD sufren un deterioro progresivo, e incluso la muerte, en la primera década de vida. A pesar de los numerosos intentos por

establecer terapéuticas definitivas a través de metodologías como terapia génica y uso de oligonucleótidos antisentido, hasta el momento no se han logrado resultados efectivos (15).

En otros países, mediante la amplificación de 17 exones que incluyen el *hot spot* del gen de la distrofina, se ha hallado delección en casi el 90% de los afectados. En Colombia, el análisis

de estos mismos exones, sin embargo, sólo logra una tasa de detección del 31%, semejante a la descrita para otras poblaciones en América Latina (16-18).

Teniendo en cuenta esta observación preliminar, se hizo necesario estudiar el comportamiento mutacional en exones diferentes, en búsqueda de ampliar el poder de detección de la mutación causante de DMD/DMB en los pacientes colombianos. En el presente estudio se analizaron pacientes afectados en quienes no se ha logrado hallar la deleción con el panel de 17 exones comúnmente usados. El estudio ampliado indicó una frecuencia de deleción de tan sólo 1,72%, de manera que, haciendo un análisis combinado con el estudio previo realizado por nuestro grupo, la frecuencia de deleciones que se alcanza analizando 32 exones del gen de la distrofina, es de casi 33%. Es probable que el daño molecular en el resto de los pacientes corresponda a duplicación del gen o a mutaciones puntuales, los cuales ocurren en un 10 y 40%, respectivamente. En países como Argentina y Venezuela se han reportado bajas frecuencias de deleciones (17, 18), lo cual puede representar una característica propia, producto de la mezcla étnica que se ha dado como consecuencia de la influencia de españoles, amerindios y africanos que colonizaron estas latitudes.

El resultado del presente trabajo indica que el exón 16 debe incluirse dentro del análisis molecular de los afectados, ya que por sí solo aumenta el poder de detección de deleciones en un 1,72%.

El paciente afectado con la deleción del exón 16, presentaba un cuadro clínico con características típicas de la enfermedad, hallazgo que difiere de lo reportado por Schwartz et al, quienes describieron el caso de un hombre con deleción en este mismo exón, sin ninguna manifestación clí-

nica. Lo anterior les llevó a hipotetizar que este segmento de ADN codifica para un segmento de proteína que no es funcionalmente importante. De ser así, esperaríamos que el paciente de este estudio no estuviera afectado a pesar de tener la deleción. La explicación más probable para esta divergencia es que la longitud de la deleción en nuestro paciente sea mayor e involucre los exones 14 y/o 15, los cuales no se analizaron, y sea la deleción conjunta de estos exones la responsable del fenotipo expresado (19).

El hallazgo de una mutación en una secuencia específica de ADN permite clasificar correctamente un diagnóstico genético de distrofia muscular en una de las distintas enfermedades específicas (DMD/DMB) (20). En el caso específico de DMD/DMB, además de confirmar el diagnóstico clínico, el cual puede ser confundido con otras enfermedades que, como Pompe, cursan con una manifestación similar. El hallazgo de mutaciones específicas del gen de la distrofina permite establecer, en la mayoría de los casos, una correlación genotipo-fenotipo, lo cual ayuda a predecir el cuadro clínico del paciente, información esencial para el médico, el paciente y sus familiares (14). Por otro lado, el conocimiento de la mutación determinante de la enfermedad permite realizar la detección de las mujeres portadoras, en riesgo de tener hijos afectados, quienes podrán ser asesoradas desde el punto de vista genético. En aquellas familias en las que la mutación no se ha identificado, será necesario recurrir a métodos indirectos para la identificación de las portadoras, los cuales, a pesar de ser muy útiles en estos casos, no dejan de ser indirectos y contar con múltiples limitaciones obviadas con el diagnóstico directo de la mutación causal de la enfermedad (21, 22).

Estudios previos han indicado que la concordancia entre genotipo y fenotipo se da en el

79% de los casos, de tal manera que es posible encontrar, como en el presente trabajo, pacientes en quienes su fenotipo se esperaba más benigno o, por el contrario, de mayor severidad respecto al expresado. Estas discrepancias se han explicado principalmente por la alteración de sitios de reconocimiento de *splicing*, generados por la deleción no sólo del exón sino del intrón involucrado y por la presencia de deleciones de mayor extensión, no evidenciadas en la PCR múltiplex. Dado que en el presente análisis no se evaluaron los exones 14 y 15, no se puede asegurar que la extensión de la deleción no los haya involucrado (13).

Dentro de las distrofias musculares, las más frecuentes son la DMD/DMB, las cuales afectan a 1 de cada 3.500 niños nacidos vivos. Es una entidad degenerativa y letal, sin cura conocida. La frecuencia de deleción de los 15 exones analizados fue de 1,72%; el análisis conjunto de 32 alcanza una detección de 33%, lo cual indica

que para nuestra población deben ser tenidos en cuenta otros tipos de mutación como causantes principales de la enfermedad. Este hallazgo permite demostrar que para nuestro medio no se justificaría realizar el diagnóstico molecular con el análisis de 32 exones, debido a que éste no aumenta el poder diagnóstico en forma considerable; sin embargo, se debe incluir en el panel usualmente aplicado el estudio del exón 16, que demuestra, para nuestra población, una frecuencia de deleción de 1,72%. La detección de la mutación causante de la enfermedad permitirá confirmar el diagnóstico clínico y reconocer portadoras en las mujeres por línea materna del afectado, en quienes el asesoramiento genético es importante para establecer sus opciones reproductivas. La correlación genotipo-fenotipo puede ser útil para el abordaje médico del paciente y para explicar su posible pronóstico de vida; sin embargo, es necesario conocer que esta concordancia se presenta en el 79% de los casos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Laboratorio de Biología Molecular y Celular del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad del Rosario, a la Asociación Colombiana de Distrofia Muscular y a los pacientes y sus familias.

REFERENCIAS

1. Duchenne GB. De l'ataxie locomotrice progressive. Archives générales de médecine (Paris). 1858 ; 5 sér. 12: 641-652;13:36-62, 158-1881, 417-51.
2. Gowers WR. A manual of nervous system. 2nd ed. Philadelphia: Lea Brothers & Co; 1895.
3. Darras BT. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular Dystrophy. J Pediatr. (Boston), 1990;117:1-15.
4. Emery AE. Duchenne muscular dystrophy. En: Alan E. H. Emery, (2nd ed.) Oxford monographs on medical genetics. #24, Inglaterra, Oxford: Oxford University Press; 1993. p. 539-63.
5. Nevo Y, Muntoni F, Sewry C, Legum C, Kutai M, Harel S, et al. Large in-frame deletions of the rod-shaped domain of the dystrophin gene resulting in severe phenotype. Isr Med Assoc J. 2003;5:94-7.

6. Emery AE, Skinner R, Holloway S. A study of possible heterogeneity in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet.* 1979;1:444-9.
7. Torricelli E. Actualización en distrofias musculares. *Rev Neurol.* 2004;39:860-71.
8. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blondon LAJ, Ginjaar HB, Wapenaar, MC, et al. Topography of de Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and CDNA analysis of 194 cases reveals 116 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet.* 1989;45:835-47.
9. Shomrat R, Gluck E, Legun C, Shiloh Y. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Gen.* 1994;49:369-73.
10. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:11141-56.
11. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98-percent DMD/DMB gene deletions by polymerase chain reaction. *Human Genetics.* 1990;86:45-8.
12. Montejo Y, Zaldivar T, Acevedo AM. Diagnostic techniques described in the study of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Rev Neurol.* 2002;33:278-81.
13. Silva CT, Fonseca D, Restrepo CM, Contreras N, Mateus HD. Deleciones en el gen de la distrofina en 62 familias colombianas: correlación genotipo-fenotipo para la distrofina muscular de Duchenne y Becker. *Colomb Med.* 2004;35:191-98.
14. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. In the molecular basis for Duchenne vs. Becker muscular dystrophy: correlations of severity with type deletion. *Am J Hum Genet.* 1989;45:498-506.
15. Rus A, Van Ommen G. Antisense mediated exon skipping. A versatile tool with therapeutic and research applications. *Leiden. RNA.* 2007;13:1609-24.
16. Silva E. Informe de casos de distrofia muscular de Duchenne y Becker. En Informe Epidemiológico Nacional. 1998;3:69-72.
17. Baranzini SE, Giliberto F, Dalamon V, Barreiro C, Garcia-Erro M, Grippo J, et al. Carrier detection in Duchenne and Becker muscular dystrophy argentine families. *Clin Genet.* 1998;54:503-11.
18. Delgado LW, Pineda-Del VL, Borjas L. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Venezuela patients with the polymerase chain reaction. *Clin Invest.* 1994;35:195-207.
19. Schwartz M, Duno M, Palle AL, Krag T, Vissing J. Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Hum Mutat* 2007; 28:205.
20. Espinosa de los Monteros LE. Polymerase chain reaction PCR in clinical diagnosis. Review of the use of the technique. *Latinoam Microbiol.* 1993;35:225-30.
21. Fonseca D, Silva CT, Mateus HE. Deteccion de portadoras de distrofia muscular de Duchenne en familias colombianas mediante análisis de microsatélites. *Colomb Med.* 2008;39:7-13.
22. Fonseca D, Silva CT, Mateus HE, Restrepo CM. Identificación de deleciones en portadoras de distrofia muscular de Duchenne. *Acta Médica Colombiana.* 2008;33: 63-67.