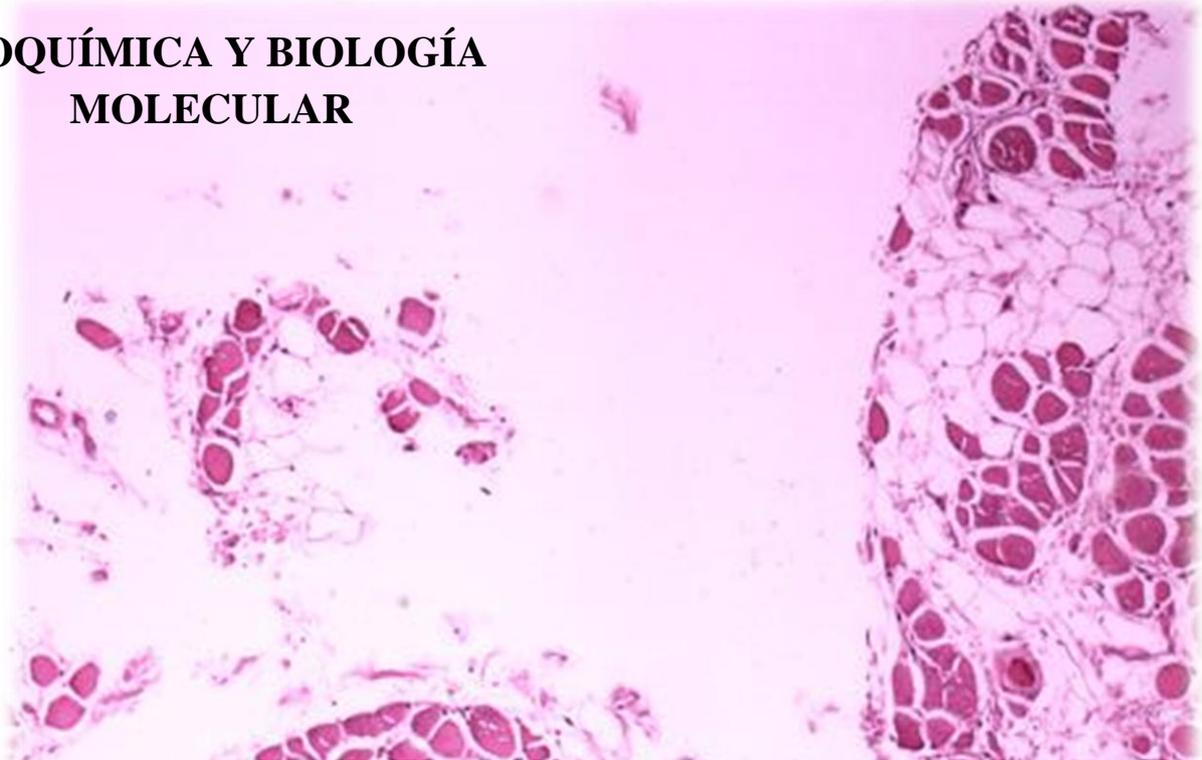


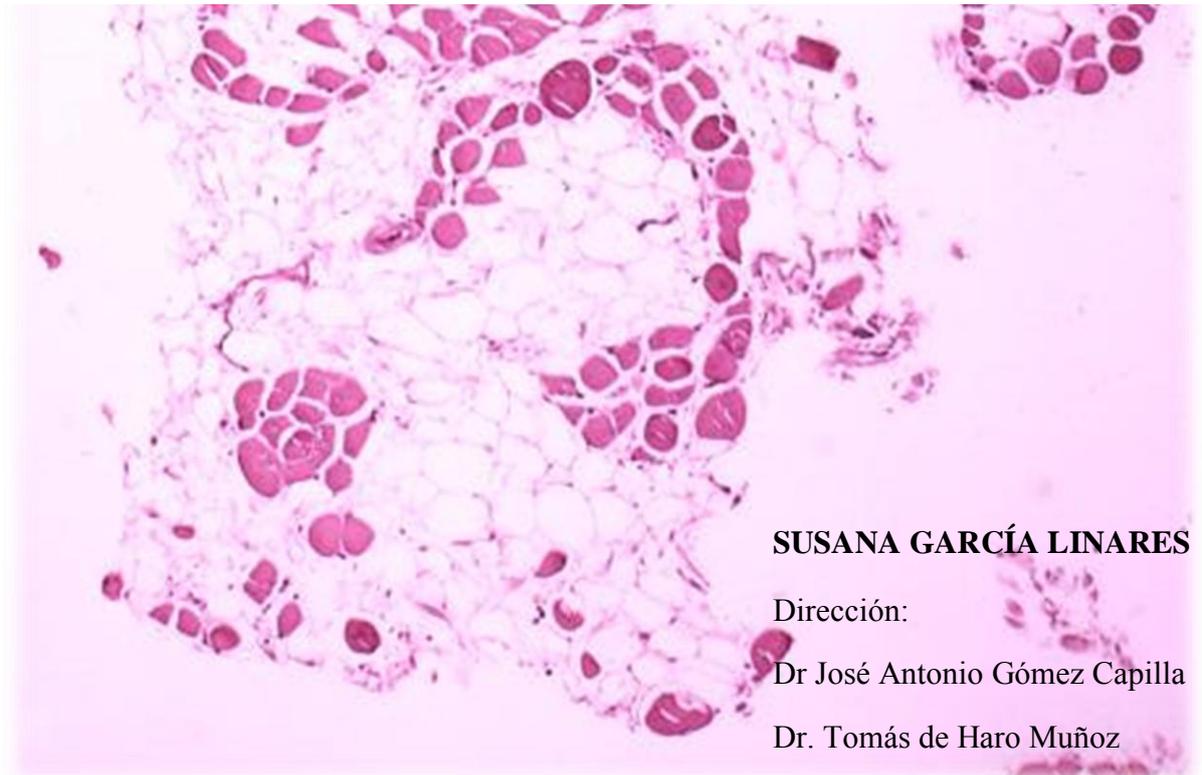
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

**BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**



Identificación mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) de las deleciones y duplicaciones de la Distrofia Muscular de Duchenne en varones afectados y mujeres portadoras pertenecientes a la población andaluza.



SUSANA GARCÍA LINARES

Dirección:

Dr José Antonio Gómez Capilla

Dr. Tomás de Haro Muñoz

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Susana García Linares
ISBN: 978-84-9125-320-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/41096>



ugr

Universidad
de Granada

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Programa de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular

Identificación mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent probe Amplification) de las deleciones y duplicaciones de la Distrofia Muscular de Duchenne en varones afectados y mujeres portadoras pertenecientes a la población andaluza.

Tesis Doctoral

Susana García Linares

Granada, 2015



D. JOSÉ ANTONIO GÓMEZ CAPILLA
CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que D^a **Susana García Linares**, Licenciada en medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado Identificación mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent probe Amplification) de las deleciones y duplicaciones de la Distrofia Muscular de Duchenne en varones afectados y mujeres portadoras pertenecientes a la población andaluza. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2015

Fdo: Prof. Dr. D. J. A. Gómez Capilla



D. TOMÁS DE HARO MUÑOZ

**DIRECTOR DE LA UGC DE LABORATORIOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO
HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE GRANADA- HOSPITAL
UNIVERSITARIO SAN CECILIO**

CERTIFICA:

Que D^a **Susana García Linares**, Licenciada en medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado Identificación mediante MLPA (Multiplex Ligation-Dependent probe Amplification) de las deleciones y duplicaciones de la Distrofia Muscular de Duchenne en varones afectados y mujeres portadoras pertenecientes a la población andaluza. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2015

Fdo: Dr. D. Tomás de Haro Muñoz

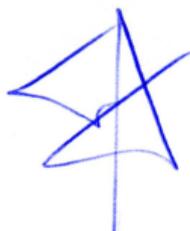
El doctorando **Susana García Linares** y los directores de la tesis **D. José Antonio Gómez Capilla** y **D. Tomás de Haro Muñoz** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 12 de Junio de 2015

Directores de la Tesis

Fdo:

José Antonio Gómez Capilla

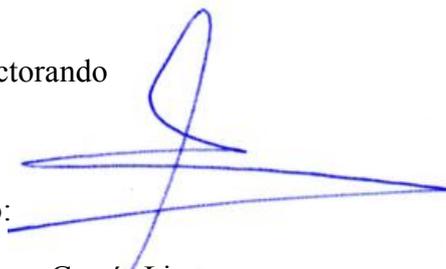


Tomás de Haro Muñoz

Doctorando

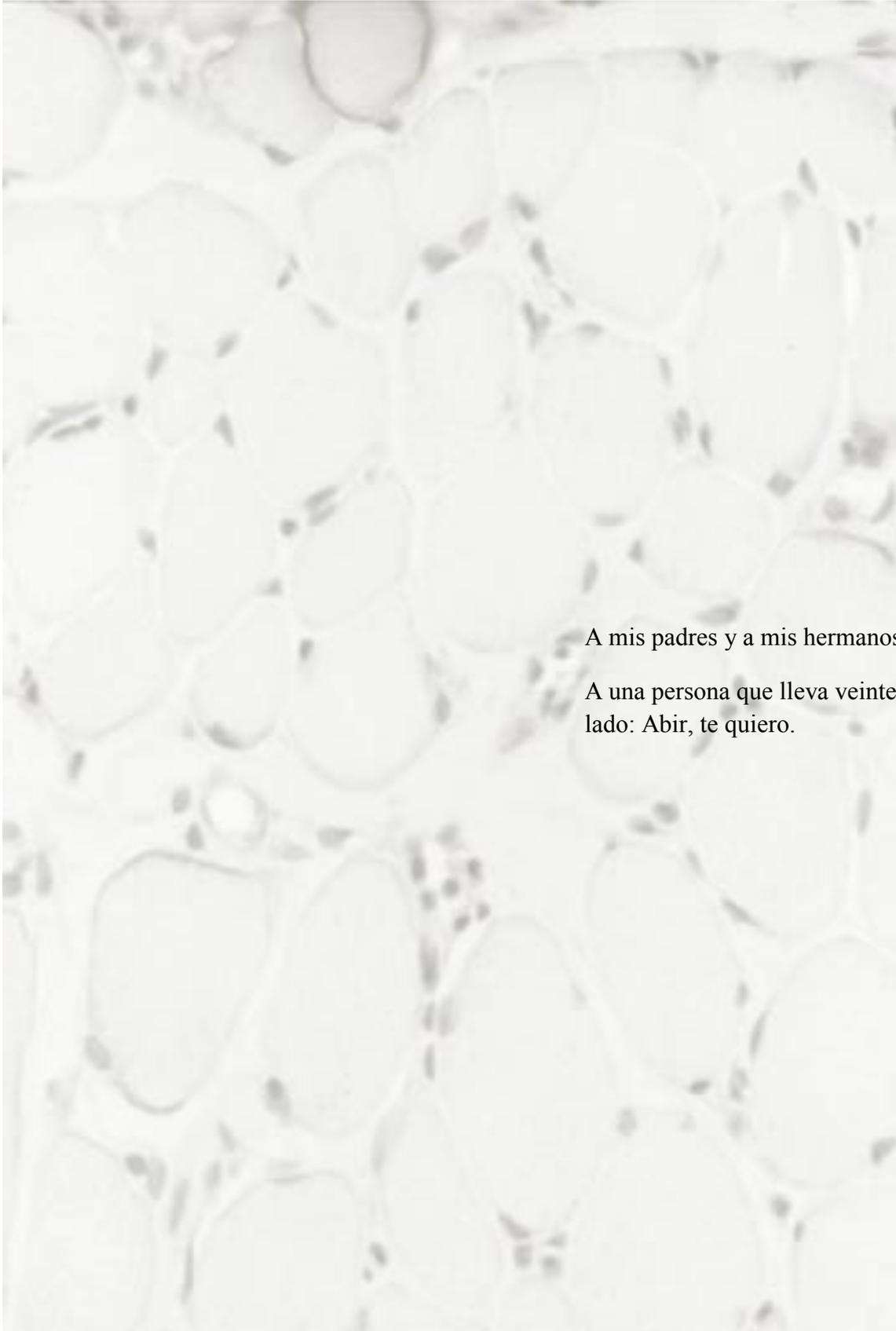
Fdo:

Susana García Linares



El presente trabajo ha sido publicado en la revista científica:

International Journal of Medical Sciences



A mis padres y a mis hermanos.

A una persona que lleva veinte años a mi lado: Abir, te quiero.

AGRADECIMIENTOS

Quiero con estas palabras, agradecer el apoyo, la comprensión, la paciencia y el cariño de todos los que han estado a mi lado durante esta trayectoria personal y profesional.

Todos habéis colaborado para que pueda ver la luz este trabajo.

A todas las personas que han formado parte de mi vida profesional, y que me han impulsado a diario, facilitándome las cosas y formándome como facultativo, en especial a Rosa Sánchez que me metió en las tripas del laboratorio y a Antonio Poyatos que me abrió las puertas del mundo de la Biología Molecular. Excelentes profesionales, y sin duda, mejores personas. Es un placer haberos tenido como formadores.

A Dolores Macía, la mejor compañera y amiga que se pueda tener al lado: eres siempre luz, entregada y dispuesta, con esa sonrisa y esos ojos que alegran a cualquiera.

A todas las compañeras que me han acompañado en muchas guardias y tardes de trabajo intensivo, me habéis dado muchos buenos momentos y espero seguir compartiéndolos con vosotras.

A mis directores de tesis: el Dr. José Antonio Gómez Capilla, por su entrega y su dedicación, por su admirable sabiduría y su impulso nervioso que me ha llevado hasta aquí. Al Dr. Tomás de Haro Muñoz, que un día decidió apostar por una “novata” y ayudarla como profesional para llegar hasta donde ahora estoy. Sin duda, ustedes dos me han conducido a un camino que espero no abandonar y que me está aportando grandes satisfacciones. Ustedes son dos personalidades bien distintas, pero no me cabe la menor duda que cada uno es el mejor en su área y juntos nos han ayudado a mí y a muchos otros a conseguirlo.

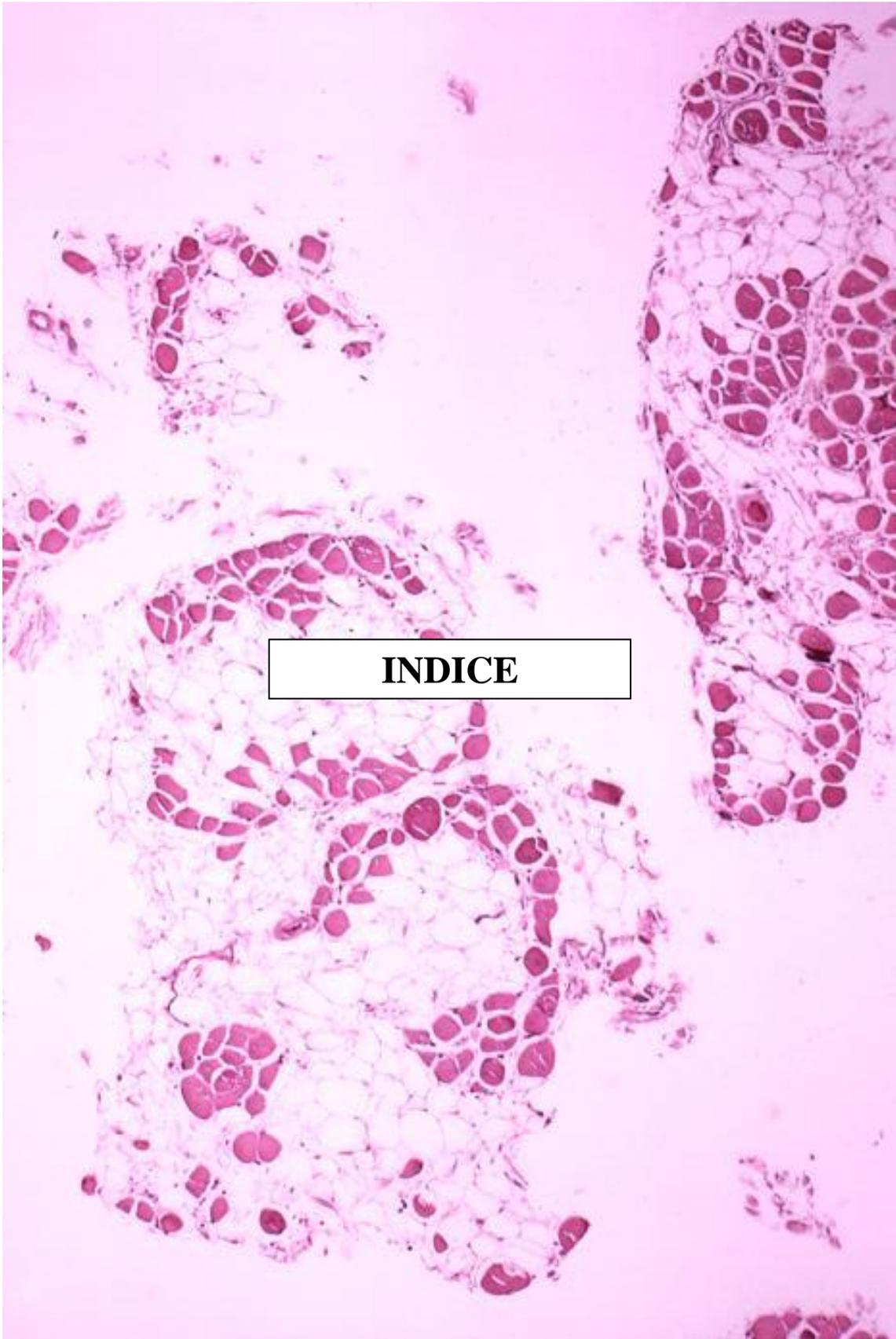
A mi familia: mi padre Manuel, mi madre Susana y mis hermanos M^a Eugenia, Víctor Manuel y Germán, cada uno de vosotros formáis parte de mi vida cotidiana y siempre os tengo presentes. Me enseñáis alegría y amor. A mis sobrinos Paula, Alejandro y Laura, vuestro cariño es mi motor y espero que contéis conmigo para todo lo que necesitéis. A mi prima y hermana Sabrina. A mi hija, Abir, querida, sabes que todo lo que hago lo hago por ti, y también contigo aprendo a diario; espero, con tu ayuda ser mejor madre.

A mi compañero Víctor: querido, sin ti la recta final se habría hecho mucho más ardua... Y que llamen a mi puerta, para que sepa que es verdad, que esta vida te devuelve lo que tú le das, y que pase el tiempo, que mientras tú rías no habrá pena en este mundo que haga sombra a mi alegría, que tú eres eso.

Y por último, a todos aquellos que en estos años me han impulsado hasta aquí de una manera u otra, de todos y cada uno de ellos he aprendido y aprehendido, habéis forjado mi carácter, y muchos de vosotros habéis apostado siempre por mí: Cecilia, Carmen

Mary, Manuel, Cristina, Antonio, Andrea y José Luis. El mundo es mejor con gente como vosotros.

“La gratitud es la memoria del corazón”, Jean Batipste Massieu.



ÍNDICE

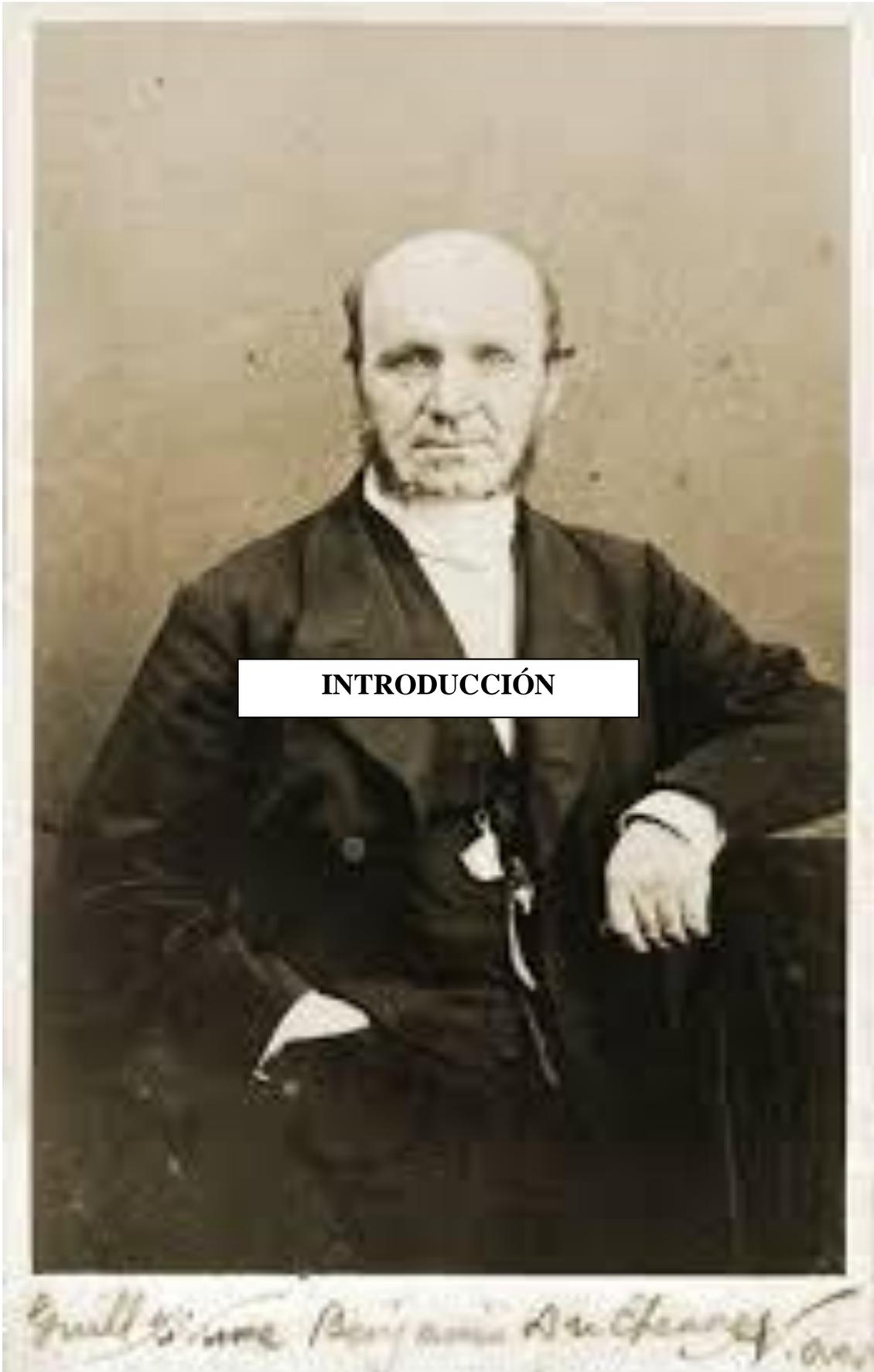
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. MIOPATÍAS.....	27
1.1.1. DISTROFIAS MUSCULARES.....	27
1.1.2. PATOGENIA DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE BECKER.....	32
1.2. DISTROFINA.....	38
1.2.1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA DISTROFINA.....	39
1.2.2. TIPOS DE DISTROFINAS.....	41
1.3. DIAGNÓSTICO DE DISTROFINOPATÍAS.....	45
1.3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA.....	45
1.3.2. EXÁMENES DE LABORATORIO.....	46
1.3.3. ESTUDIOS RADIOLÓGICOS.....	46
1.3.4. ESTUDIOS DE ELECTRODIAGNÓSTICO.....	47
1.3.5. ESTUDIO BIÓPSICO.....	47
1.3.6. ESTUDIO MOLECULAR: CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA.....	48
1.4. ESTUDIO FAMILIAR. ASESORAMIENTO GENÉTICO.....	58
1.4.1. CONSEJO GENÉTICO.....	60
1.5. DIAGNÓSTICO PRENATAL DE DMDB.....	64
1.6. DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL.....	65
1.7. TRATAMIENTO DE LA DMDB.....	66
1.7.1. EVALUACIÓN INICIAL Y SEGUIMIENTO.....	66
1.7.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	66
1.7.3. REHABILITACIÓN.....	68
1.7.4. TRATAMIENTO DE COMPLICACIONES CARDÍACAS.....	68
1.7.5. EVALUACIÓN Y SOPORTE PSICO-SOCIAL.....	69
1.8. NUEVAS TERAPIAS EN DMDB.....	70
2. RESUMEN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	75
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	81
3.2. TECNICA INVASIVA: BIOPSIA DE VELLOSIDAD CORIAL.....	83
3.3. FASE PREANALÍTICA: RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS.....	84
3.4. FASE ANALÍTICA.....	86
3.4.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN.....	86

3.4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE VELLOSIDAD CORIAL PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.....	86
3.4.3. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOTAL Y VELLOSIDAD CORIAL.....	88
3.5. MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION (MLPA): ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA DISTROFINA.....	94
3.5.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	94
3.5.2. MATERIAL REQUERIDO PARA REALIZAR LA TÉCNICA MLPA.....	96
3.5.3. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE CONTROL.....	96
3.5.4. KIT MLPA MRC HOLLAND®.....	96
3.5.5. PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE DELECCIONES Y DUPLICACIONES DEL GEN DMD.....	98
3.6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: EVALUACIÓN DE ELECTROFOREGRAMAS.....	112
3.6.1. CALIDAD DE ANÁLISIS.....	112
3.6.2. EVALUACIÓN DE CALIDAD INTERNA.....	113
3.6.3. MUESTRAS DE CONTROL SIN ADN.....	113
3.6.4. MUESTRAS DE CONTROL NEGATIVO.....	114
3.6.5. INTERPRETACIÓN DEL COCIENTE DE DOSIS.....	117
3.6.6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	119
3.7. CONFIRMACIÓN DE DELECCIÓN ÚNICA EN VARÓN.....	124
4. RESULTADOS.....	127
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA MEDIANTE TECNOLOGÍA MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION PARA DIAGNÓSTICO DE Distrofia Muscular de Duchenne Becker.....	127
4.2. VALIDEZ DE LA TECNOLOGÍA MLPA EN EL DIAGNÓSTICO DE DELECCIONES Y DUPLICACIONES DEL GEN DMD EN VARONES AFECTADOS Y EN MUJERES PORTADORAS/NO PORTADORAS.....	128
4.2.1. VARÓN CON DELECCIÓN COMPLETA DE VARIOS EXONES Y MADRE PORTADORA.....	128
4.2.2. VARÓN CON DELECCIÓN COMPLETA DE VARIOS EXONES Y MADRE NO PORTADORA.....	131
4.2.3. VARÓN CON DUPLICACIÓN Y HERMANA PORTADORA.....	133
4.2.4. VARÓN CON DUPLICACIÓN DEL EXÓN 2 Y MADRE NO PORTADORA.....	136
4.2.5. ESTUDIOS EN VARONES CON DELECCIÓN EN UN ÚNICO EXÓN.....	139
4.3. RESULTADOS DEL EMPLEO DE LA MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE MUTACIONES DEL GEN DE LA DISTROFINA...	141
4.3.1. RESULTADOS EN VARONES.....	141
4.3.2. RESULTADOS EN MUJERES.....	150

4.3.3. ESTUDIOS FAMILIARES.....	156
5. DISCUSIÓN.....	163
6. CONCLUSIONES.....	175
7. BIBLIOGRAFÍA.....	179

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

- **ADN**: ácido desoxirribonucleico.
- **ALT**: alanina aminotransferasa.
- **ARN**: ácido ribonucleico.
- **ARNm**: ácido ribonucleico mensajero.
- **AST**: aspartato aminotransferasa.
- **CK**: creatín kinasa.
- **DMB**: distrofia muscular de Becker.
- **DMD**: distrofia muscular de Duchénnè.
- **DMDB**: distrofia muscular de Duchénnè Becker.
- **dNTP**: deoxinucleótido trifosfato.
- **FDTA**: fluorescence based DNA analysis technology (análisis de AND basado en fluorescencia).
- **FISH**: hibridación fluorescente in situ.
- **MLPA**: multiplex ligation dependent probe amplification.
- **MPHA**: multiplex amplifiable probe hybridization.
- **Nt**: nucleótido.
- **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa.
- **RFLP**: fragmentos de restricción proteica.
- **RPA**: ratio peak area (cociente de área de pico).
- **RPMI**: medio Roswell Park Memorial Institute.
- **RT-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
- **SCAIP**: single condition amplification internal primer sequencing
- **SNP**: single nucleotide polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido).



INTRODUCCIÓN

Guill & Coe Benjamin De Chaves, 1850

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. MIOPATÍAS.

Las miopatías son un conjunto de enfermedades caracterizadas por el deterioro de la función del músculo esquelético y, a veces, del músculo cardíaco por mecanismos muy diversos entre los que se encuentran alteraciones en la transmisión del impulso nervioso, trastornos en la excitabilidad de la membrana muscular, alteración en los mecanismos de liberación de energía y alteración de las proteínas contráctiles.

La clasificación de las miopatías es compleja y cambiante, de entrada se describen miopatías de base genética y otras de base adquirida. El patrón de evolución temporal, el patrón de afectación muscular y la presencia o ausencia de antecedentes familiares ayudan a distinguir entre los dos tipos principales. El inicio temprano de los síntomas con una larga progresión sugiere procesos hereditarios, mientras que un inicio agudo o subagudo del cuadro en edades más avanzadas sugiere que se trata de una miopatía adquirida.

Dentro de las miopatías se han caracterizado miopatías inflamatorias, infecciosas, tóxicas, asociadas a enfermedades sistémicas, hereditarias, congénitas, metabólicas y mitocondriales.

Las distrofias musculares se encuadran dentro del grupo de miopatías hereditarias.

1.1.1. DISTROFIAS MUSCULARES.

Se define como Distrofia Muscular al conjunto de desórdenes musculares progresivos y hereditarios que producen debilidad y degeneración de los músculos motores, pudiendo también afectar al corazón y otros órganos. La afección puede aparecer a cualquier edad según el tipo de distrofia. El avance en las tecnologías de diagnóstico molecular ha permitido que las clasificaciones actuales se basen en las peculiaridades moleculares de cada una de ellas mientras que los hallazgos histopatológicos y la clínica permiten el establecimiento de los siguientes subgrupos:

- Distrofinopatías (Distrofia Muscular de Duchenne y Distrofia Muscular de Becker).
- Distrofias miotónicas, tipos 1 y 2.

- Distrofia Facio-escápulo-humeral.
- Distrofia oculo-faringea.
- Distrofia de cinturas (Limb Girdle Muscular Dystrophy).

1.1.1.1. DISTROFINOPATÍAS.

Las distrofinopatías, dentro del grupo de las distrofias musculares, son miopatías hereditarias en las que el mecanismo causal es la ausencia total o parcial de Distrofina dentro del sistema muscular debido a mutaciones (deleciones, duplicaciones, mutaciones puntuales) del gen DMD.

La Distrofia Muscular de Duchenne Becker (DMDB) es una distrofinopatía de etiología genética, degenerativa cuya evolución es lentamente progresiva, y se manifiesta por debilidad principalmente de las cinturas escapular y pélvica e hipertrofia muscular (Brooke et al, 1989). Dentro de ellas, se distinguen dos formas alélicas diferenciadas la una de la otra por la severidad de la clínica y la edad de aparición de los síntomas: la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y la Distrofia Muscular de Becker (DMB). Hay formas clínicas intermedias y otras más raras de miocardiopatías aisladas, cuadros de intolerancia al ejercicio o miopatías restringidas al músculo cuádriceps. Los estudios complementarios muestran cifras elevadas de Creatín Kinasa (CK) sérica (entre 20 y 100 veces el valor normal), el electromiograma muestra datos de miopatía difusa e inespecífica y la histología se caracteriza por un patrón de desestructuración de la arquitectura miofibrilar con cambios degenerativos. La cantidad de distrofina puede ser variable, desde ausente en DMD a cantidades normales pero de estructura anormal en DMB.

Aunque la prevalencia para estos cuadros no está claramente establecida, la incidencia de la DMD varía según las series consultadas entre 1 de cada 3600 a 1 de cada 6000 recién nacidos vivos varones (Emery AE, 1991); mientras que para la DMB la incidencia exacta no está bien determinada y se estima entre 1 de cada 18450 a 1 de cada 30000 recién nacidos vivos varones (Bushby et al., 1991; Nigro et al., 1983).

1.1.1.1.1. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

La DMD es la forma más severa de distrofinopatía; se origina debido a la ausencia total de Distrofina funcionante (Muntoni et al., 2003).

La DMD aunque presente desde el nacimiento, debuta clínicamente a la edad de 2 años, momento en el que se empieza a observar regresión en las habilidades para la marcha con pasos inestables y caídas frecuentes.

La pérdida de fuerza muscular es progresiva y afecta de manera predominante a la musculatura proximal de los miembros y los músculos flexores del cuello. Inicialmente se observa debilidad progresiva de la musculatura glúteo-femoral, de cuádriceps y de aductores, para continuar afectando a los músculos de los brazos, la cintura escapular, y en algunos casos la musculatura facial (Eckardt et al., 1996). El paciente afectado presenta un dato exploratorio característico conocido como signo de Gowers: al levantarse del suelo desde la posición sentado, utiliza los brazos para buscar apoyo accesorio debido a la debilidad muscular de las extremidades inferiores.

Hacia los 5 años de edad, el deterioro muscular es evidente en las pruebas de función muscular. Alrededor de los 6 años y a consecuencia de la progresiva atrofia muscular aparecen contracturas de los tendones de Aquiles y de las bandas iliotibiales, circunstancia que obliga al paciente a caminar de puntillas y que acaba desencadenando una postura lordótica de la espalda. Muy precozmente y de modo progresivo desaparecen los reflejos propioceptivos debido a la sustitución del tejido muscular normal por tejido conjuntivo y grasa.

Entre los 8 y los 10 años de edad, el paciente necesita muletas para caminar; en la primera decena de la vida la evolución del proceso hace que se haga necesario el uso de silla de ruedas. Las contracturas articulares, la limitación de la flexión de la cadera y la limitación de la extensión de codo, rodilla y muñeca empeoran cuando el paciente permanece sentado durante un periodo prolongado de tiempo sin ejercitar la musculatura.

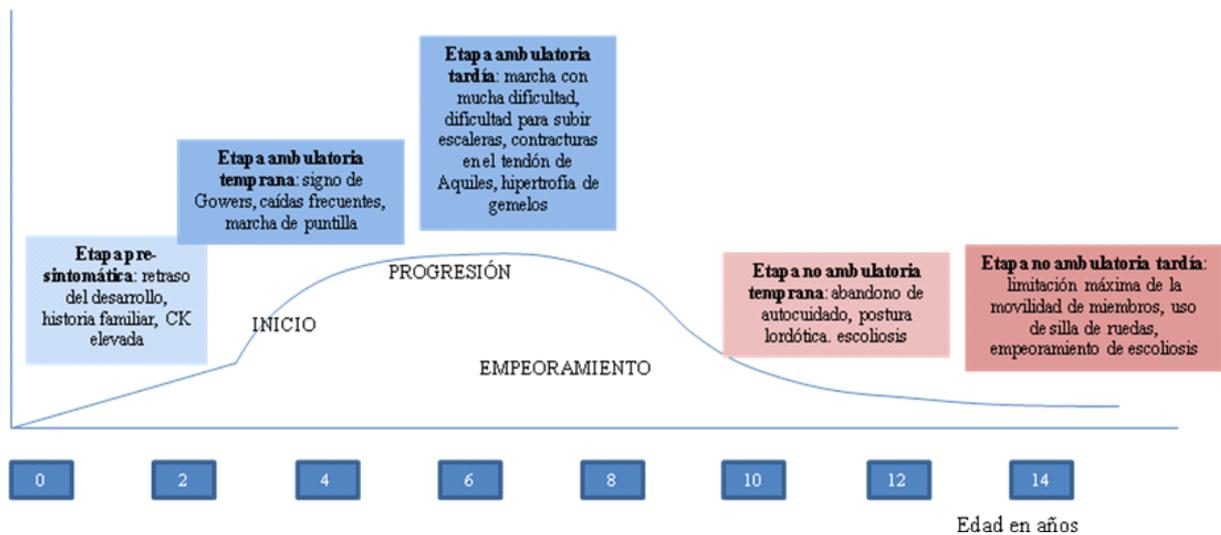
Las contracturas musculares y tendinosas se estabilizan y a consecuencia de éstas aparece una escoliosis progresiva que puede causar dolor y que deriva en deformidad torácica que altera todavía más la función pulmonar, ya comprometida por la debilidad de la musculatura respiratoria.

El deterioro intelectual es común en DMD; el cociente intelectual de los pacientes está aproximadamente a una desviación estándar por debajo de la media. El deterioro no parece ser progresivo y afecta sobre todo a la capacidad verbal (Daoud et al., 2009).

1. INTRODUCCIÓN

Finalmente, la alteración muscular es generalizada, la respiración se vuelve insuficiente, hacia los 16 a 18 años, los pacientes tienen alta predisposición a infecciones pulmonares graves que a veces son letales. La mayoría de pacientes mueren en la segunda decena de la vida a causa de complicaciones respiratorias, aunque en la actualidad las medidas de soporte físico con rehabilitación y el uso de fármacos han mejorado el pronóstico vital. Otras causas de muerte son aspiración de alimentos y dilatación gástrica aguda. Es poco frecuente que la muerte tenga una causa cardíaca, a pesar de que en casi todos los pacientes se detecten signos de miocardiopatía (tabla 1).

Tabla 1. Esquema de la evolución clínica de DMD en el tiempo.



1.1.1.1.2. Distrofia Muscular de Becker (DMB).

La DMB es la segunda forma más conocida de distrofia y desde el punto de vista clínico es menos agresiva que la DMD.

El patrón anatómico de afectación muscular es muy similar al de DMD. Se afectan los músculos proximales, en especial los de las extremidades inferiores. A medida que la enfermedad avanza, la debilidad se generaliza.

La hipertrofia muscular, sobre todo de las pantorrillas, es un signo clínico precoz y destacado.

La mayoría de pacientes con DMB experimentan los primeros síntomas entre los 5 y los 15 años de edad, aunque el cuadro clínico puede comenzar en el tercer o cuarto decenio de la vida o incluso después. Por definición, los pacientes con DMB pueden caminar

1. INTRODUCCIÓN

hasta después de los 15 años de edad, mientras que los pacientes con DMD pueden necesitar silla de ruedas ya a los 12 años.

En pacientes no diagnosticados, la enfermedad puede debutar con una reacción similar a la hipertermia maligna, después de una anestesia general. En casos raros, son los síntomas asociados a cardiomiopatía los que revelan la enfermedad.

En la DMB puede haber afectación intelectual, pero no es tan frecuente como en DMD. La afectación del miocardio en estos pacientes puede llegar a producir insuficiencia cardíaca; de hecho, algunos afectados sólo presentan como manifestación clínica la insuficiencia cardíaca. Otras formas de presentación menos frecuentes incluyen aumento asintomático del nivel sanguíneo de CK, mialgias sin debilidad y mioglobinuria (Melacini et al., 1996).

Los pacientes con DMB tienen una esperanza de vida algo reducida, muchos afectados con fenotipos medios tienen una esperanza de vida de 60 e incluso 70 años.

1.1.1.1.3. DISTROFIA EN PORTADORAS.

La mayoría de mujeres portadoras de mutaciones en el gen DMD son asintomáticas; sin embargo, entre un 2.5% y un 7.8% de estas portadoras presentan manifestaciones clínicas que van desde cuadros de distrofinopatía de severidad media a cuadros rápidamente progresivos; en estos casos se presenta un patrón anatómico-patológico tipo mosaico de distribución no uniforme de afectación de las fibras musculares, apreciando zonas de fibras anormales al lado de zonas de fibras normales. La afectación clínica en el caso de portadoras de mutaciones tipo DMB es menos frecuente y de menor severidad clínica que en el caso anterior (Soltanzadeh et al., 2010).

Las principales manifestaciones clínicas de las portadoras son mialgias y calambres en el 5%, debilidad muscular en el 17%, miocardiopatía dilatada en el 5% y dilatación del ventrículo izquierdo en el 18% de los casos. Los estudios más recientes han demostrado que la afectación cardíaca es de mayor severidad en los casos de pacientes portadoras de mutación tipo DMD (van Westrum et al., 2011). El seguimiento de las portadoras de Distrofia debe incluir, por tanto, evaluación cardíaca.

Cuando en una portadora aparece sintomatología más severa, se considera que las manifestaciones clínicas están asociadas a inactivación del cromosoma X sano por diversos mecanismos que acaban produciendo ausencia de distrofina funcional, entre ellas se encuentran:

1. INTRODUCCIÓN

- Translocaciones que afectan al brazo corto del cromosoma X y que desencadenan la inactivación del cromosoma X con el gen DMD normal (Boyd et al., 1986).
- Mutación del gen DMD en un único cromosoma X en mujeres con Síndrome de Turner y que presentan clínica similar a los varones afectados (Sano et al., 1987).
- Disomía uniparental del cromosoma X con una mutación en el gen DMD (Quan et al. 1997)
- Mujeres fenotípicamente hablando con cariotipo 46 XY y DMD originada por la concurrencia simultánea de mutaciones en el gen de la distrofina y en los genes de los receptores de andrógenos (Katayama et al., 2006), genéticamente son varones pero las alteraciones en los receptores androgénicos las dotan de fenotipo femenino.
- Finalmente se han descrito dos casos de mujeres con cariotipo normal y mutaciones en ambos cromosomas X a nivel del gen DMD (Fujii et al., 2009; Soltanzadeh et al., 2010).

1.1.2. PATOGENIA DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE BECKER.

En 1975, Mokri y Engel (Mokri et al., 1975) propusieron que el defecto que conducía al desarrollo de distrofia muscular era una alteración en la composición o en la función de las proteínas de la superficie de la membrana de la fibra muscular que producía pérdida de la función de barrera de ésta. Esta hipótesis se basaba en la observación de que los afectados presentan un aumento de enzimas musculares (CK) específicas liberadas tras la disrupción del sarcolema.

También en 1975, Cullen y Fulthorpe (Cullen et al., 1975) observaron que en las zonas de contracción muscular intensa se produce una afluencia aberrante de calcio al interior de la fibra muscular. El efecto del aumento del calcio intracelular hace que las fibras afectadas se mantengan contraídas mientras que el resto de las fibras del músculo se relajan. Esta circunstancia, mantenida en el tiempo, acaba produciendo la aparición de las lesiones descritas como lesión de tipo delta (disrupción de la membrana plasmática).

En los pacientes con DMDB la biopsia muscular muestra necrosis y degeneración por grupos de las fibras musculares. Estas fibras aparecen rodeadas de macrófagos CD4+ y linfocitos. También se han observado fibras nucleadas centrales inmaduras, producto de la regeneración del tejido por mioblastos; en las primeras fases de la enfermedad se pueden ver en el músculo áreas de fibras necróticas y regeneradas. Posteriormente se agota la capacidad regeneradora del músculo y gradualmente el tejido muscular se sustituye por tejido conectivo. Las manifestaciones de DMDB se consideran resultado del desbalance entre la necrosis de fibras y la regeneración mioblástica.

1.1.2.1. HIPÓTESIS MECÁNICA.

Las primeras descripciones anatomopatológicas de los músculos distróficos (lesión delta) junto con los elevados niveles de enzimas musculares en pacientes con distrofia hicieron pensar que la lesión que afectaba a estas estructuras era causada por alteraciones en el sarcolema de las fibras musculares (Mokri et al., 1975 Cullen et al., 1975).

Posteriormente, la identificación del mecanismo de afectación de distrofina y su complejo asociado de proteínas aclaró el mecanismo lesional: la ausencia de una o varias de estas proteínas compromete la integridad de las fibras, particularmente durante períodos de contracción mantenida, la capacidad de mantener contracciones excéntricas está muy afectada en DMDB por lo que este tipo de ejercicios acabarían produciendo daño muscular inducido por el ejercicio (Deconinck et al., 1996; Deconinck et al., 1998).

La afectación de la distrofina y proteínas asociadas altera la correcta función del llamado *costámero* (estructura formada por pequeños botones proteicos que mantiene la adhesión y el intercambio correcto entre sarcolema, subsarcolema y matriz extracelular). Los costámeros tienen como misión distribuir las fuerzas contráctiles generadas en el sarcolema manteniendo constante la forma a lo largo de toda la fibra muscular (Danowski et al., 1992).

Son varios los datos analíticos que hacen pensar que la membrana del miocito se altera en la DMDB:

- Aumento en el sarcoplasma de proteínas como albúmina e inmunoglobulinas, dato que sugiere que aumenta la permeabilidad de la membrana.

- El ejercicio mantenido aumenta la permeabilidad de la membrana (modelos experimentales con ratones). Ratones artificialmente inmovilizados con toxina botulínica presentan un marcado descenso del desarrollo de signos de distrofia. La mayor degeneración en afectados de DMD se ve en aquellos músculos que mantienen “ejercicio-tensión” continuos como los proximales de las extremidades, mientras que los sometidos a menos tensión muestran menos signos de degeneración.

1.1.2.2. HIPÓTESIS DEL CALCIO.

La homeostasia del calcio es de vital importancia para muchos aspectos de la función muscular. En las biopsias de pacientes con DMD se encuentran fibras musculares hipercontraídas y aumento de los niveles de calcio intracelulares en estas fibras. El aumento de permeabilidad de la membrana, al parecer, debido a un aumento de la mecanosensibilidad de los receptores voltaje independientes para los canales de calcio hace que aumente la afluencia de calcio al interior de la fibra.

El aumento sostenido del calcio en el citosol produce la activación de proteasas, sobre todo calpaínas (tiolproteasas no lisosomales con actividad tipo papaína dependiente de calcio, responsables de proteólisis neutra calcio dependiente) que provocan la destrucción de los constituyentes de la membrana, por lo que aún aumenta más la entrada de calcio en la célula y se puede acabar desencadenando la muerte celular (Carafoli et al., 1998; Raymackers et al., 2003).

Teniendo en cuenta esta hipótesis se han estudiado varios tratamientos en ensayos clínicos con distintos bloqueantes del calcio para DMD pero no han demostrado beneficio clínico; sin embargo y teniendo en cuenta la activación de proteasas calcio dependientes, la sobreexpresión de calpastatina (inhibidor endógeno de calpaína) ha demostrado que reduce la necrosis en los músculos de ratones mdx (ratones de laboratorio con distrofia muscular) (Spencer et al., 1990; Spencer et al., 2002).

1.1.2.3. HIPÓTESIS VASCULAR.

La observación de necrosis de fibras musculares en múltiples afectados de DMD ha hecho suponer que la alteración en la vascularización de la fibra debía tener un papel importante dentro de la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, los estudios anatómico-biópsicos no han demostrado anomalías en las paredes de los vasos (Koehler et al., 1977; Fidianska et al., 1987; Miike et al., 1987).

El ácido nítrico (NO) tiene efecto vasodilatador en el músculo esquelético y se piensa que esta molécula puede ser relevante en la patofisiología de DMD. Una familia de NO sintetasas (óxido nítrico sintetasa neural, n-NOS) produce NO en las células musculares, estas enzimas normalmente están ligadas a la distrobrevina y la sintrofina. En músculos deficientes en distrofina, la NO sintetasa está desanclada de su fijación subsarcolémica y flota libre en el citoplasma, además se reduce su contenido; esto hace que durante el ejercicio, cuando se necesita incremento del oxígeno en pacientes con DMD se produzca isquemia muscular (Sander et al., 2000; Crosbie et al., 2001). Por otra parte, se han estudiado ratones en los que se ha bloqueado la producción de NO sintetasas y estos no desarrollan enfermedad muscular; la n-NOS no tiene un papel directo dentro de la patología, pero contribuye al daño celular y en modelos experimentales se ha demostrado que altera el pH intracelular y favorece la aparición de inflamación muscular (Goudemant et al., 1998; Wheling et al., 2001).

1.1.2.4. HIPÓTESIS DE LA REGULACIÓN GÉNICA.

En la DMD juegan un papel esencial la distrofina y las proteínas del complejo asociado a la distrofina (CAD). Se han descrito varios genes implicados en la producción y regulación de las proteínas del CAD (Goldspink et al., 1999). La inyección de células madre en músculos deficitarios en distrofina, no sólo restaura parcialmente la molécula y su complejo proteico asociado, sino que también restaura la expresión de los genes encargados de la codificación de las anteriores proteínas (De Bari et al., 2003). Sin embargo, no está totalmente comprobado que los genes hasta ahora identificados tengan un papel en los cambios evolutivos de la distrofia.

Se han relacionado gran número de genes con moléculas de señalización intracelular, como la calcineurina, la proteína quinasa activadora de mitosis p38, quinasa c-Jun N-terminal (JNKs, son quinasas activadas por mitógenos y responden a estrés, radiaciones ultravioletas, choque térmico,...) y otras quinasas, que se ha demostrado que están suprarreguladas por mecanismos de estrés específico en los corazones de ratones mdx (Nakamura et al., 2001). Además, estudios recientes han demostrado que hay patrones de expresión similares en pacientes distróficos y en sujetos sanos después de ejercicio mantenido (Timmons et al., 2005). Esto sugiere que el perfil de suprarregulación genética en la DMD puede ser la consecuencia de mecanismos compensatorios principalmente relacionados con la activación de señales para vías de integrinas. Se desconoce aún la importancia de estos hechos en el tratamiento de la DMD.

1.1.2.5. HIPÓTESIS DE LA GLICOSILACIÓN.

La glicosilación es un proceso esencial para el correcto ensamblaje y funcionamiento de las proteínas de la arquitectura muscular y se han implicado recientemente en la patogénesis de la DMD. La glicosilación de componentes del complejo asociado a distrofina, como los α distroglicanos, controla la interacción con otros componentes de la matriz extracelular.

La glicosilación de α distroglicanos es una característica común en cuatro diferentes formas de distrofias musculares hereditarias causadas por la afectación de genes que codifican glicosiltransferasas, esto produce el desanclaje de las proteínas de la fibra muscular y la matriz extracelular; y la pérdida de esta interacción causa degeneración muscular progresiva y otros desórdenes en la migración de las neuronas. Estos procesos se han constatado en la enfermedad músculo-ojo-cerebro de Fukuyama (Muntoni et al., 2002). Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia clara del papel que pudiera tener la glicosilación aberrante en las distrofinopatías.

1.1.2.6. REMODELACIÓN DE TEJIDOS.

Las características secundarias de las deficiencias de distrofina tienen gran importancia en la determinación del grado de severidad de la enfermedad; por ejemplo: la presencia de mutaciones nulas que producen la inactivación total del gen DMD produce, inicialmente, una enfermedad progresiva en humanos y perros pero muy lentamente progresiva en ratones con hipertrofia muscular, lo cual hace considerar la importancia de los factores epigenéticos en DMD y su relevancia en el planteamiento de objetivos terapéuticos. El uso de esteroides anabolizantes en el tratamiento de pacientes DMD tiene efecto protector de la masa muscular. También se ha descrito el aumento de la masa muscular de tipo hiperplásico con el uso de factores de crecimiento (el factor de crecimiento de la insulina tipo 1) (Barton et al., 2002; Gregorevic et al., 2002).

1.1.2.7. HIPÓTESIS INFLAMATORIA.

Los músculos de los pacientes con DMD presentan cambios inflamatorios de menor importancia que los apreciados en otras distrofias como la Facio-escápulo-humeral. Los factores que conducen a estos fenómenos inflamatorios resultan de la coordinación de numerosos componentes de la respuesta inflamatoria crónica, incluidos citoquinas, quemocinas, adhesión leucocitaria, marcadores específicos de invasión celular y sistemas de activación del complemento. In vivo, depleciones de los CD4⁺ y CD8⁺ T o macrófagos reducidos en número en ratones mdx ilustran el papel de este tipo de

1. INTRODUCCIÓN

células en el agravamiento de este tipo de enfermedad (Spencer et al., 2002). En particular, la suprarregulación de quemocinas selectivas puede ser un proceso determinante en la respuesta inflamatoria del músculo distrófico. La conjugación de las señales de la respuesta inmune y la sobreexpresión local de los genes de la matriz extracelular son evidentes en DMD. Los músculos de los ratones mdx presentan pequeños núcleos de fibrosis en comparación con las amplias áreas de necrosis de los pacientes con DMD, estos hallazgos sugieren que la regulación del colágeno a nivel post-transcripcional media el aumento de áreas de fibrosis en DMD. A pesar de ello, la relación entre respuesta inmune y la afectación de la matriz extracelular está aún por clarificar.

El papel de los corticosteroides para ralentizar la evolución del cuadro clínico de DMD está relacionado con el efecto anti inflamatorio de estos fármacos, de modo que el uso terapéutico en estos casos produce retraso en la progresión de los síntomas, aumento del período de deambulación de los pacientes y previene la aparición de escoliosis (Merlini et al., 2003; Yilmaz et al., 2004).

1.2. DISTROFINA.

La distrofina es una proteína subsarcolémica de gran tamaño (427kDa), implicada en el anclaje de las proteínas de la fibra muscular al sarcolema y que forma parte del citoesqueleto del miocito (Broderick et al., 2005).

El citoesqueleto en la célula eucariota es una red tridimensional de filamentos que contribuye a la integridad de la célula; mantiene anclados los orgánulos celulares en posición correcta, actúa como sistema de transporte entre las distintas estructuras intracelulares y da soporte mecánico para mantenimiento de la forma celular. Es una estructura dinámica. Una contracción muscular efectiva conlleva la interacción de miles de fibras musculares que se contraen y se relajan reiteradamente, entre una acción y otra la recuperación de la forma y función tiene que ser total. En el caso del tejido muscular, el citoesqueleto es el encargado de mantener la arquitectura celular de las fibras tras el proceso de contracción. El citoesqueleto está compuesto por proteínas estructurales entre las que se encuentra la familia de las espectrinas, principalmente compuesta por proteínas de unión a la actina o α -actinas, y proteínas de anclaje a la membrana como la espectrina y la distrofina.

Las espectrinas son moléculas proteicas largas y flexibles (200-260nm de largo por 3-6 nm de ancho); forman heterotetrámeros con dos subunidades α y dos subunidades β , estas subunidades se ensamblan por los extremos con conformación antiparalela para formar dímeros $\alpha\beta$ y dan lugar a tetrámeros en los que se asocia el extremo amino de una subunidad α con el carboxilo de una subunidad β . (Bloch et al., 1989).

La distrofina pertenece a la superfamilia de proteínas β espectrinas/ α actinas caracterizadas por poseer un extremo HN2 terminal fijador de actina F seguido de un número variable de unidades repetidas llamadas repeticiones spectrin-like. La función principal de la distrofina es de tipo mecánico: estabiliza el sarcolema durante el tiempo de contracción mantenida de la fibra muscular permitiendo luego la recuperación de la forma del miocito (Muntoni et al., 2003).

En 1989, Campbell y Kahl (Campbell et al., 1989) demostraron que la distrofina se asocia a glucoproteínas de la membrana, y en 1990 Ervasti (Ervasti et al., 1990) describió el denominado “Complejo de Proteínas asociadas a la Distrofina” (Dystrophin-Associated Proteins Complex o DAP) entre las que había tanto proteínas de membrana como sarcoplasmáticas. Estos hallazgos confirman que la distrofina actúa como anclaje entre las proteínas del citoesqueleto y las proteínas integrales de la membrana. Los múltiples componentes de este complejo se han identificado progresivamente gracias a los trabajos concurrentes de los equipos de Campbell (Campbell et al., 1989) en Estados Unidos, y el de Ozawa en Japón (Ozawa et al., 2010).

Según Ozawa, las proteínas del sarcolema se clasifican en tres complejos:

1. INTRODUCCIÓN

- El complejo distroglicano, constituido por α distroglicano (156 kDa) y β distroglicano (43 kDa). La porción α se encuentra glicosilada en la membrana celular (extracelular) y la porción β puede unirse tanto a utrofina como a distrofina (proteína de transmembrana).
- El complejo sarcoglicano, formado por 5 proteínas de transmembrana: α sarcoglicano (50 kDa), β sarcoglicano (43 kDa), γ sarcoglicano (35 kDa), δ sarcoglicano (35 kDa) y sarcospan (25kDa), todas ellas proteínas glicosiladas salvo la última.
- El complejo de las sintrofinas (intracitoesquelético).

En 1996 Blake (Blake et al., 1996) describe la utrofina, proteína muy similar a la distrofina que se expresa en edad fetal, antes de que se exprese la distrofina y se localiza en el subsarcolema. Cuando se empieza a expresar la distrofina disminuyen los niveles de utrofina. En el músculo adulto normal la utrofina sólo se localiza en la placa neuromuscular y en las uniones miotendinosas colaborando en el mantenimiento de la membrana y en el agrupamiento de receptores de acetil colina (ACh).

1.2.1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA DISTROFINA.

La distrofina está organizada en cuatro regiones moleculares diferenciadas según las secuencias de aminoácidos y la capacidad de cada una de ellas para la fijación de distintas proteínas (figura 1):

- Extremo NH_2 (extremo N-terminal) de 232 a 240 aminoácidos según la isoforma, está presente en todas las proteínas de la familia de las espectrinas. Tiene tres lugares de unión a la actina F y presenta una secuencia de aminoácidos similar a la de α actina (Jarrett et al., 1995; Koenig et al., 1987; Koenig et al., 1990).
- Dominio central, porción más larga de la proteína, compuesto por aproximadamente 3000 aminoácidos, está formada por 24 unidades repetitivas de triple hélice de 109 aminoácidos cada una, con estructura similar a la espectrina. En esta porción se localizan cuatro regiones bisagra ricas en prolina que separan el dominio en tres subdominios y que aportan a la molécula de capacidad plástica. Al final de la unidad número 24 se sitúa la última región bisagra, inmediatamente seguida por la región WW situada en el dominio rico

1. INTRODUCCIÓN

en cisteína. Se ha descrito un cuarto lugar de unión para actina localizado dentro de las unidades 11-17.

- Dominio rico en cisteína: consta de 280 aminoácidos y tiene 15 residuos de cisteína; esta región es el principal punto de unión para β distroglicano que, a su vez, está conectado a la laminina 2 de la matriz extracelular a través del α distroglicano de transmembrana. Tiene varios componentes, entre ellos el dominio WW que es el primer lugar de interacción entre la distrofina y el extremo amino terminal del β distroglicano. La región WW actúa como modulador de la fijación a proteínas y está implicada en gran cantidad de procesos de señalización y regulación. Dentro de este dominio se localiza también la región ZZ que se caracteriza por poseer un número conservado de residuos de cisteína predictores del número de lugares de unión de la proteína con metales catiónicos divalentes como el Zinc, el dominio ZZ es muy parecido a otros tipos de dedos de zinc encontrados en proteínas citoplasmáticas y nucleares. En la distrofina, este dominio se une a la calmodulina a través de canales calcio dependientes.
- Extremo COOH (extremo C-terminal), de 420 aminoácidos y un solo residuo de cisteína; está presente únicamente en distrofina, utrofina y apodistrofina. Se fija a α actina y tiene la capacidad de proporcionar sitios adicionales de unión a la actina F.

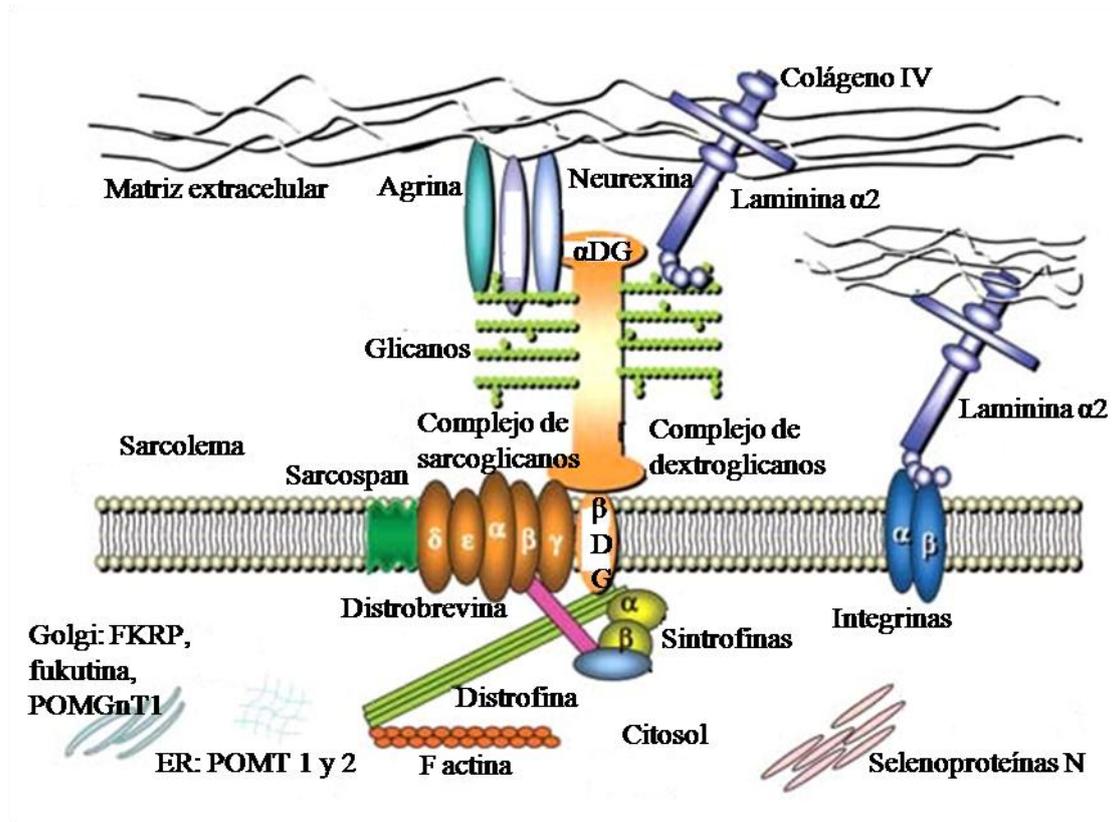


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas implicadas en las distrofias musculares congénitas, su localización e interacciones.

1.2.2. TIPOS DE DISTROFINAS.

El gen DMD codifica varias isoformas de la distrofina, proteínas de distinta longitud que contienen diferentes segmentos de la secuencia base de la proteína. Las distintas isoformas son transcritos codificados por ARN's mensajeros distintos generados mediante tres mecanismos distintos:

- A través de PROMOTORES TISULARES específicos para cada tipo de tejido.
- Por mecanismos de splicing que hacen que se excluyan exones del transcrito original o se inviertan posiciones de los exones de dicho transcrito.
- Por mecanismos de POLIADENILACIÓN, mediante señales diferentes de adición de poli-A (secuencia larga de poliadenilato, tramo de ARN donde todas las bases son adeninas). En células eucariotas, la

1. INTRODUCCIÓN

poliadenilación es parte del proceso de maduración del ARNm y forma parte del proceso de expresión normal del gen.

1.2.2.1. DISTROFINAS SEGÚN PROMOTORES.

La diferenciación en tejidos de las distintas isoformas de distrofina se realiza mediante técnicas de análisis con anticuerpos o inmunohistoquímica. La nomenclatura para cada isoforma consta del prefijo Dp (dystrophin protein), seguido por un número que corresponde al número de aminoácidos que tiene la proteína, la inicial del tejido donde se expresa y el diferente patrón de splicing que la genera. Dentro de ellas se encuentra la Dp427m, que es la distrofina más frecuentemente descrita en tejido muscular, se caracteriza porque el exón 1 codifica un único extremo N terminal y se produce en músculo esquelético y corazón. Otras distrofinas descritas atendiendo a este mecanismo de producción son la Dp471l (linfoblasto), Dp427c (neuronas del córtex e hipocampo), Dp427p (células de Purkinje), Dp260, Dp140 (SNC y riñón), Dp116 (nervios periféricos) y Dp71 (pulmón).

1.2.2.2. DISTROFINAS POR SPLICING ALTERNATIVO.

El splicing del ARN de la distrofina es un proceso que ocurre con bastante frecuencia y da lugar a isoformas de distrofina con variaciones mínimas con respecto a la genuina, por lo que es muy difícil distinguir una isoforma con promotor específico en el tejido o si se ha producido debido a un splicing en el transcrito. Los primeros casos de splicing los describió Feener (Feener et al, 1989) al analizar músculos y cerebros humanos, las formas de splicing descritas incluían los exones 68, 71, 78, 71-78, 71-72-78 y 71-72-73-74-78.

Estos fenómenos han sido descritos en las isoformas específicas Dp140 y Dp71.

1.2.2.3. DISTROFINAS POR POLIADENILACIÓN.

Feener (Feener et al., 1989) describió un lugar de poliadenilación alternativo en el intrón 70 en los tejidos cerebral y muscular. Una nueva conformación del extremo 3' puede generar la traslación de un codón stop en el sitio donante del splicing del exón 70; de modo que la proteína codificada puede perder algunos aminoácidos que se encuentran caracterizados en la isoforma completa.

1. INTRODUCCIÓN

En 1998 Tinsley (Tinsley et al., 1998) describe la isoforma Dp40 tras la secuenciación del DNA de una rata con Schwannoma; en esta isoforma se genera un codón stop que produce el empalme directo del exón/intrón 70 al final del gen DMD.

Mediante estos mecanismos se generan gran cantidad de proteínas específicas de tejido (distrofinas de tejido).

1.2.2.4. FORMAS CORTAS DE DISTROFINA.

El gen de la distrofina (figura 2) incluye cuatro promotores internos que favorecen la formación de distrofinas cortas, deficientes para la fijación terminal de actina, pero que poseen la porción rica en cisteína y el fragmento C-terminal que contienen los lugares de fijación para los distroglicanos, distrobrevina y sintrofina. Cada uno de estos promotores internos usa un único primer exón entre los exones 30, 45, 56 y 63 para generar productos proteicos de 260 kDa, 140 kDa, 116 kDa y 71 kDa.

La proteína Dp260 se expresa en altas concentraciones en la retina, donde coexiste con las formas largas completas de la distrofina cerebral y muscular.

La Dp140 se expresa en cerebro, retina y tejido renal.

La Dp116 sólo se expresa en el adulto en nervios periféricos.

La Dp71 se detecta mayoritariamente en tejidos no musculares incluido cerebro, retina, riñón, pulmón e hígado y está presente en corazón pero no en músculo esquelético.

1. INTRODUCCIÓN

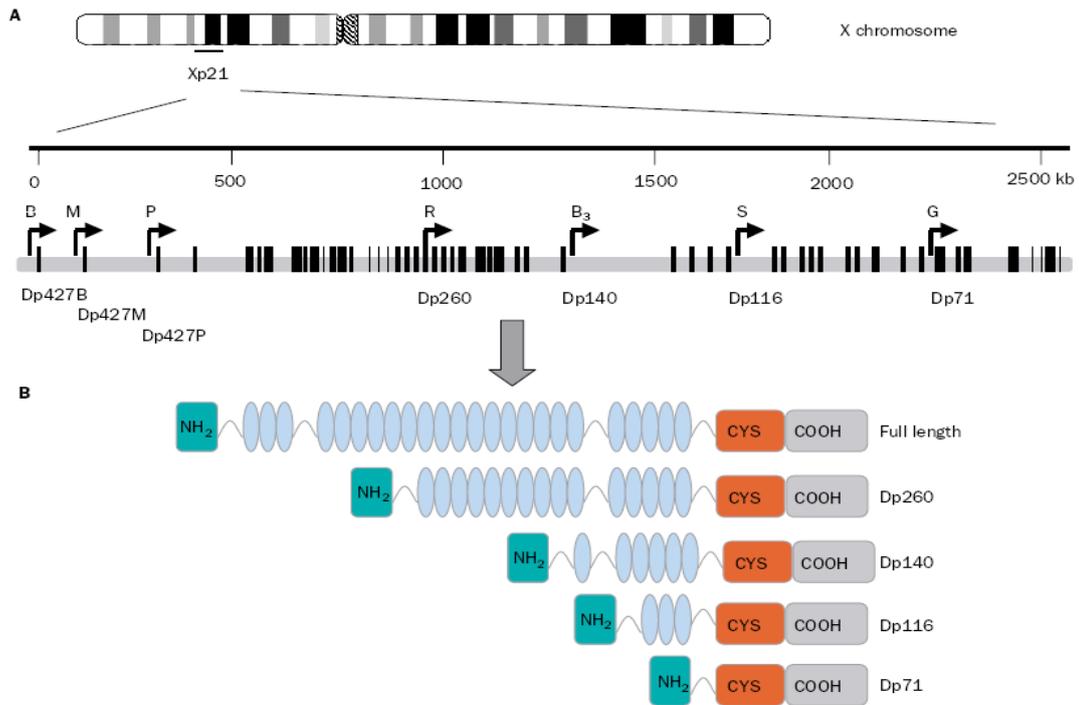


Figura 2: Organización del gen DMD, localizado en Xp21, las líneas negras verticales representan los 79 exones del gen. Las flechas indican los distintos promotores: cerebro (B), músculo (M) y células de Purkinje (P); R, B₃, S y G representan a los promotores retinianos (Dp260), promotor cerebral (Dp140), promotor en las células de Schwann (Dp116) y promotor de otros tejidos (Dp71). B: composición de los dominios de distintos tipos de distrofina; el dominio amino terminal se continúa con el dominio spectrin-like, el dominio rico en cisteína y el extremo C-terminal.

1.3. DIAGNÓSTICO DE DISTROFINOPATÍAS.

El diagnóstico de una distrofia requiere rapidez para proporcionar cuanto antes al afectado las medidas terapéuticas y de soporte necesarias para minimizar el impacto de la enfermedad, lo debe realizar un especialista en enfermedades neuromusculares. El asesoramiento familiar en estos casos es imprescindible y requiere la colaboración de especialistas en Genética Clínica.

En ausencia de historia familiar se sospecha DMD en los niños de entre 16 y 18 meses que no han iniciado la deambulación, si se constata un aumento injustificado de transaminasas y si el paciente presenta un signo de Gowers positivo. En el caso de que exista historia familiar, la sola sospecha de que pueda existir función muscular anormal justifica realizar pruebas diagnósticas de apoyo (Bushby et al., 2010). En niños de edad inferior a 5 años con exploración muscular normal no se puede descartar la sospecha de DMD, sin embargo, a medida que se incrementa la edad el deterioro se va haciendo evidente, de modo que un niño con 10 años que permanece con función muscular normal raramente padecerá DMD. Una vez realizado el diagnóstico de sospecha clínico se debe confirmar mediante la realización de pruebas complementarias que dependen de la disponibilidad para cada hospital, de modo que estudios moleculares de detección de deleciones y duplicaciones del gen DMD serían los más aconsejables al no entrañar los riesgos asociados a la realización de biopsia muscular; además si mediante una biopsia muscular se detectan alteraciones en la cantidad de distrofina (ausencia o reducción) es necesario realizar diagnóstico molecular confirmatorio por lo que la realización de la biopsia no obvia la realización de estudios moleculares, independientemente de la importancia de éstos para el consejo genético y el asesoramiento familiar.

1.3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA.

La evaluación clínica de un paciente con distrofia muscular incluye:

- Evaluación del modo de caminar: marcha de pato con aumento de la base de sustentación y balanceo del tronco.
- Detección de alteraciones articulares: pie equino en casos avanzados, desnivel escapular, presencia o no de escoliosis, asimetría de pliegues glúteos y poplíteos, retropié pronado o supinado.
- Detección de alteraciones musculares: pseudohipertrofia gemelar y más raramente en bíceps, deltoides y cuádriceps.

1. INTRODUCCIÓN

- Detección de alteraciones de los movimientos: Signo de Gowers, se usa para diagnóstico y control evolutivo de la capacidad muscular del paciente.
- Detección de alteraciones en la flexibilidad: medición de los arcos de movilidad de extremidades inferiores y superiores.
- Evaluación de la presencia de contracturas musculares en extremidades superiores e inferiores.
- Valoración de la dependencia para las actividades de la vida diaria: permite dilucidar el grado de autonomía y evolución del cuadro clínico.

1.3.2. EXÁMENES DE LABORATORIO.

Los datos de laboratorio más relevantes son:

- Niveles de CK, se usa para el diagnóstico diferencial de distinto tipo de alteraciones musculares. Sus cifras también aumentan en mujeres portadoras de DMDB.
- La alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST) y aldolasa aumentadas apoyan el diagnóstico.

En etapas tempranas de la distrofia todas las cifras de enzimas (CK, ALT, AST y aldolasa) aparecen elevadas, pero disminuyen gradualmente a medida que el tejido muscular va siendo sustituido por tejido graso y fibroso.

Además, para la evaluación de las condiciones generales del paciente se solicitan estudios generales de laboratorio: examen de orina, hemograma, coagulación básica y bioquímica básica.

1.3.3. ESTUDIOS RADIOLÓGICOS.

Los estudios radiológicos de tórax, columna dorso-lumbar y pies se solicitan para determinar las medidas rehabilitadoras necesarias y permiten realizar un control evolutivo del paciente.

1.3.4. ESTUDIOS DE ELECTRODIAGNÓSTICO.

Tradicionalmente en el diagnóstico de DMDB se realizan estudios de neuroconducción motora y sensitiva para valorar los nervios periféricos mediano, cubital, peroneo y tibial para apoyar el diagnóstico de miopatía: en los casos de afectación miopática la conducción nerviosa no tiene que verse afectada aunque en la evolución, la disminución del trofismo muscular produce disminución en la amplitud de los potenciales de acción con duración aumentada de los mismos.

El electromiograma (EMG) en pacientes con sospecha de DMD se debe realizar en los músculos que particularmente se encuentren más afectados: supraespinoso, deltoides, bíceps, supinador largo,... El músculo en reposo presenta fibrilaciones y ondas positivas que ponen de manifiesto la inestabilidad de la membrana; en la fase de contracción voluntaria máxima se produce un patrón miopático con potenciales de acción polifásicos de duración y amplitud disminuidas y frecuencia aumentada. La progresión de la enfermedad interfiere los patrones que se hacen inespecíficos porque se reduce el reclutamiento y el músculo puede volverse eléctricamente silente. A pesar de ello, estos hallazgos son inespecíficos y ocurren en todas las miopatías. En la práctica el EMG se usa en raras ocasiones para el diagnóstico de distrofinopatías (Pagon et al., 1993).

1.3.5. ESTUDIO BIÓPSICO.

Se realiza a partir de porciones musculares que se consideren poco afectadas por la patología; los fragmentos se obtienen a partir de deltoides, bíceps braquial o vasto lateral.

Las muestras obtenidas se examinan con tinciones especiales para la detección de distrofina y sarcoglicanos, se les aplican técnicas de inmunohistoquímica e inmunoblotting para la distrofina. Estas pruebas determinan qué tipo de proteína tiene el paciente, su tamaño y su capacidad funcional; se pueden encontrar desde pacientes con músculos totalmente deficitarios a distintos grados de ausencia parcial de distrofina.

La biopsia no se realiza en algunos casos en los que la situación clínica del paciente no lo permite por la probabilidad de complicaciones graves, se puede producir incluso el fallecimiento durante la exploración por complicaciones anestésicas. Una resultado de biopsia positivo obligada a la realización de pruebas de diagnóstico genético, por eso para la confirmación del cuadro en muchos casos se opta por el diagnóstico molecular en lugar de la biopsia.

1.3.6. ESTUDIO MOLECULAR: CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA.

En 1983 se identifica el gen DMD en el brazo corto del cromosoma X (Xp21) (Davies et al., 1983). Es el gen más largo identificado hasta el momento, con 2.5 Mb de longitud que ocupa un 0.1% del total del genoma humano. En 1985 Ray (Ray et al., 1985) realiza el mapeo detallado del brazo corto del cromosoma 21 y en 1987 Koenig (Koenig et al., 1987) consiguen clonar el gen DMD.

Los cuadros de DMDB presentan herencia ligada al cromosoma X, los varones tienen sintomatología clínica y las mujeres son portadoras y transmisoras de la enfermedad. A pesar de esta circunstancia se han descrito casos de mujeres afectadas por clínica de distrofinopatía en grado variable.

En 1935, Haldane (Haldane, 1935) postula que en una enfermedad genética con herencia ligada a X la proporción de nuevas mutaciones en recién nacidos de madres no portadoras es $(1-f)\mu/(2\mu+v)$, donde μ es el ratio de mutación en células germinales femeninas, v el ratio de mutaciones en células germinales masculinas, y f la capacidad reproductiva de los afectados. En DMD, el parámetro f es igual a 0 (los afectados por DMD rara vez llegan a edad reproductiva), por lo que la proporción de nuevas mutaciones depende del ratio de mutaciones para ambos sexos, si los ratios de mutaciones en varones y mujeres es igual, un tercio de todos los recién nacidos en una generación lo serán por mutaciones *de novo*. Tanto la DMD como la DMDB son enfermedades de herencia recesiva ligada al cromosoma X, si uno de cada tres pacientes está afectado por mutaciones *de novo*, una de cada tres madres no es portadora, por lo que en una siguiente gestación el riesgo de tener un nuevo varón afectado es nulo, estudios posteriores han demostrado que esto no ocurre así y a finales de los años 80 diversos autores (poner referencias) describen la presencia de mosaicismos de líneas de células germinales y estiman que el riesgo de recurrencia en madres no portadoras (investigando la transmisión de haplotipos de riesgo) se sitúa entre el 14 y el 20%.

El gen consta de 79 exones que suponen el 0.6% del contenido total del mismo, el resto de las porciones son intrones de gran tamaño. Debido a la extensión del gen, el rango de mutaciones detectado es alto en comparación con el rango de mutaciones estimado en humanos (1×10^{-4} mutaciones/generación frente de 1×10^{-5} a 1×10^{-6} para el resto de genes humanos, Blake et al., 2002).

En 1987 se determina que la causa principal de la DMDB son deleciones en alrededor del 65% de los casos, que afectan a uno o más exones (Koenig et al., 1987). El resto de los casos se han atribuido a duplicaciones (5-10%) (den Dunnen et al., 1989; Hu et al., 1990) o mutaciones puntuales (25-35%) (Roberts et al., 1992). La causa última de la aparición de síntomas clínicos en DMDB es la presencia en las fibras musculares de una proteína distrofina con una capacidad funcional limitada o la ausencia total de la misma.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, cualquier sospecha clínica de DMDB (por síntomas, datos bioquímicos y/o electromiográficos) se confirma mediante la realización de técnicas de diagnóstico molecular para filiar deleciones, duplicaciones o mutaciones puntuales tanto en los varones afectados como en mujeres portadoras.

1.3.6.1. “TEORÍA DEL MARCO DE LECTURA”.

En 1988, Monaco (Monaco et al., 1988) postula la llamada “Teoría del Marco de Lectura” que explica las diferencias fenotípicas entre los pacientes con DMD y DMB.

“Si una mutación produce un cambio en la expresión de un transcrito interno de modo que no se altera el inicio del marco de lectura, se obtendrá una distrofina con variación en el tamaño, pero funcional, y esto produciría fenotipo menos severo de DMB; por otra parte, si la mutación traslada el inicio del marco de lectura, se ven afectados tanto el transcrito de ARNm como la distrofina final, se verá severamente afectada la función proteica y el fenotipo resultante será más severo, de DMD.”

La disrupción del marco de lectura origina un transcrito ARN anómalo que produce interrupción prematura de la traducción desde ARN a proteína o una proteína de corta longitud; se origina pues una proteína truncada con alteraciones en los dominios ricos en cisteína y en el extremo C-terminal que pierde la capacidad para actuar como puente entre las proteínas del citoesqueleto. En la DMB el marco de lectura no se altera y la proteína originada es parcialmente funcional, se producen proteínas anómalas, más cortas, pero que conservan cierta capacidad funcional y en las que se preservan los dominios terminales de anclaje a las proteínas del citoesqueleto (Monaco et al., 1988; Malhotra et al., 1988).

Se ha estimado que aproximadamente el 91% de pacientes registrados en la base de datos Leiden con mutaciones en el gen DMD siguen en su expresión fenotípica la regla anteriormente mencionada.

A nivel de ARN esta regla llega al 99.5% de los pacientes: el gen DMD del 99.5% de los pacientes estudiados producen ARNm que dan lugar a proteínas anómalas cortas o truncadas. Las mutaciones sin sentido habitualmente causan DMD debido a un stop prematuro en la traducción de la proteína. Se han descrito un número mínimo de casos en los que una mutación sin sentido causa un fenotipo de DMB; la explicación para estos casos es que la mutación se localiza en el fragmento necesario para el reconocimiento del exón por mecanismos de splicing, y esta circunstancia de salto de exón produce que se restaure nuevamente el marco de lectura (Ginjaar et al., 2000; Flannigan et al., 2010).

1.3.6.2. TIPOS DE MUTACIONES DEL GEN DMD.

La distribución de las mutaciones en la base de datos Leiden (www.dmd.nl, Aartsma-Rus et al., 2006) con más de 4700 pacientes analizados es la siguiente:

- Deleciones 72%.

- Duplicaciones 7%.

- El resto (20% aproximadamente) de los casos aportados presentan pequeñas deleciones, inserciones o mutaciones puntuales.

La alteración más frecuente del gen de la distrofina son las deleciones intragénicas que suponen aproximadamente el 65% de las mutaciones del gen DMD. Las deleciones y, más raramente, las duplicaciones pueden ocurrir en cualquier localización dentro del gen DMD; a pesar de ello, hay dos zonas de especial concentración de mutaciones denominadas “*zonas calientes*”; localizadas en torno a la parte central del gen y al extremo 5' terminal:

La zona donde más mutaciones se han descrito incluye los exones 45 a 53.

Las duplicaciones se localizan con más frecuencia en otra zona de menor tamaño comprendida entre los exones 2 a 20 (www.dmd.nl). El mecanismo que explica por qué las mutaciones se enmarcan en estas dos zonas calientes en el gen DMD no está bien establecido, y se cree que tiene que ver con la disposición especial de la cromatina en el brazo corto del cromosoma X (Xp21).

En un 20% de los casos las mutaciones son deleciones de pequeño tamaño, inserciones o mutaciones puntuales. La gran mayoría de ellas conllevan rupturas del marco de lectura o producen codones sin sentido; además en un alto porcentaje se producen mecanismos de splicing del ARNm que alteran los lugares habituales de splicing o producen la activación de lugares de splicing crípticos.

Las mutaciones tipo missense localizadas en el dominio rico en cisteína que se une al β distroglicano causan DMD, mientras que las mismas localizadas en el extremo N-terminal y de las que se espera que rompan la estructura tridimensional de los fragmentos fijadores de actina, se han descrito en 2 pacientes con fenotipo DMB.

Las deleciones en la zona caliente 45-53 afectan a parte del dominio central y las deleciones en la zona caliente 2-20 pueden eliminar lugares de fijación a la actina y parte del dominio central.

1. INTRODUCCIÓN

En el extremo N-terminal de la distrofina se sitúan los lugares de fijación a actina, que son muy importantes para el mantenimiento de la arquitectura de la fibra muscular; en caso de mutación tipo missense, un solo cambio de aminoácido en esta zona hace que el fenotipo obtenido sea de DMD, se produce una reducida cantidad de distrofina que es incapaz de ejercer su función de molécula puente. Sin embargo, en pacientes con delección de exones del 3 al 25 que no afectan al marco de lectura se producen cantidades normales de una distrofina corta pero con capacidades funcionales normales.

Se han descrito delecciones en el dominio central de la distrofina de gran tamaño pero con fenotipo clínico medio (figura 3); el ejemplo más notable ha sido la identificación de un paciente con una delección dentro de marco del 46% que afecta a la codificación de la distrofina y tiene clínica de DMB; estas observaciones sugieren que el dominio central no es más que un “espaciador” entre el dominio rico en cisteína y el extremo C-terminal, y la alteración de esta región lo único que supone es un acortamiento del puente entre dos regiones funcionales sin efecto real sobre el funcionamiento de la proteína.

En los pacientes con clínica de DMD se han descrito muy pocas mutaciones tipo missense, sin embargo, sí se han descrito dos sustituciones de aminoácidos en el dominio rico en cisteína con repercusión fenotípica severa: la sustitución de un residuo de cisteína en posición 3340 por una tirosina reduce las cantidades de distrofina detectables, esta mutación cambia uno de los residuos coordinadores del dominio ZZ afectando a los lugares de unión de la distrofina con el β distroglicano; y en otro caso constatado se produce la sustitución de un aspartato por una histidina en la posición 3335, esta mutación también cambia la afinidad del sitio de fijación al β distroglicano y aunque se detecta distrofina en cantidades y posiciones adecuadas, el fenotipo mostrado por el paciente es severo. Curiosamente, el dominio rico en cisteína nunca se altera en pacientes con DMB, parece ser que es un dominio crítico para la función de la distrofina.

Se ha descrito un mínimo número de casos con afectación del extremo C-terminal, se detectan cantidades de distrofina de corta longitud pero no funcional, por lo que se produce un fenotipo de enfermedad severo; hechos que ponen de manifiesto la crucial importancia tanto del dominio rico en cisteína como del C-terminal y sus presumibles implicaciones en la interacción de la distrofina y las proteínas del complejo de proteínas asociado a distrofina.

Finalmente se han descrito casos de miocardiopatía ligada a cromosoma X causada por mutaciones en el gen DMD; no se produce distrofina en las células miocárdicas pero se mantiene la expresión de la misma en las células del músculo esquelético. Esta alteración está producida por mutaciones del promotor específico M del músculo cardíaco.

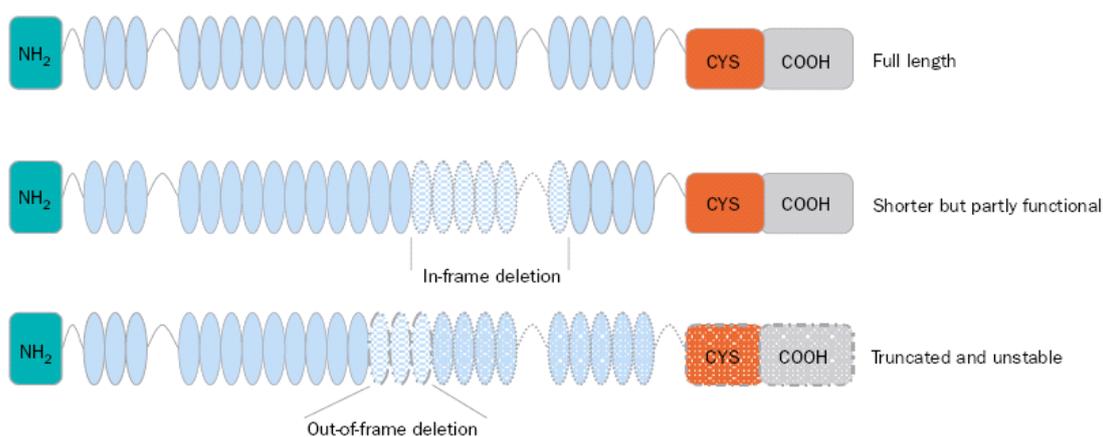


Figura 3: Efectos de distintas mutaciones en la Distrofina. Proteína completa en la imagen superior. Una delección que mantiene el marco de lectura y no afecta al dominio rico en cisteína ni al extremo COOH en la imagen del centro. Una delección que altera el marco de lectura y no afecta al dominio rico en cisteína ni al extremo COOH en la imagen del centro. Una delección que altera el marco de lectura, afecta al dominio rico en cisteína y al extremo COOH y produce una distrofina inestable que se degrada rápidamente en el músculo, en la imagen inferior.

1.3.6.3. EXCEPCIONES A LA TEORÍA DEL MARCO DE LECTURA.

A pesar de lo enunciado en el apartado anterior, también hay casos descritos en la literatura en los que las mutaciones analizadas no siguen la “Teoría del Marco de Lectura”: pacientes con DMB con mutaciones que afectan al marco de lectura, pacientes con DMD con mutaciones que no afectan al marco de lectura, pacientes en los que se describen eventos de salto de exón y pacientes con ciertas mutaciones puntuales (Muntoni et al., 2003).

El diagnóstico molecular y asesoramiento genético en estos pacientes es complicado, especialmente en niños de corta edad sin historia familiar previa. La razón de la discrepancia en los fenotipos observados no está del todo bien explicada, según el tipo de salto de exón se puede crear un ARNm grande que respete el marco de lectura y produzca una proteína funcional. En estos pacientes la biopsia muscular puede ayudar a verificar si hay o no distrofina funcionando, información que se debe usar para asesoramiento clínico en la predicción de la severidad del cuadro.

Los mecanismos por los cuales se produce el salto de exón en pacientes con mutaciones que suponen la ruptura del marco de lectura no son muy conocidos y se consideran causados por múltiples factores. Los eventos de salto de exón limitados a unas cuantas fibras musculares se han identificado en ratones deficitarios mdx y en aproximadamente

el 50% de los niños con DMD. Sin embargo, gran cantidad de pacientes con mutaciones que afectan al marco de lectura son capaces de producir una cantidad apreciable de distrofina. Los saltos de exón ocurren, con más frecuencia en regiones particulares del gen DMD sin relación directa con el tipo y tamaño de las deleciones que ocurran en los exones, la gran mayoría de los intrones de este gen son de gran tamaño, y casi invariablemente, los puntos de ruptura van a ocurrir dentro de zonas intrónicas, de modo que pacientes con mutaciones similares pueden tener puntos de ruptura intrónicos diferentes; las secuencias intrónicas así afectadas pueden modificar los fenómenos de splicing en el gen: la mutación se localiza en la parte del intrón necesaria para que la maquinaria de splicing produzca un salto del exón y, el salto del exón en estos casos, hace que se pueda restaurar el marco de lectura y se produzca una distrofina más corta, pero funcional.

A partir de la clonación de la cadena complementaria de ADN para la proteína distrofina se han creado infinidad de sondas para el screening del gen DMD. Fue el equipo de Monaco (Monaco et al., 1986) en 1986 el primero en describir porciones del ADN complementario (ADNc) para el gen DMD. La clonación completa de la cadena ADNc del gen la realiza el equipo de Koenig (Koenig et al., 1987) en 1987 y se propone el modelo genómico preliminar de organización del gen tanto en población sana como en afectados. Estos estudios revelan rápidamente que aproximadamente el 64% de las mutaciones son grandes deleciones y un 6% se deben a duplicaciones. La localización de las mutaciones mediante southern blot y las técnicas de PCR multiplex demostraron que la gran mayoría de ellas se concentran en las dos zonas calientes del gen (Exones del 2 a 20 y del 45 a 53; Koenig et al., 1988). Entre los años 1988 y 1990 Chamberlain (Chamberlain et al., 1988) y Beggs (Beggs et al., 1990) proponen el análisis mediante PCR multiplex como técnica de diagnóstico molecular: es un análisis directo que permite la detección rápida de deleciones en 18 exones del gen DMD; de las deleciones diagnosticadas con southern blot, más del 95% se pueden detectar también mediante técnicas de PCR multiplex, ganando en rapidez diagnóstica y seguridad en el consejo genético de la mayoría de las familias de afectados (Chamberlain et al., 1992).

En 1991 Gallano (Gallano et al., 1991) realizaron los primeros estudios en España en familias afectadas y describieron que un 41% de ellas estaban afectadas de deleciones, cifra que suponía un incremento en el 81% sobre el número de las deleciones previamente diagnosticadas usando técnicas de ADN complementario (ADNc).

En 1995 Prior (Prior et al., 1995) describen el espectro de pequeñas mutaciones que afectan al gen DMD mediante el uso de PCR heterodúplex, demostrando que la distribución de las mutaciones puntuales no se ciñe a las denominadas zonas calientes del gen DMD, sino que éstas siguen un patrón de distribución aleatorio.

1.3.6.4. SECUENCIA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN Distrofia Muscular de Duchenne Becker.

El estudio de mutaciones del gen DMD se debe iniciar por la detección de grandes deleciones del mismo, por ser éstas la causa más frecuente de patología. Hay técnicas que permiten analizar deleciones, duplicaciones y algunas mutaciones puntuales simultáneamente. Si tras este tipo de estudios no se detectan alteraciones moleculares, deben investigarse cambios en nucleótidos (sustituciones, inserciones o deleciones de bases) pero dado el gran tamaño del gen, este tipo de estudios son complejos. Recientemente el análisis HR-MCA (High Resolution Melting Curve Analysis) se ha validado como método de preselección para la detección de variantes de pequeño tamaño en pacientes y portadoras (Almomani et al., 2009).

Los test más usados actualmente para el diagnóstico de mutaciones del gen DMD son:

- PCR Multiplex
- Single condition amplification/Internal Primer sequencing (SCAIP)
- Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)
- Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH)

MLPA es el método de diagnóstico molecular más empleado actualmente para la caracterización de la DMDB, permite la detección simultánea de deleciones y duplicaciones de los 79 exones del gen DMD, esta técnica es de una utilidad muy superior a la de otros métodos, tales como southern-blot, PCR cuantitativa, MAPH (Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation) o la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), tanto en el diagnóstico del caso índice como en el de portadoras (Gatta et al., 2005). Presenta limitaciones a la hora de la detección de mutaciones puntuales que pueden ponerse de manifiesto como deleciones en un solo exón del gen DMD ya que la sonda correspondiente a ese exón no puede hibridar con el mismo y produce la pérdida del pico de electroforegrama correspondiente al mismo, es por ello que en el caso de que se diagnostiquen deleciones de un solo exón mediante MLPA se requiera confirmación mediante otra técnica de diagnóstico molecular.

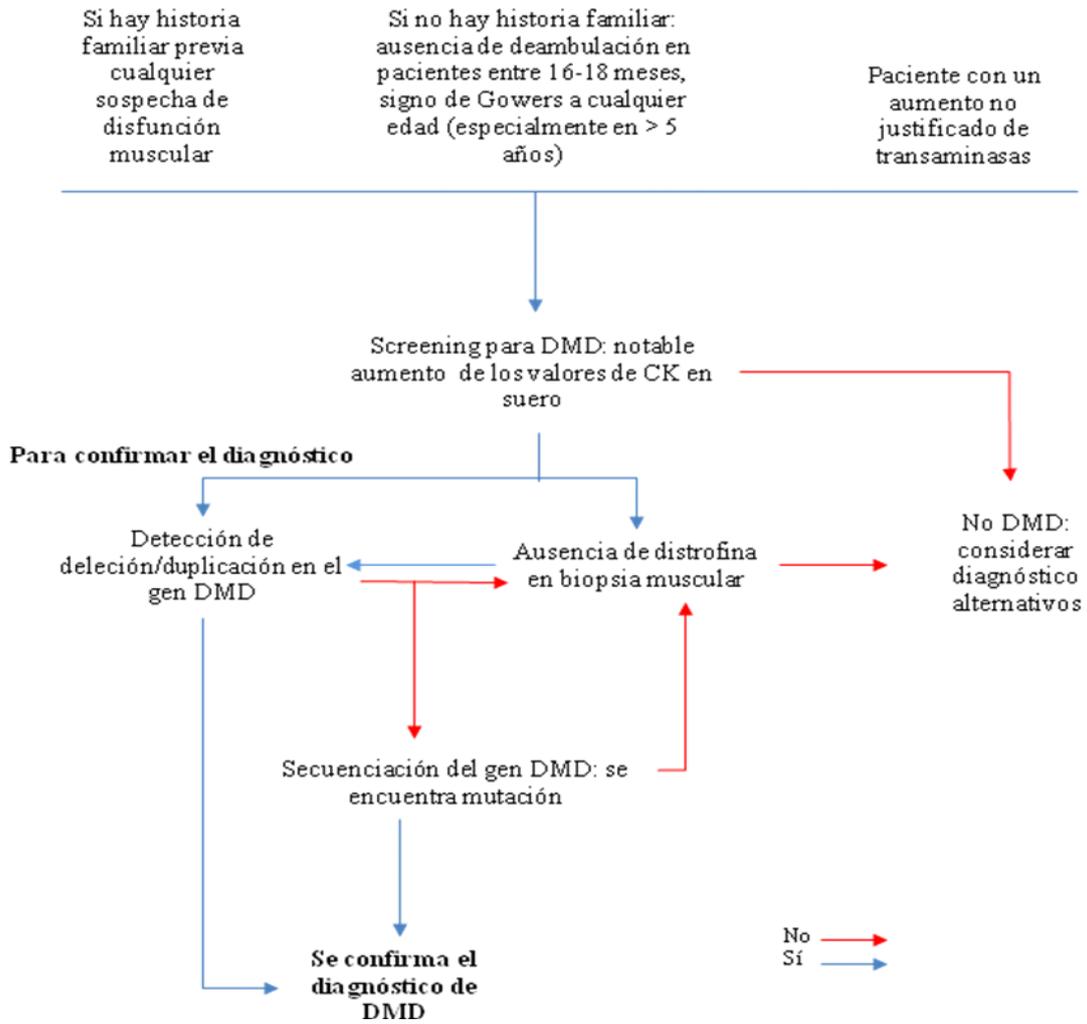
La caracterización exacta de las mutaciones (punto exacto de mutaciones puntuales, extensión de deleciones y duplicaciones,...) se hace cada vez más útil tanto para el establecimiento de la correlación fenotipo-genotipo como para la probable aplicación de terapia genética.

1. INTRODUCCIÓN

Si el test genético pone de manifiesto mutaciones en el gen DMD no es necesario realizar biopsia muscular confirmatoria. Si el paciente presenta elevación de las cifras de CK en suero y signos y síntomas de DMD pero el test genético es negativo, el siguiente paso diagnóstico es la realización de la biopsia muscular.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Algoritmo para confirmación diagnóstica de DMDB.



Después del diagnóstico:

- En pacientes diagnosticados mediante biopsia muscular, es obligatorio realizar test genético.
- En pacientes diagnosticados mediante test genético, la biopsia muscular es opcional para distinguir fenotipos incompletos de la enfermedad.
- Los pacientes con diagnóstico positivo se redirigen para evaluación y tratamiento multidisciplinar.
- Se recomienda consejo genético para cualquier mujer de la familia en riesgo.

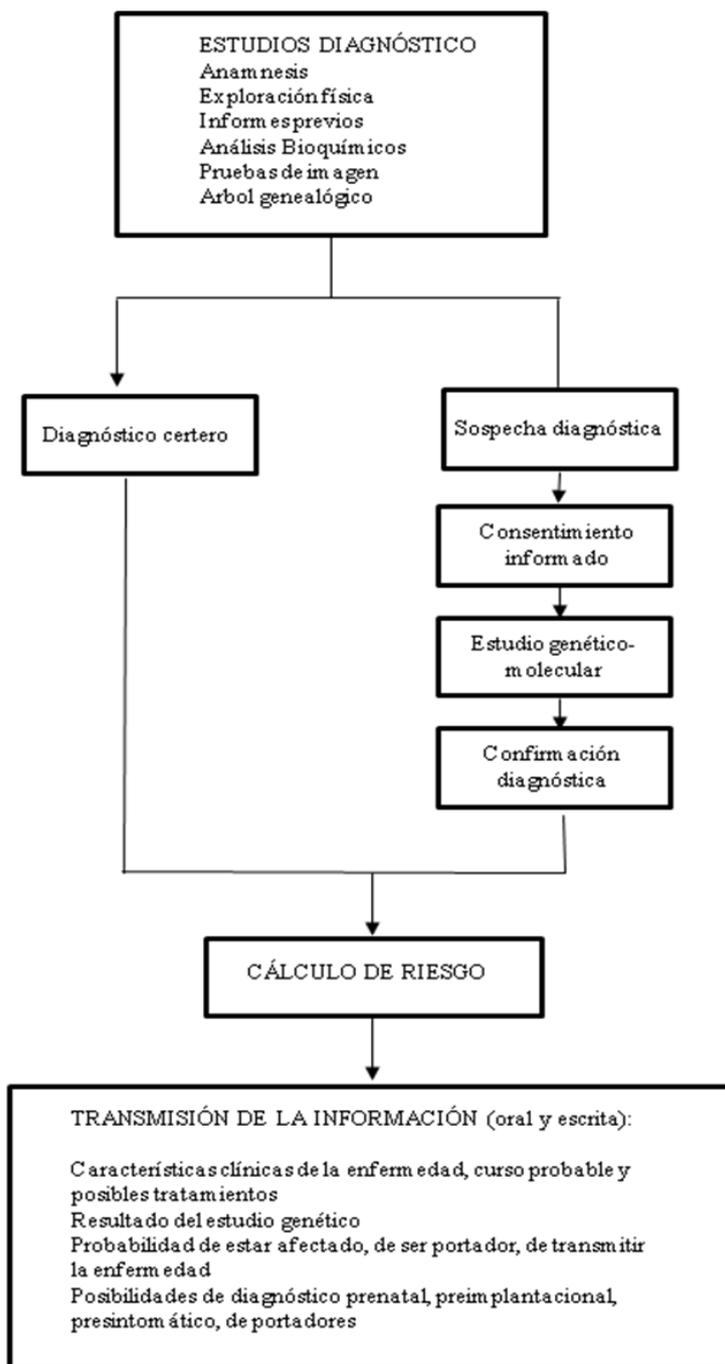
1. INTRODUCCIÓN

- Es necesario ofrecer a la familia y al paciente el apoyo de asociaciones de enfermos y familiares.

1.4. ESTUDIO FAMILIAR. ASESORAMIENTO GENÉTICO.

La DMDB es una enfermedad incurable de mal pronóstico en el caso de las formas más severas, por tanto, es necesario un diagnóstico precoz y fiable que permita un adecuado asesoramiento genético para así minimizar las posibles repercusiones de la patología a nivel personal y familiar. El diagnóstico de un afectado de mutación requiere la realización del estudio familiar completo por parte de un genetista o asesor genético y debe incluir la elaboración de un genograma con el registro de todos los pacientes afectados ya conocidos, aquellos que presentan clínica compatible pero aún no tienen diagnóstico confirmatorio, las relaciones interfamiliares entre ellos y si hay o no consanguinidad entre los progenitores o sus predecesores.

Tabla 3. Algoritmo diagnóstico en DMDB.



1.4.1. CONSEJO GENÉTICO.

El consejo genético es el procedimiento destinado a informar a una persona sobre:

- Las posibles consecuencias de los resultados de un análisis o cribado genéticos, sus ventajas y riesgos.
- En el caso que sea necesario, asesorarla en relación con las posibles alternativas del análisis.
- Tiene lugar antes, después o en ausencia de una prueba o cribado genéticos (Ley de Investigación Biomédica, 14/2007, artº3; Council of Europe, chapter IV, article 8, Estrasburgo 2008).

El consejo genético considera el riesgo de aparición (ocurrencia) y el riesgo de repetición (recurrencia) de una enfermedad genética en una familia. Incluye tres pasos fundamentales: diagnóstico, evaluación del riesgo y transmisión de la información.

Un porcentaje importante de los diagnósticos de DMDB se deben a mutaciones “*de novo*” no diagnosticadas previamente en una familia. La elaboración de cálculos de recurrencia en estos casos depende de la combinación de las probabilidades teóricas con los antecedentes reproductivos de la madre.

La secuencia de estudio familiar viene condicionada por el diagnóstico molecular positivo para DMDB de un varón y sus antecedentes familiares.

1.4.1.1. MUTACIÓN *DE NOVO* EN UN VARÓN.

Las mutaciones “*de novo*” en varones sin historia familiar de la enfermedad suponen un reto diagnóstico por las consecuencias a nivel de asesoramiento genético que suponen: es el varón caso índice el que presenta los síntomas de DMDB pero la alteración molecular puede estar ya presente en su progenitora o en su abuela sin haber dado clínica de distrofia, y éstas pueden haberla transmitido a descendientes femeninas con una probabilidad del 50% para cada gestación, que a su vez tendrían un 50% de probabilidad de tener varones afectados de DMDB; es fundamental la caracterización molecular de las familiares de primer grado del caso índice.

Si se detecta una mutación “*de novo*” en un varón se realiza estudio de la mutación en la madre del paciente y en sus hermanas; si el estudio es negativo en la madre, existe un

riesgo del 4,3% de que la mutación vuelva a ocurrir en un siguiente embarazo con feto varón debido a la posibilidad de que exista mosaicismo germinal en las células maternas (Helderman-van der Enden et al., 2003) (figura 4).

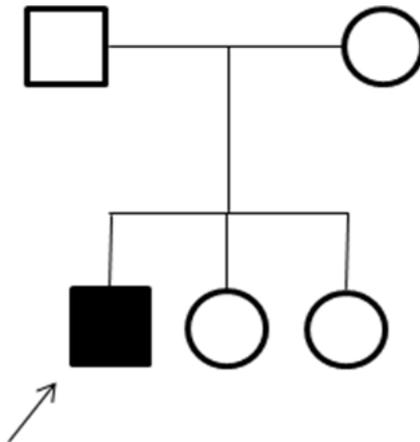


Figura 4. Genograma de una familia con mutación “de novo” diagnosticada en el hijo varón. El estudio materno es negativo. En este caso, se estima que el riesgo de recurrencia sería, en el supuesto de futuro feto varón, un 4,3% de presentar alteración molecular y en caso de feto femenino 4,3% de ser portadora de la misma.

1.4.1.2. MUTACIÓN EN MADRE PORTADORA DE VARÓN AFECTADO.

Si la mutación se diagnostica en la madre pero no en la abuela del caso índice estaríamos ante un caso de mutación “*de novo*” materna, por lo que las hermanas del afectado tendrían una posibilidad del 50% de ser portadoras de la mutación (figura 5).

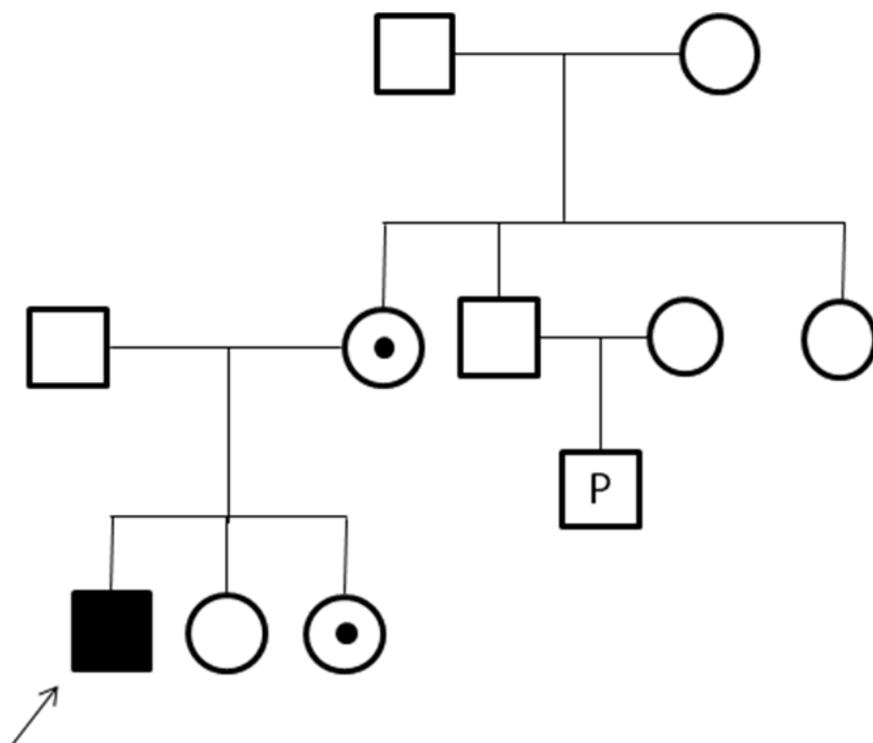


Figura 5. Genograma de una familia en las que se diagnostica mutación en el hijo varón y en su madre. Al ser la madre portadora de la mutación el riesgo de recurrencia se estima para un supuesto futuro feto varón en 50% y en caso de feto femenino 50% de ser portadora de la misma. El riesgo para los hermanos de la mujer portadora se estima en 4,3% al no poder descartarse la presencia de mosaicismo germinal en la abuela del caso índice.

1.5. DIANÓSTICO PRENATAL DE DMDB.

De modo general se admite que es necesario el estudio invasivo de una embarazada con sospecha de enfermedad genética independientemente de la edad cuando el riesgo de que el feto presente alteraciones severas sea, al menos, del mismo nivel que el riesgo de aborto o de otras complicaciones asociadas al procedimiento diagnóstico en sí mismo.

En el año 1985 Bakker (Bakker et al., 1985) realiza el primer diagnóstico prenatal de una portadora y su feto afectado de mutación mediante el uso de longitud de fragmentos de restricción proteica (RFLPs).

El diagnóstico prenatal ante una paciente gestante pueden generar las siguientes situaciones:

- Embarazada con antecedentes clínicos en familiares varones de DMDB sin diagnóstico molecular en ella ni en la familia: se realiza la detección de mutaciones en la gestante y si es positiva y el feto es varón se realiza estudio invasivo (en vellosidad corial o líquido amniótico según la semana de gestación en la que se encuentre).

- Embarazada con antecedentes familiares y diagnóstico molecular previo positivo: si el feto es varón se realiza prueba invasiva y test genético, si el feto es femenino se realizará el estudio de portadora cuando alcance la edad de 16 años.

- Embarazada con historia previa de hijo con DMDB por mutación “de novo”: se oferta también la prueba invasiva en estos casos por el riesgo de recurrencia en el caso de que pudiera tratarse de mosaicismo germinal (en vellosidad corial o líquido amniótico). En el caso de feto femenino, el estudio se demora hasta los 16 años.

1.6. DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL.

El diagnóstico genético pre-implantacional consiste en el estudio in vitro de las mutaciones del gen DMD en ovocitos y embriones de aquellas parejas con diagnóstico molecular positivo previo y que desean descendencia libre de enfermedad y de mutación y que no desean interrumpir el embarazo. El análisis molecular se realiza a partir de biopsia de corpúsculos polares o de embriones (blastómero o trofoectodermo):

- Biopsia de blastómero: el tercer día tras la fecundación, en etapa de 8 células. Lo habitual es tomar una sola célula y analizarla para no interferir con la viabilidad del embrión.

- Biopsia de blastocistos: el quinto día tras la fecundación, con el inconveniente de que la transmisión del blastocisto se realiza en el sexto día post-fecundación, por lo que el análisis debe realizarse de modo urgente.

- Biopsia del cuerpo polar o diagnóstico genético antes de la concepción: analiza el genoma de las células de origen materno y no requiere la manipulación posterior de embriones.

Este tipo de diagnóstico no está universalmente extendido, depende de los recursos y de la legislación de cada país y de las opciones en la cartera de servicios de los distintos centros sanitarios.

1.7. TRATAMIENTO DE LA DMDB.

En el momento actual no hay tratamiento específico para la DMDB, el uso de las distintas armas terapéuticas depende de la evaluación inicial del paciente de modo que se personaliza la atención en función de la clínica de inicio y la posterior evolución del cuadro. El manejo integral, con el objetivo de optimizar la calidad de vida, es de vital importancia en estos enfermos.

El tratamiento es multidisciplinar y se ven implicados gran cantidad de especialidades sanitarias: rehabilitación, ortopedia, cardiología, neurología, neumología, gastroenterología/nutrición, anestesia, psicología y genética.

1.7.1. EVALUACIÓN INICIAL Y SEGUIMIENTO.

Antes de iniciar el tratamiento se hace una revisión meticulosa del paciente; con distintas pruebas y basándose en escalas se evalúan la fuerza muscular, el rango de movimientos de las articulaciones y se realizan pruebas de respuesta motora con medición de tiempo, escalas de función motora y actividades de la vida diaria.

Es imprescindible la reeducación de todo el núcleo familiar, el soporte psicológico y la adecuación física del entorno que rodea al paciente.

1.7.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO (Bushby et al., 2010).

1.7.2.1. CORTICOSTEROIDES.

La corticoterapia prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes con DMDB (Houde et al., 2008; Manzur et al., 2008).

La PREDNISONA estabiliza las membranas celulares y de ahí su efecto antiinflamatorio en estos casos. La dosis habitual es de entre 0.75 y 1.5 mg/kg/día; actualmente se inicia la terapia con 0.75 mg/kg/día y después de 3 meses se instaura una dosis de mantenimiento que oscila entre los 0.5-0.6 mg/kg/día que se puede mantener durante 3 años más. En algunas ocasiones esta medicación se usa en días alternos.

Se ha demostrado que la terapia con corticoides prolonga la deambulacion de los pacientes durante 2 años más. Sin embargo los efectos secundarios incluyen el aumento

1. INTRODUCCIÓN

de peso, hipertensión, cambios de comportamiento, retardo de crecimiento, aspecto cushingoide y cataratas.

El DEFLAZACORT, derivado sintético de la prednisolona, se usa en Europa pero no está disponible en Estados Unidos; parece tener menos efectos secundarios que la prednisona sobre todo en relación a la ganancia de peso, teniendo ambos fármacos un efecto similar en la deceleración de la degeneración muscular. La dosis de deflazacort más efectiva es la de 0.9 mg/kg/día y se considera como de primera elección por presentar menos efectos secundarios con respecto al aumento de peso.

INICIO Y DURACIÓN DEL TRATAMIENTO: se recomienda el inicio con dosis bajas de corticoides al diagnóstico de la enfermedad, aunque no está totalmente aclarada su eficacia tan tempranamente. De modo habitual se indica el tratamiento en pacientes entre 5 y 15 años.

A los niños con DMD mayores de 5 años se les debe ofertar el tratamiento con prednisona hasta que se aprecie empeoramiento o estabilización de los síntomas motores. Hay que considerar el equilibrio entre beneficios y efectos secundarios para cada paciente.

La eficiencia del tratamiento con corticoides se mide con test periódicos de función muscular, de función pulmonar y una evaluación anual de la capacidad de deambulación. Además ha de evaluarse la aparición de efectos secundarios (aumento de peso, síndrome de Cushing, estatura corta, retardo del crecimiento y aumento de la frecuencia de fracturas...).

La dosis óptima de corticosteroides debe mantenerse mientras los efectos secundarios detectados no sean muy severos. La dosificación se puede ir modificando en función de la evolución clínica del paciente y su respuesta terapéutica.

1.7.2.2. OTROS FÁRMACOS.

Por consenso, se recomienda sólo el uso de corticoterapia en DMDB pero está extendido el uso de otros fármacos de los que no existe evidencia suficiente como para ser recomendados. Entre estos se encuentran la toxina botulínica para las contracturas, creatina, carnitina, aminoácidos, co-enzima Q10, extractos herbales,...

1.7.3. REHABILITACIÓN.

La rehabilitación va encaminada a la prevención de contracturas musculares y articulares, el mantenimiento de la potencia muscular en la medida de lo posible y evitar la aparición de alteraciones en el raquis. En cada fase del proceso se tomarán una serie de programas de ejercicio que se recomienda realizar de 4 a 6 veces por semana.

En estadios avanzados, los ejercicios se complementan con ortesis, cirugía de corrección y silla de ruedas cuando el paciente pierde la capacidad de deambulación.

1.7.4. TRATAMIENTO DE COMPLICACIONES CARDÍACAS.

En pacientes afectados de DMDB es recomendable la evaluación de la función cardíaca en el momento del diagnóstico o a la edad de 6 años, mediante electrocardiografía, ecocardiografía y/o Resonancia Magnética Nuclear cardíaca. En varones en los que se ha diagnosticado tempranamente miocardiopatía puede producirse remodelado ventricular, Jefferies (Jefferies et al., 2005) estudió una serie de pacientes de DMDB con edad media de 15 años, cuando se detectó miocardiopatía dilatada se inició tratamiento con un IECA; si en el control a los 3 meses del inicio del tratamiento no se apreció mejoría, se añadió un β -bloqueante que consiguió evitar y hacer regresar en un porcentaje alto de los casos la alteración cardíaca (66%) y detuvo la evolución del cuadro en otros (8%), en un 26% de los casos este tratamiento careció de efecto.

No está totalmente claro si este tratamiento hace regresar la miocardiopatía o sólo enmascara las manifestaciones de la misma (Duboc et al., 2005¹⁰³). La mayoría de especialistas tratan a sus pacientes con IECA y/o β bloqueantes. En casos de fracaso cardíaco también se incluyen tratamientos con diuréticos y digoxina. Se ofrece el trasplante cardíaco a pacientes con miocardiopatía dilatada severa y DMDB con pocas manifestaciones clínicas de enfermedad muscular.

1.7.5. EVALUACIÓN Y SOPORTE PSICO-SOCIAL.

El diagnóstico de un paciente con DMDB altera el los hábitos de vida familiares y relacionales del grupo familiar, por lo que es imprescindible una adecuada evaluación psicológica y asesoramiento por parte de especialistas entrenados en el manejo de pacientes y sus familiares. Hay, por tanto una serie de intervenciones psico-sociales recomendables en los pacientes afectados y sus familiares: entrenamiento paterno, terapia individual, terapias de familia, terapias de grupo, análisis dirigidos de conducta, terapia con antidepresivos, estabilizadores del ánimo y estimulantes e intervenciones para la mejor interacción social. Todas ellas van encaminadas a promocionar el bienestar del paciente y sus familiares, y favorecer la independencia y el autocuidado en la medida de lo posible.

1.8. NUEVAS TERAPIAS EN DMDB.

A pesar de que actualmente el tratamiento de la DMDB es meramente sintomático la esperanza de vida se ha incrementado desde 14.4 años en 1960 a 25.3 años en 1990 (Eagle et al., 2002) y en algunos pacientes la supervivencia se prolonga hasta los 40 años.

Las terapias aún en fase experimental que pretenden la restauración de la distrofina ausente están focalizadas en dos tratamientos basados en técnicas de Medicina Personalizada, en las que el tratamiento se aplica en función de la mutación específica detectada.

El tratamiento con salto de exón es especialmente prometedor, recientemente se ha iniciado un ensayo de fase III con 180 pacientes de 10 países diferentes. Este tratamiento se basa en la manipulación de la maquinaria de splicing con oligonucleótidos sin sentido (AON) de modo que uno o más exones se salten con el objetivo de restaurar el marco de lectura y se sintetice una proteína lo más parecida posible a la distrofina y que produzca un fenotipo medio de la enfermedad (Goemans et al., 2011).

Otros estudios y ensayos terapéuticos que se están realizando en la actualidad son fármacos estabilizadores de membranas (Drisapersen, PRO044 y PRO045, Eterlipsen,...), fármacos que actúan sobre la inflamación y la fibrosis (HGT4510, IGF-1 Increlex, SARM,...), fármacos que mejoran el flujo sanguíneo (Tadalafil, Isosorbide+Ibuprofeno), Fármacos que mejoran la función cardíaca (Idebenona Catena, Lisinopril, Eplerone, Carvedilol,...).



RESUMEN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. RESUMEN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El 1 de diciembre de 1999 se aprobó el primer Plan de Acción Comunitaria sobre las Enfermedades poco comunes, incluidas las de origen genético. Este programa estableció la definición de enfermedad rara para todas aquellas cuya cifra de prevalencia se encontraba por debajo de la cifra de 5 casos por cada 10.000 personas en la Comunidad Europea. Sin embargo, esta definición cambia para otros países y así en los EEUU se utiliza una cifra global de casos (menos de 200.000 casos para todo el país). Otros países prefieren utilizar una definición más restrictiva como menos de 4 casos por cada 10.000 en Japón o incluso menos de 2 casos por 10.000 habitantes; a pesar de que la Unión Europea marcó esta definición para todo su territorio, muchos países, sobre todo el Reino Unido, Dinamarca y Suecia mantienen criterios diferentes. El Comunicado de la Comisión emitido a finales de 2007, recomienda entre muchas de las acciones, utilizar una única definición para toda la Unión Europea, evitando así desigualdades de actuación en la provisión de los servicios sanitarios.

La Unión Europea también incluye en esta definición las condiciones raras (evolución o fenotipo diferente) de enfermedades no raras y añade un aspecto no ligado a la cifra de prevalencia, consistente en que tanto si es una enfermedad como una condición, debe tener un alto impacto en la mortalidad y/o producir graves deficiencias en la persona afectada.

Las últimas estimaciones acerca del porcentaje de enfermedades genéticas incluidas bajo esta definición informan de que al menos un 75% de las enfermedades raras tendrían este origen. La DMDB es considerada como una enfermedad rara, actualmente se estima que la prevalencia es de 5 por cada 100000 habitantes.

Las distrofias musculares de Duchenne y Becker (DMDB) son las entidades clínicas de origen genético más frecuentes entre las denominadas distrofinopatías, que se producen por alteraciones de la proteína distrofina esencial para la interacción entre el citoesqueleto de la fibra muscular y la matriz extracelular. Son entidades clínicas caracterizadas por el devastamiento físico y mental que producen en los afectados y su carácter hereditario. Es de vital importancia dilucidar en los estudios familiares la mutación causante de la patología y el mecanismo de transmisión con el objeto de realizar un adecuado consejo genético en cada caso. Las mujeres portadoras, transmiten la mutación a su descendencia con una probabilidad del 50%.

2. RESUMEN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde el punto de vista socio-sanitario el diagnóstico y tratamiento de una “enfermedad rara” supone cerca del 20% de los ingresos anuales de una familia afectada, y estos gastos se reparten entre la adquisición de medicamentos y otros productos sanitarios (50%), el tratamiento médico (43%), las ayudas técnicas y de ortopedia (30%), el transporte adaptado (27%), la asistencia personal (23%) y la adaptación de la vivienda (9%). Se estima que el coste que pacientes y familiares deben afrontar en la DMDB es de 94171 €, siendo esta cifra muy superior a las estimadas para otras enfermedades raras como el Síndrome de X Frágil (59824 €), el Síndrome de Prader Willi (57772€), la Fibrosis Quística (37343€), la Histiocitosis (30537€), la esclerodermia (18288€), la Epidermolisis Bullosa (33903€) y la hemofilia (19746€) (López J et al., 2012).

El gen responsable de la enfermedad se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp21), tiene un tamaño de 2.4 Mb y está integrado por un total de 79 exones. Es una enfermedad con transmisión ligada al cromosoma X, por tanto esta patología afecta a los varones, mientras que las mujeres son portadoras y transmisoras (patrón de herencia recesivo ligado a sexo). La incidencia en los distintos estudios es de 1:3500 en caso de Duchenne y 1:18000 en caso de Becker de entre todos los recién nacidos vivos varones. En 2014 Mah (Mah et al., 2014) realiza un análisis de los datos de prevalencia de DMDB (4.78 y 1.53 por 100000 para DMD y DMB respectivamente), concluyendo que no se pudo realizar un análisis de la incidencia de la misma por la escasez y disparidad de datos obtenidos. Estudios sobre la incidencia en España y, en especial, en Andalucía siguen siendo una asignatura pendiente; por lo que los datos que actualmente se siguen manejando corresponden a los obtenidos por Emery en 1991 (Emery AE, 1991). Los datos recogidos en Orphanet en 2014 estiman la prevalencia mundial en 5 por 100000 para DMD, no hay datos para DMB.

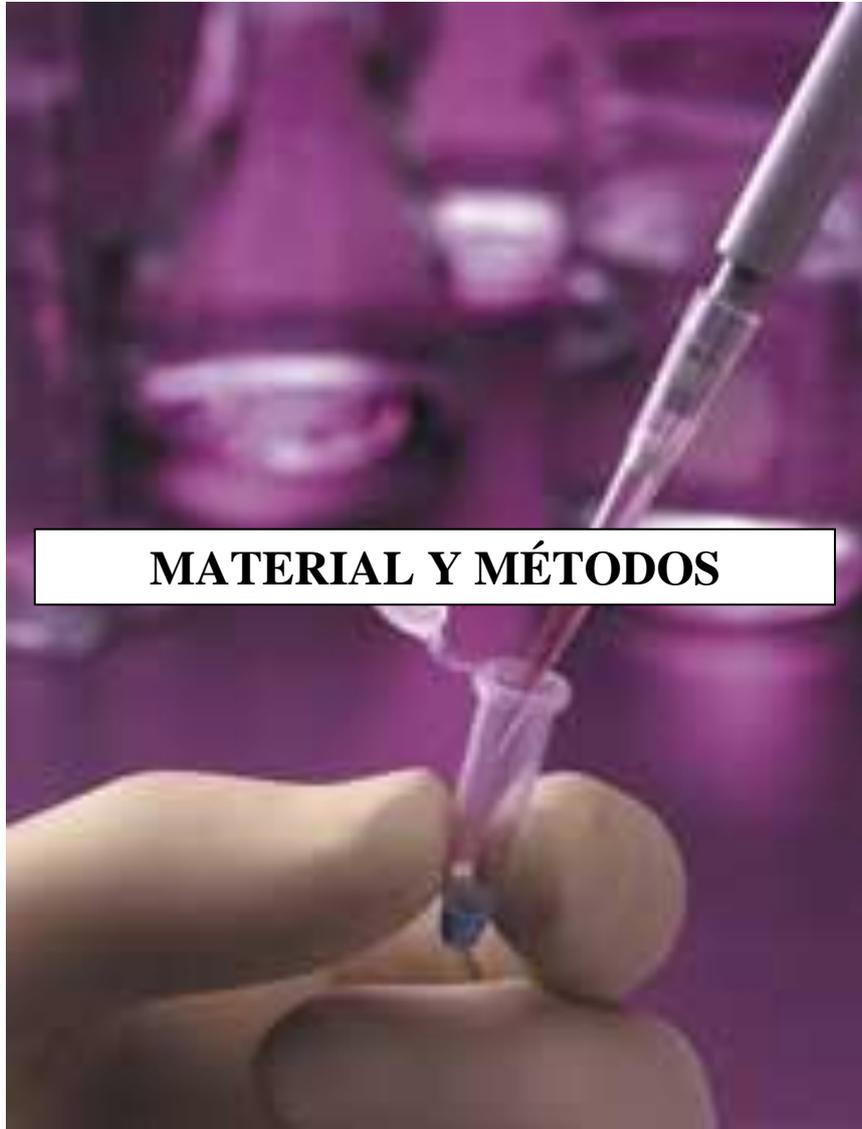
Se han descrito en la literatura 4000 variaciones conocidas del gen DMD. La mayoría de las mutaciones identificadas son deleciones (65-85%), duplicaciones (5-10%) o mutaciones puntuales (25-30%)^(4, 5, 6, 7) entre las que se incluyen deleciones de pequeño tamaño, inserciones y mutaciones puntuales. Las deleciones se producen con mayor probabilidad en dos zonas exónicas conocidas como “zonas calientes”: la comprendida entre los exones 44 al 53 y, en segundo lugar, la comprendida entre los exones 2 al 20. Desde el año 1987 se conoce que la mayoría de las mutaciones causantes de la

enfermedad de Duchenne se localizan, no de forma aleatoria, sino en 18 regiones preferentes del gen. El análisis de estas regiones usando distintos métodos (southern-blot, PCR cuantitativa, Multiplex Amplificable Probe Hybrydisation -MAPH- o hibridación in situ fluorescente) permite detectar alteraciones en solo un 20-30% de los 79 exones del gen *DMD*. El desarrollo reciente de la Múltiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA), técnica más empleada para el estudio de casos índice y de portadoras, permite la detección de deleciones y duplicaciones en todos los exones del gen *DMD*. Sin embargo, es importante confirmar la deleción de un único exón porque pueden existir mutaciones de pequeño tamaño (polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's), mutaciones puntuales) que pueden originar un falso positivo para la deleción usando la técnica de MLPA.

Haldane en 1935 afirma que un tercio de los pacientes afectados de DMD/DMB lo son por mutaciones de novo esporádicas en familia sin historia previa y esta proporción depende del sexo del paciente. Es crucial determinar si la mutación de un paciente es de novo o ha sido heredada de su madre para ofrecer el asesoramiento genético adecuado en cada caso.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la eficacia de la tecnología Multiplex Ligation Probe Amplification en la detección de deleciones y duplicaciones del gen de la distrofina en el diagnóstico molecular de varones afectados y de mujeres portadoras de Distrofia Muscular de Duchenne Becker.
2. Determinar la incidencia de Distrofia Muscular de Duchenne Becker en Andalucía debido a la falta de datos existentes a este respecto, por su importancia en los costes socio-sanitarios de esta enfermedad basados en los datos recopilados en este trabajo desde 2005 a 2013.
3. Diagnosticar y establecer el porcentaje de varones afectados por mutaciones de novo en el gen *DMD* ya que su conocimiento supone un dato fundamental en relación a un adecuado asesoramiento genético.



3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

En el presente trabajo se han estudiado un total de 186 muestras de sangre periférica de pacientes, extraídas por venopunción en tubo anticoagulado con EDTA (ácido etilendiamonotetracético) entre Febrero de 2005 y Mayo de 2013. También se han estudiado 4 vellosidades coriales obtenidas mediante técnica invasiva de mujeres gestantes con feto varón, portadoras y previamente diagnosticadas de mutaciones en el gen DMD. Los pacientes provienen de los Servicios de Neuropediatría y de Neurología de hospitales de Huelva, Málaga, Jaén, Almería y Granada. Las muestras han sido procesadas y analizadas en el Servicio de Genética de la Unidad de Gestión Clínica de Laboratorio del Hospital Universitario San Cecilio-Granada.

Los varones estudiados incluyen pacientes de fenotipo variable y con datos clínicos, bioquímicos, electromiográficos o anatomopatológicos de sospecha de DMDB. Los hallazgos clínicos en estos pacientes incluyen:

- Alteraciones en desarrollo motor.
- Aumento de enzima creatín kinasa (CK).
- Aumento injustificado de transaminasas.
- Caídas frecuentes.
- Antecedentes familiares de distrofia en pacientes varones asintomáticos (hijos de madres portadoras de mutaciones del gen DMD o familiares de pacientes con diagnóstico molecular o clínico de distrofia).
- Patrón electromiográfico compatible con distrofia.

Las mujeres estudiadas en este trabajo incluyen:

- Familiares de hasta tercer grado de pacientes con diagnóstico molecular de distrofia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Mujeres con alteraciones motoras.
- Mujeres con aumento injustificado de CK.
- Mujeres con hipertransaminasemia injustificada.
- Mujeres con antecedentes familiares en varones de distrofia sin diagnóstico molecular previo en la familia.

Los estudios se han realizado según las guías de actuación de la Declaración de Helsinki en cuanto a consideraciones éticas y todos los pacientes o sus representantes legales, en caso de minoría de edad, han firmado consentimiento informado para realización de estudios genéticos según el “Procedimiento de consentimiento informado de la Junta de Andalucía”. En cuanto a la obtención de muestras mediante realización de técnicas invasivas en gestantes se ha seguido igual protocolo.

3.2. TECNICA INVASIVA: BIOPSIA DE VELLOSIDAD CORIAL.

En la consulta de Asesoramiento Genético Prenatal se evalúa a pacientes gestantes con alteraciones moleculares previamente diagnosticadas. En este caso, tanto el Genetista como el Obstetra informan a la paciente de la técnica que se va a emplear para la obtención de la muestra, qué se pretende diagnosticar y las complicaciones asociadas a la técnica de extracción. La realización de una técnica invasiva y un estudio molecular precisa que se adjunte un volante de solicitud de estudio de mutaciones del gen DMD debidamente cumplimentado, una breve historia clínica en la que se detalle la alteración molecular a detectar y un consentimiento informado. En el caso de que la gestante presente Rh negativo, se administra una dosis de inmunoglobulina anti-D para evitar complicaciones derivadas de incompatibilidad Rh.

El lugar de punción se identifica mediante la realización de una ecografía transabdominal. Se limpia la zona de punción con gasa impregnada en alcohol antiséptico y se inyecta anestesia local. Se extraen varias vellosidades coriales que se examinan en placa de Petri para eliminar cualquier posible resto de tejido materno que pudiera contaminar la muestra, se vierte en tubo estéril de 20 ml de fondo cónico con medio de transporte RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) facilitado por el laboratorio.

Una vez realizada la extracción, se realiza un control ecográfico para comprobar la ausencia de complicaciones inmediatas derivadas de la técnica.

La muestra se envía de modo inmediato al laboratorio de Biología Molecular. Si el envío no es posible antes de las 24 horas siguientes, la muestra se conserva a temperatura entre 2-10°C (nunca congelada) protegida de la luz solar y no se debe demorar el envío más de 72 horas.

3.3. FASE PREANALÍTICA: RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS.

En la Unidad de Genética se reciben las muestras acompañadas de la solicitud y el consentimiento informado correspondiente. Las muestras se registran en el sistema informático OMEGA 3000 y se digitalizan los documentos acompañantes (volante de solicitud, consentimiento informado e historia clínica resumida). Se garantiza la protección de datos y archivos de acuerdo con la Ley Oficial de Protección de Datos (LOPD).

Se siguen los siguientes pasos:

- Se comprueba la correspondencia de la solicitud de análisis molecular con la muestra recibida y los datos del paciente. La identificación del paciente se realiza siempre que es posible mediante el NUSHA (número único de historia de salud de Andalucía).
- Se comprueba que el documento de consentimiento informado está correctamente datado y firmado.
- Se identifica cada una de las muestras con un número de registro personalizado para el laboratorio de genética.
- Se comprueba la idoneidad de la muestra y, en el caso de presentar algún criterio de rechazo, se contacta con el servicio solicitante y se recomienda la extracción y el envío de una nueva muestra, dejando constancia de tal circunstancia en el registro de incidencias analíticas del Laboratorio de Biología Molecular.
- Causas de rechazo de las muestras:
 - Identificación inadecuada del paciente.
 - Ausencia de consentimiento informado.
 - Contenedor de muestra inadecuado.
 - Transporte inadecuado.
 - Contenedor de muestra alterado o manipulado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- En el caso de tratarse de estudios en biopsia de vellosidad corial la presencia de restos deciduales maternos puede constituir motivo de rechazo.

3.4. FASE ANALÍTICA.

3.4.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN.

El ADN para el análisis genético se extrae de leucocitos de sangre periférica obtenida mediante venopunción y colectada en tubo anticoagulado con EDTA (figura 7). Previo al proceso de extracción, se realiza la homogenización de la muestra mediante agitación suave durante 20 minutos.



Figura 7. Tubo EDTA empleado para la muestra de sangre periférica que se emplea para la extracción de ADN.

3.4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE VELLOSIDAD CORIAL PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.

El ADN genómico se extrae a partir de 3-5 gr de vellosidad corial limpia (figura 8), con una pipeta Pasteur estéril se coge una pequeña cantidad de tejido y se traspara a un tubo eppendorf de 2.5 ml; esta porción de tejido fetal requiere digestión previa a la extracción de ADN.

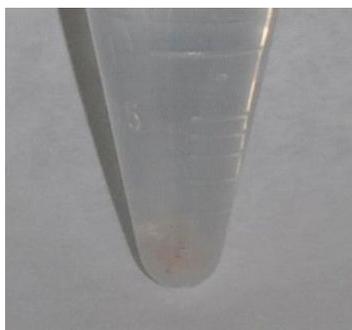


Figura 8. Tubo estéril para transporte de vellosidades coriales empleadas para estudios prenatales.

Protocolo de Digestión de Vellosidades Coriales:

- De la muestra de vellosidad corial, con pipeta Pasteur estéril y en un tubo de 1.5 ml se ponen una o dos vellosidades limpias, sin restos hemáticos ni medio de transporte.

- Al tubo se añaden 180 μ L de buffer ATL (Animal Tissue Lysis) y 20 μ L de Proteínasa K junto a las vellosidades.

- Se cierra adecuadamente el tubo para evitar contaminación y se aplica vórtex suave para homogeneizar la mezcla.

- Se coloca el tubo en la estufa de incubación a 56°C durante, al menos, 8 horas. Una vez terminada la digestión, se comprueba que el producto de la digestión de las vellosidades está limpio y no presenta restos tisulares, el producto resultante se emplea para realizar la extracción de ADN.

3.4.3. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE TOTAL Y VELLOSIDAD CORIAL.

Para realizar la extracción de ADN se usa el extractor automático QIAcube® (figura 9), que es una metodología rápida y de resultados inmediatos completamente automatizada. Una vez preparadas las muestras se procede a la extracción de ADN genómico según el protocolo del extractor automático. En estos casos, se emplea el mismo protocolo de extracción para muestras sanguíneas y muestras de vellosidad corial.



Figura 9. Imagen del QIAcube® para la extracción automática de ADN.

Se identifican cada uno de los tubos y elementos que se van a usar durante el procedimiento con el número de muestra a la que se le va a realizar la extracción: tubo de 2.5 ml, tubo de 2 ml con tapón de rosca, tubo de 1.5 ml y columna de QIAgen. Todos estos elementos forman parte de unos adaptadores especiales (uno por muestra) para el rotor de QIAcube. Se requiere además un tubo eppendorf de 2.5 ml con la cantidad de proteasa necesaria según las muestras que se procesen (figura 10).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

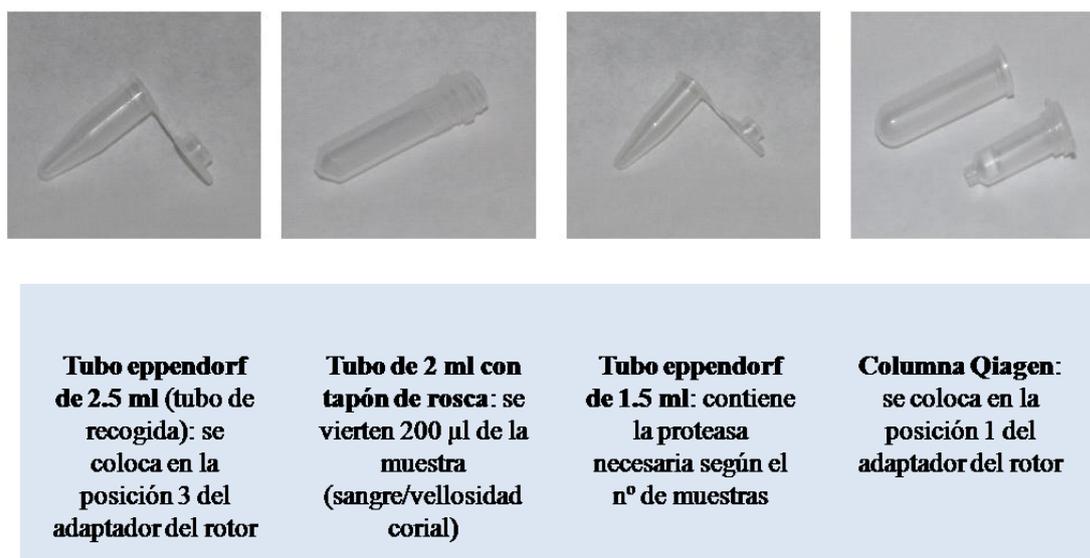


Figura 10. Material desechable necesario para la extracción de ADN de sangre periférica y vellosidad corial.

Tabla 4. Cantidades de proteasa necesarias para la extracción de ADN según el número de muestras a procesar.

Número de muestras	Volumen de Proteasa (μ L)	Número de muestras	Volumen de Proteasa (μ L)
2	68	7	176
3	90	8	198
4	111	9	219
5	133	10	241
6	155	12	284

En el tubo de 2 ml con tapón de rosca se añaden 200 μ L de cada una de las muestras (sangre total o producto de digestión de la vellosidad corial).

Los tubos de recogida (2.5 ml) y columnas de centrifugación se colocan en las posiciones correctas en cada adaptador del rotor (figura 11) tal y como se describe en el protocolo. La tapa de la columna de centrifugación y la del tubo de colección se insertan

3. MATERIAL Y MÉTODOS

en las ranuras del borde del adaptador. Para facilidad de uso y alta seguridad del proceso, los adaptadores del rotor solo pueden encajar en los cubos de la centrífuga del QIAcube en una posición. El tubo con la proteasa se coloca en el extractor en la posición A, y la tapa del tubo se introduce en la ranura correspondiente. Se comprueban los niveles de buffers (buffer ATL, buffer AE, buffer AW1, buffer AW2 y alcohol) (figuras 12, 13 y 14). Cada vez que se procesa una tanda de muestras se cambia el agua desionizada estéril autoclavada. Se colocan protectores de salpicaduras de silicona en la parte superior del bastidor agitador para prevenir la contaminación cruzada y dos bastidores de puntas estériles en la mesa de trabajo: puntas de 200 y 1000 μ l.

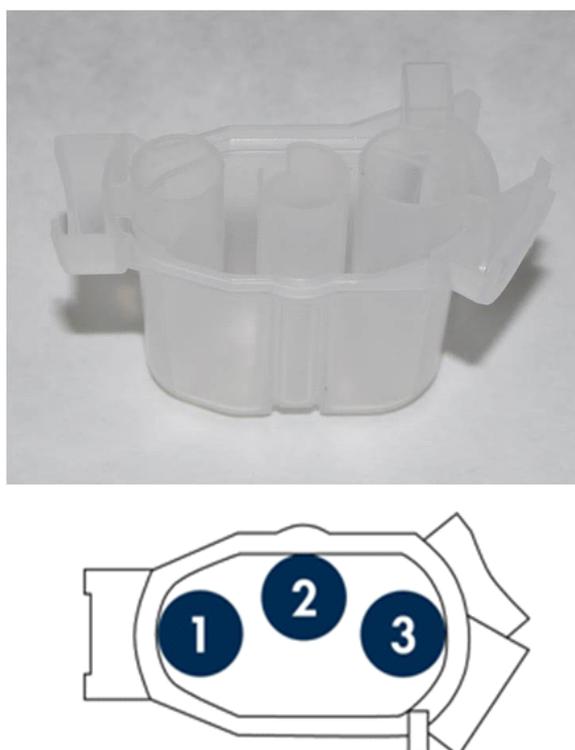


Figura 11. Imagen y esquema del adaptador para el rotor de QIAcube®. En la posición 1 indicada en la figura esquemática se coloca la columna con filtro, en la posición 3 se coloca el tubo que contendrá el eluido de ADN.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

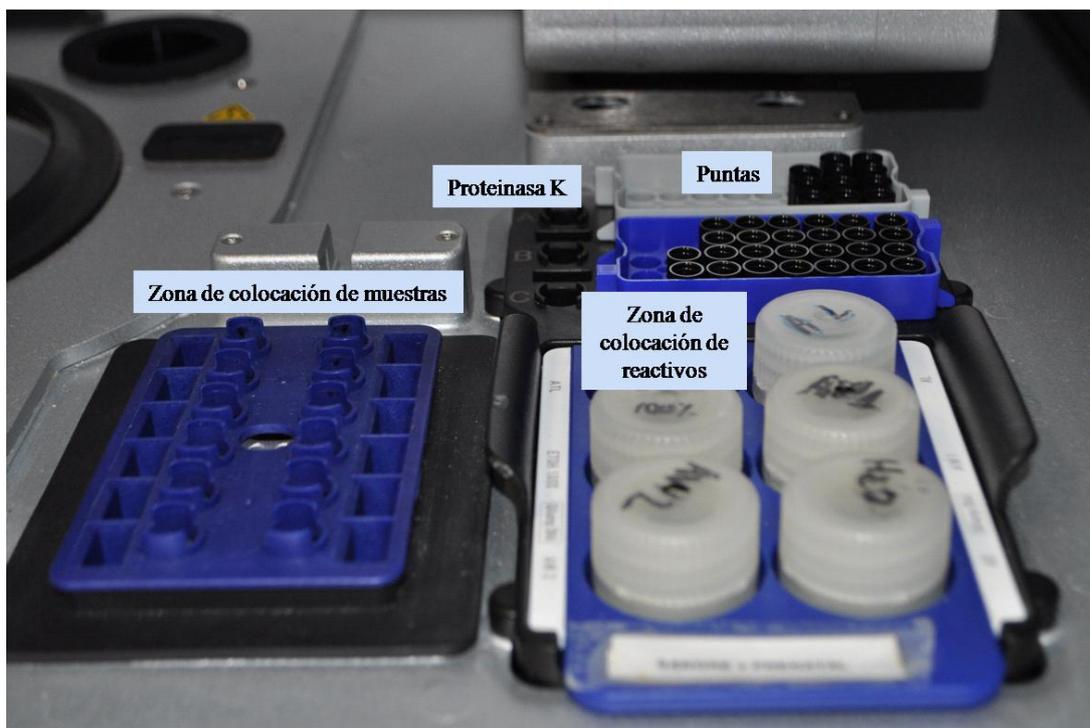


Figura 12. Zona de trabajo de QIAcube® en la que se muestran la disposición de los distintos elementos que se usan en la extracción automatizada de ADN.

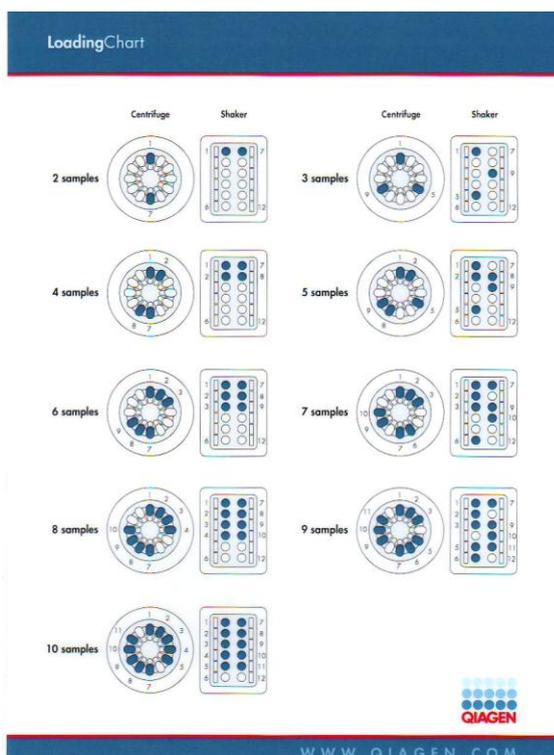


Figura 13. Esquema de colocación de muestras en el área de trabajo (rotor y gradilla de muestras) de QIAcube®.



Figura 14. Rotor orbital con cubas de centrifuga donde se colocan los adaptadores.

Se selecciona el protocolo de trabajo “**dna 200 μ L elution**” en la pantalla de QIAcube® siguiendo las instrucciones que en cada momento va marcando.

La extracción de ADN con el extractor automático sigue los mismos pasos que en un procedimiento manual: lisis, lisado, lavado y eluido. Las muestras se someten a lisis en el agitador orbital que se calienta durante el proceso. Cada lisado se transfiere a una columna de centrifugado en el rotor adaptador correspondiente. El lisado se lava previamente, se transfiere a la posición media del adaptador. Los ácidos nucleicos se unen a la membrana de sílice o resina de purificación de la columna de centrifugado y se lavan eliminando posibles contaminantes. La columna de centrifugación se transfiere a un tubo de recogida para la elución de los ácidos nucleicos purificados.

3.4.3.1. Valoración de la concentración y la pureza del ADN extraído.

Una vez realizada la extracción de ADN se determina la concentración del mismo en cada eluido y su pureza para garantizar la calidad del análisis posterior; los protocolos de trabajo para MLPA recomiendan una concentración de ADN superior a 20 ng/ μ L. Las concentraciones de ADN de las muestras se determinan mediante espectrofotometría con analizador NanoDrop 2000 Spectrophotometer® (figura 15).



Figura 15. Espectrofotómetro NanoDrop 2000 Spectrophotometer®.

La cuantificación de ADN se realiza midiendo la absorbancia (A) a una longitud de onda de 260 nm, una unidad de absorbancia equivale, aproximadamente, a 50 ng/ μ L de ADN de doble hebra. Para determinar la pureza del ADN se calcula la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}) que debe estar entre 1.7 y 1.9, si este cociente fuera menor indica contaminación por proteínas no ADN y habría que realizar un proceso de purificación o realizar una nueva extracción.

3.5. MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION (MLPA): ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA DISTROFINA.

3.5.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.

La MLPA (figura 16) es una técnica descrita por Schouten en 2002 (Schouten et al., 2002), fundamentada en un procedimiento de cuantificación relativa en una reacción de PCR múltiple. Se usa para determinar el número de copias de 50 secuencias de ADN en una sola carrera multiplex. Cada reacción de MLPA resulta de la combinación de una única PCR de amplificación de fragmentos entre 64 y 500 nucleótidos de longitud tipificados y cuantificados mediante electroforesis capilar.

La técnica se basa en el uso de dos sondas de oligonucleótidos; si la sonda secuencia diana está presente en la muestra, las dos sondas de oligonucleótidos hibridan próximas la una a la otra. Los oligonucleótidos hibridados se unen mediante la acción de enzimas ligasas termoestables. El producto de ligamiento se amplifica por PCR (reacción que permite incluso la amplificación de un solo par de sondas). El producto del amplificado (130-490 nucleótidos) se analiza mediante electroforesis capilar; se obtiene un electroforegrama característico en el que cada pico obtenido representa el producto amplificado correspondiente a cada exón. Las áreas para cada pico cuantifican la cantidad de producto de PCR obtenido para cada sonda.

Las alteraciones detectables mediante MLPA hacen referencia a variaciones relativas producto de la comparación de los datos obtenidos para la muestra problema con los datos de las muestras de control por lo que las condiciones de análisis en ambos tipos de muestras tienen que ser idénticas y cada vez que se realiza el análisis de mutaciones mediante esta técnica, junto a las muestras problema se analizan tres muestras control de individuos sanos no afectados de mutación previamente seleccionados.

El análisis final de los fragmentos obtenidos tras la PCR se realiza en un equipo de electroforesis capilar.

La MLPA es una técnica de análisis que permite de modo general:

- Detectar cambios en el número de copias.
- Determinar el estado de metilación de regiones de promotores y marcadores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Cuantificar de modo relativo el ARN mensajero.
- Detectar nuevas mutaciones puntuales y SNP's (polimorfismos de un solo nucleótido, discriminación de secuencias que difieren en un solo nucleótido).

La técnica de MLPA presenta limitaciones para el diagnóstico de DMDB en el caso de pacientes afectados de una sola mutación puntual en un exón: un cambio puntual de nucleótido impide que se produzca la hibridación de la sonda complementaria en el exón donde se sitúa el cambio por lo que no se obtendría amplificación para ese exón y puede parecer que estamos ante la delección de un exón, en estos casos en los que se diagnostica la delección de un solo exón es necesario realizar pruebas confirmatorias mediante otros métodos de análisis, en nuestro caso esta confirmación se realizó mediante gel de electroforesis horizontal (agarosa).

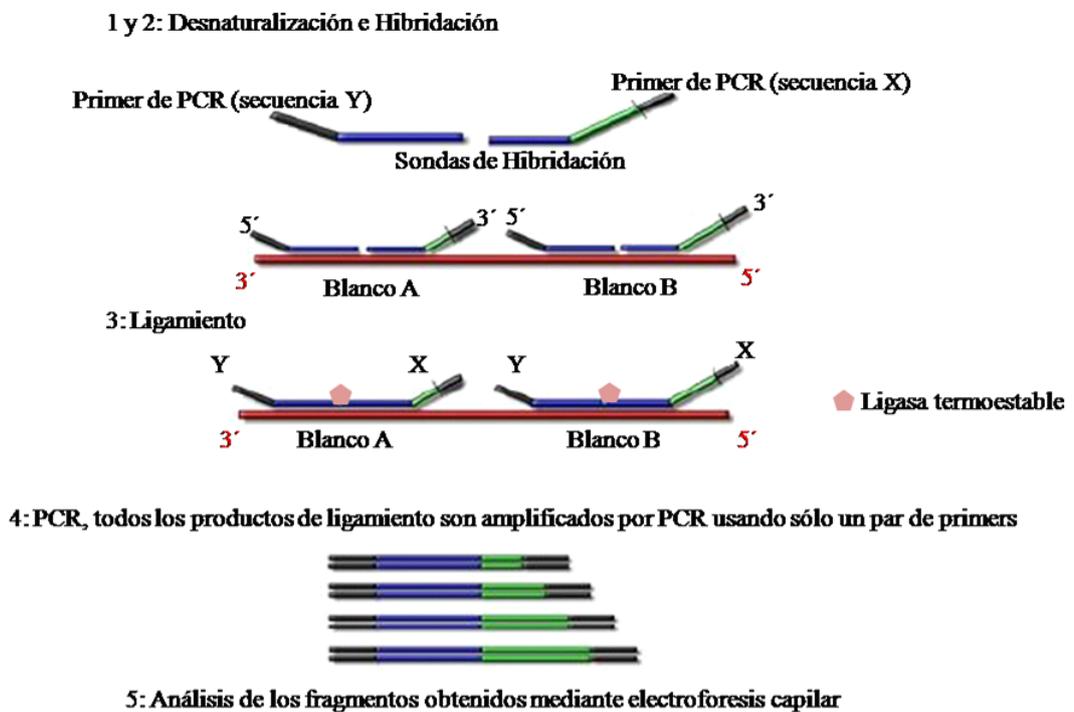


Figura 16. Esquema resumen de la reacción MLPA.

3.5.2. MATERIAL REQUERIDO PARA REALIZAR LA TÉCNICA MLPA.

El material necesario para realizar la técnica MLPA es el siguiente:

- Termociclador de tapa caliente (99-105°C), GeneAmp PCR system 2400®-Applied Biosystems.
- Equipo de electroforesis capilar, ABI PRISM® 310 de Applied Biosystem.
- Tubos de 200 µL para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- Equipamiento estándar de laboratorio.
- Kit de MRC Holland®.

3.5.3. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE CONTROL.

Los cálculos derivados de la reacción de MLPA requiere la elaboración de tablas de normalización de las muestras analizadas. Para que estas tablas de cálculo sean verdaderamente informativas los datos que se usan para la comparación tienen que tener condiciones idénticas de análisis ya que la variabilidad entre ensayos es, para MLPA, bastante notable. En cada reacción se realiza el análisis de las muestras problema junto con tres muestras de pacientes controles sanos. La normalización requiere la comparación intramuestral e intermuestral de las áreas obtenidas para cada pico en muestra y controles.

También se emplean dos muestras negativas, sin ADN, para control de la reacción de MLPA.

3.5.4. KIT MLPA MRC HOLLAND®.

Para el análisis de las muestras se he empleado tecnología de MRC Holland (MS-MLPA protocol version MSP-003; última actualización: 23-01-2012).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 5. Contenido del kit SALSA® MLPA de MRC Holland empleado en el análisis.

Componentes	Volumen	Ingredientes
SALSA MLPA Buffer	180 µL	KCl, Tris-HCl, EDTA y PEG-6000; pH 8.5
SALSA Ligasa-65	115 µL	Glicerol, BRIJ (0.05%), EDTA, β-mercaptoetanol (0.1%), KCl, Tris- HCl; pH 7.5. Enzima Ligasa-65 (origen bacteriano)
Buffer Ligasa A	360 µL	NAD (origen bacteriano); pH 3.5
Buffer Ligasa B	360 µL	Tris-HCl, detergentes no iónicos, MgCl ₂ ; pH 8.5
SALSA PCR primer mix	240 µL	Oligonucleótidos sintéticos, uno de los cuales se marca con fluoróforo FAM, dNTP's, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0.04%); pH 8.0
SALSA Polimerasa	65 µL	Glicerol, BRIJ (0.5%), EDTA, DTT (0.1%), KCl, Tris-HCl, enzima Polimerasa (origen bacteriano); pH 8.0
Probemix	160 µL	Oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos purificados por bacterias, Tris-HCl, EDTa; pH 8.0
SALSA PCR Buffer	480 µL	Tris-HC, KCl, detergentes no iónicos, Trizma, MgCl ₂ ; pH 8.5
SALSA Enzyme Dilution Buffer	2x240 µL	Tris-HCl, KCl, EDTA, detergente no iónico; pH 8.5
Todos los componentes deben conservarse entre -25 y -15°C, protegidos de la luz en el envase original		

Las sondas MRC Holland están caracterizadas como P034 (Salsa MLPA P034-A3 DMD®) y P035 (Salsa MLPA P035-A3 DMD®) de la casa comercial MCR Holland, ambas contienen sondas para cada uno de los 79 exones que forman parte del gen de la distrofina en el brazo corto del cromosoma 21. Además, lleva incluida una sonda específica para un promotor tisular del gen, el DP427c (es el promotor para una isoforma de la distrofina que se localiza a nivel cerebral).

La mezcla P034 contiene 45 sondas diferentes con productos de amplificado entre 129 y 490 nucleótidos, así como 10 fragmentos de control que generan la amplificación de productos de menos de 120 nucleótidos de tamaño. Entre los fragmentos de control se incluyen dos (de 105 y 118 nucleótidos de longitud respectivamente) que son sondas específicas para el cromosoma Y.

La mezcla P035 contiene 45 sondas diferentes con productos de amplificado entre 129 y 490 nucleótidos, y 9 fragmentos de control que generan la amplificación de productos de tamaño inferior a 120 nucleótidos. Entre los fragmentos control se incluye uno (105 nucleótidos de longitud) específico para el cromosoma Y. Incluye los oligonucleótidos necesarios para el análisis de los exones

Las 80 sondas se han dividido en dos “*probemix*” (mezcla de sondas): P034 y P035, entre las dos comprenden la totalidad de exones del gen DMD y permiten la detección tanto de pérdidas (delección) como de ganancias (duplicación) de material genético de uno o más exones. La delección de exón en un varón se muestra como total ausencia de amplificación de la sonda para dicho exón en la reacción (no hay hibridación posible) y no aparece el pico de área correspondiente en el electroforegrama tras la secuenciación; en mujeres heterocigotas se produce una reducción en la señal de la sonda en el electroforegrama de entre el 35 y el 50% de la señal normal.

3.5.5. PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE DELECCIONES Y DUPLICACIONES DEL GEN DMD.

Se lleva a cabo en cuatro pasos: desnaturalización, hibridación, ligado, PCR y análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

3.5.5.1. DESNATURALIZACIÓN.

- Se desnaturalizan las muestras de ADN problema y ADN controles con los que se va a trabajar. Por cada muestra, es necesario preparar dos tubos de PCR.
- Se numeran dos tubos de 200 μ L por muestra que se usarán para la PCR, cada uno de ellos con el número de identificación de la muestra y el subíndice 4 correspondiente a las sondas de P034 y el otro con la identificación de la muestra y el subíndice 5 correspondiente a las sondas de P035; se realiza el mismo proceso de tubo doble para los tres controles sanos y el control negativo que no contiene ADN.
- Se requieren 50 ng de ADN para la reacción de PCR. Teniendo en cuenta el cálculo de la concentración de ADN para cada muestra se ajusta el volumen

3. MATERIAL Y MÉTODOS

necesario para cada una de ellas, en general no conviene usar más de 5 μL de muestra en los tubos de PCR para no saturar ni salinizar el medio (puede afectar al proceso de PCR). El control negativo (no contiene ADN) se prepara con 5 μL de agua desionizada estéril.

- Se introducen los tubos de PCR etiquetados en el termociclador y se realiza un programa de DENATURALIZACIÓN: se calientan los tubos a 98°C durante 5 minutos.

3.5.5.2. HIBRIDACIÓN.

- Para la reacción de hibridación se emplean MLPA buffer y Probemix
- Se preparan los reactivos MLPA Buffer y Probemix necesarios, se mantienen en un recipiente con hielo mientras se usan, se aplica vórtex antes de usar cada uno de ellos, y una vez usados se vuelven a almacenar protegidos de la luz entre -15 y -25°C .
- Se preparan dos master mix de hibridación (carrera 4 y carrera 5) en hielo, en tubos de 1.5 ml.
 - Master mix 4:
 - Sonda P034 (Probemix).....1.5 μL por muestra
 - MLPA buffer.....1.5 μL por muestra
 - Master mix 5:
 - Sonda P035 (Probemix).....1.5 μL por muestra
 - MLPA Buffer.....1.5 μL por muestra
- En el termociclador se mantienen los tubos a 25°C durante 5 minutos, y cuando quedan 10 segundos para terminar el programa se pausa la reacción y se añaden 3 μL de master mix a cada tubo de PCR. Se dejan las muestras hibridando de 16 a 20 horas a 60°C .

3.5.5.3. LIGADO.

- Para el ligado se emplean Ligasa 65, polimerasa, buffer ligasa A y buffer ligasa B del kit. La ligasa 65 y la polimerasa deben permanecer en hielo una hora previa a su uso. Hay que aplicar vórtex a buffer ligasa A y B antes de usarlos.
- En un tubo se prepara la master mix de ligado que contiene, por muestra:
 - 3 μL de Buffer ligasa A
 - 3 μL de Buffer ligasa B
 - 25 μL de agua desionizada estéril
 - 1 μL de Ligasa-65
 - Se mezcla bien todo pipeteando arriba y abajo, no se aplica vórtex.
- Una vez concluido el paso de hibridación se baja la temperatura de 60°C a 54°C y se añaden 32 μL de la master mix de ligado a cada tubo; se mezcla bien pipeteando arriba y abajo.
- Una vez añadida la mezcla, se realiza un programa de Ligado con el termociclador: 54°C durante 15 minutos (para que se efectúe el ligado) y 98°C durante 5 minutos (para inactivar la ligasa) y luego se pausa la reacción a 4°C.
- Se puede conservar el producto de ligado refrigerado a 4°C.

3.3.5.5.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

- Para la reacción de PCR se emplea la PCR primer mix del Kit MRC Holland®, PCR buffer, polimerasa, enzyme dilution buffer y agua desionizada estéril.
- Se aplica vórtex a la PCR primer mix antes de su uso.
- Para reducir la viscosidad de la polimerasa, se atempera durante 10 segundos entre las manos.
- Se numeran e identifican nuevo tubos de PCR de 200 μL para PCR por cada una de las muestras y los controles y se añade en cada uno de ellos:

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 4 μL de PCR buffer
 - 3.75 μL de agua desionizada estéril
 - 1 μL de PCR primers
 - 2 μL de Enzime Dilution Buffer
 - 0.25 μL de polimerasa
-
- A cada nuevo tubo de PCR se le añaden 10 μL del ligado para cada muestra obtenido en la reacción de hibridación anterior.
 - Se mezcla en cada tubo pipeteando arriba y abajo.
 - Se programa termociclador: 95°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos (37 ciclos), 72°C durante 20 minutos y se pausa la reacción a 4°C para conservar el producto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6. Esquema de la programación del termociclador para la reacción de MLPA.

1. Desnaturalización			
	1. 98°C	5 minutos	
	2. 25°C	Pausar	
2. Reacción de Hibridación			
	3. 95°C	1 minuto	
	4. 60°C	Pausar	
	5. 20°C	Pausar	
3. Reacción de Ligación y Ligación-Digestión			
	6. 48°C	Pausar	
	7. 48°C	30 minutos	
	8. 98°C	5 minutos	
	9. 20°C	Pausar	
4. Reacción de PCR			
	10. 35 ciclos	95°C	30 segundos
		60°C	30 segundos
		72°C	60 segundos
	11. 72°C	20 minutos	
	12. 15°C	Pausar	

3.5.5.5. ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR.

Los productos amplificados se analizan mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystem (figura 17).



Figura 17. Imagen de Secuenciador ABI PRISM® 310.

Material necesario para el análisis de fragmentos:

- Agua desionizada estéril.
- Formamida desionizada (Hi Di™ Applied Biosystem).
- Marcador de peso molecular GeneScan® ROX 500™ Applied Biosystem.
- Buffer con EDTA 10X.
- POP-4™ (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystem).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- Capilar de sílice (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Capillary de 47 cm de longitud, 50µm de diámetro).
- Jeringa de vidrio de 1 ml.
- Dos viales de 4 ml cada uno para contener el buffer y el agua desionizada estéril.
- Gradilla de plástico con 48 pocillos.
- Tubos de 0.5 ml para las muestras.
- Tapones de goma con ranura superior.
- Microcentrífuga (Centrifuge 5410® Eppendorf).
- Termociclador (GeneAmp® PCR System 9600).
- Analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystem.

3.5.5.5.1. Preparación de los productos amplificados.

Previamente a la electroforesis se mezclan en un tubo para secuenciador de 0.5 ml los siguientes productos:

- 1 µL del producto amplificado.
- 13.5 µL de formamida desionizada.
- 0.5 µL del marcador de peso molecular GeneScan® ROX 500™.

Los tubos de 0.5ml se someten a vórtex durante 15 segundos y luego se centrifugan a 5000 r.p.m. durante 30 segundos. Los tubos posteriormente se llevan al termociclador para su desnaturalización a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente después se enfrían rápidamente en hielo hasta ser procesados.

3.5.5.5.2. Preparación del equipo.



Figura 18. Imagen del bloque de metacrilato y jeringa de vidrio del ABI PRISM 310.

Antes de inyectar las muestras en el analizador ABI PRISM 310 es necesario realizar una puesta a punto del mismo; se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Establecer comunicación entre el analizador y el ordenador: se procede al encendido del ordenador y una vez iniciado éste, se enciende ABI PRISM 310.
- Se abre en la pantalla de inicio del ordenador el software de recogida de datos “ABI PRISMTM 310 Data Collection”, programa que recoge el dato crudo del análisis de los fragmentos en cada carrera. El dato crudo es la fluorescencia detectada por la cámara CCD de los fragmentos marcados, separados en el capilar por electroforesis y excitados por el láser al pasar por la ventana de detección.
- Colocar el bloque de metacrilato limpio y seco (figura 18).

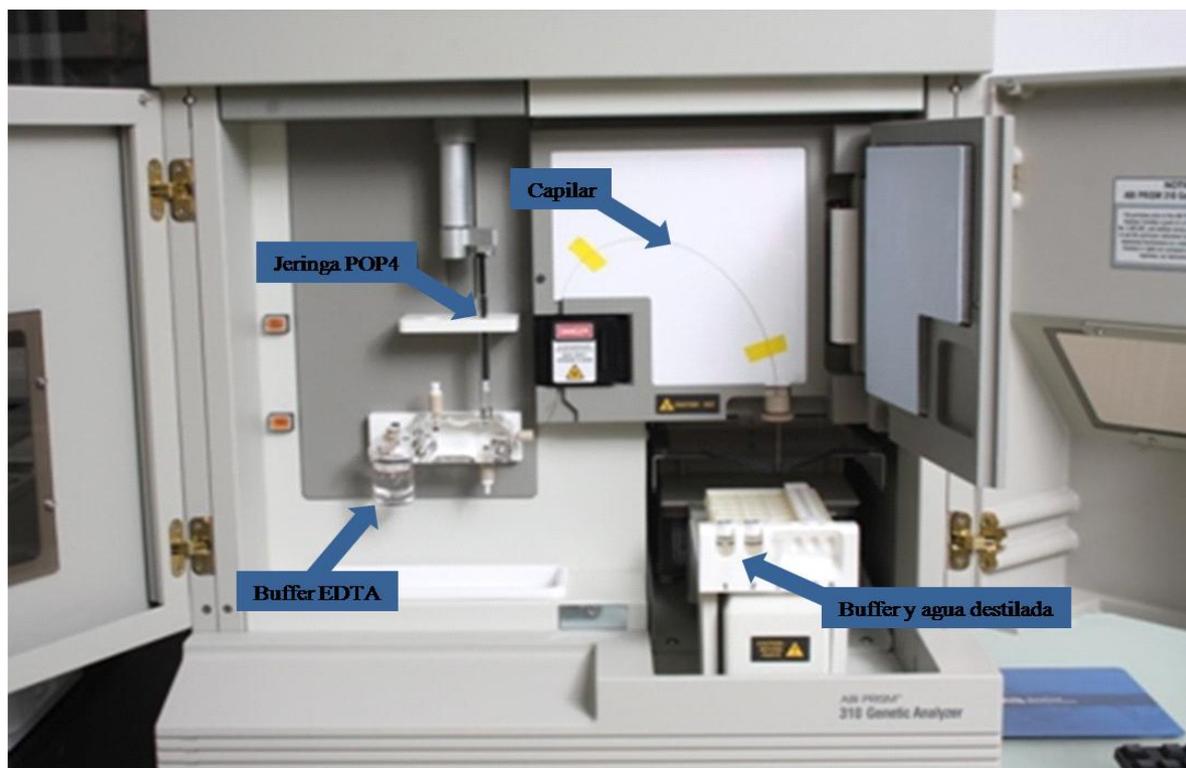


Figura 19. Imagen interior del ABI PRISM 310 con sus distintos componentes: capilar de sílice, la gradilla con los tubos de PCR, el bloque de metacrilato, el vaso con Buffer EDTA y la jeringa de vidrio que contiene el polímero.

- Colocar el capilar, antes es necesario limpiar la ventana del capilar con un papel empapado en etanol absoluto. Tras limpiar la ventana se introduce el capilar en la válvula que lo conecta con el bloque de metacrilato hasta llegar a la primera intersección y se aprieta bien la válvula; es importante no rebasar esta primera intersección para que el polímero pueda penetrar en el capilar. A continuación se sitúa la zona de lectura del capilar en la ventana del láser, se introduce el otro extremo en la parte que contiene el electrodo negativo o cátodo y se desliza hasta que queden a la misma altura. Por último se sujeta el capilar con una cinta adhesiva contra la placa térmica (figura 19).
- Establecer la posición de la jeringa y el “*autosampler*”(zona para la colocación de la gradilla con las muestras). Realizar la calibración del “*autosampler*”.
- Preparar 15 ml de buffer 1X y llenar los viales de buffer del cátodo y del ánodo hasta la marca.
- Rellenar el capilar y el bloque de metacrilato con el polímero. El polímero utilizado para el análisis de fragmentos es el POP-4 y debe mantenerse entre 4 y

3. MATERIAL Y MÉTODOS

8°C. Media hora antes de su uso se saca del frigorífico para que se atempere. Con la jeringa bien limpia se toma el volumen de polímero necesario en función del número de muestras a analizar, se enrosca la jeringa bien para evitar la pérdida de polímero y se llenan los conductos del bloque de metacrilato evitando la formación de burbujas de aire.

3.5.5.5.3. Programación de las muestras.

Hoja de muestras (“sample sheet”).

Una vez preparadas las muestras antes de comenzar la electroforesis capilar se programa la lista de trabajo (figuras 20 y 21) en el software de recogida de datos ABI PRISM® 310 Data Collection Versión 3.1.0. Se configura una nueva hoja de trabajo donde se introducirán los datos de cada muestra (número de muestra y fecha de análisis) así como su posición en la gradilla. La primera posición (A1) siempre se reservará para un test de color. A continuación se indicará que trabajaremos con cuatro colores. Por último se guarda la hoja en su carpeta correspondiente y se procede a la realización de la lista de inyección.

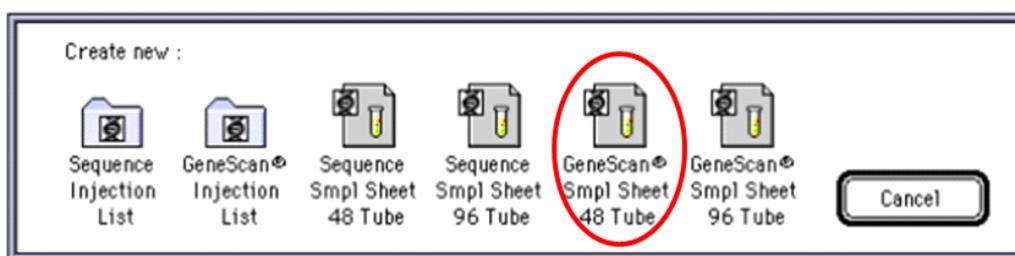
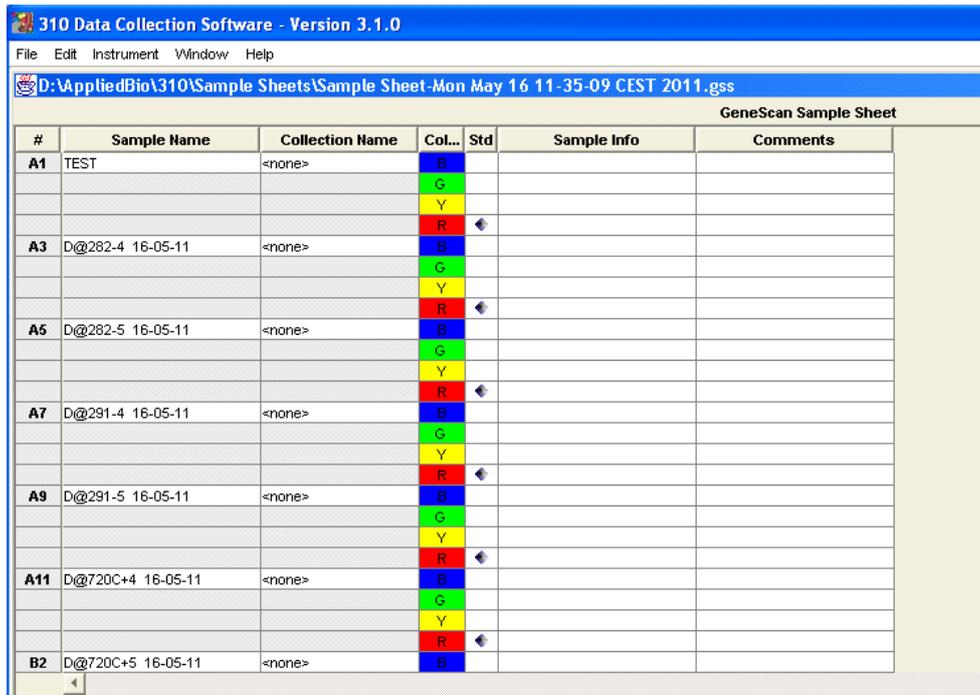


Figura 20. Carpeta para la creación de la Hoja de Muestra.

3. MATERIAL Y MÉTODOS



The screenshot shows the '310 Data Collection Software - Version 3.1.0' interface. The main window displays a 'GeneScan Sample Sheet' table with the following data:

#	Sample Name	Collection Name	Col...	Std	Sample Info	Comments
A1	TEST	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
A3	D@282-4 16-05-11	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
A5	D@282-5 16-05-11	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
A7	D@291-4 16-05-11	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
A9	D@291-5 16-05-11	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
A11	D@720C+4 16-05-11	<none>	B			
			G			
			Y			
			R			
B2	D@720C+5 16-05-11	<none>	B			

Figura 21. Hoja de muestras “sample sheet”.

3.5.5.5.4. Lista de inyección.

A continuación se crea la lista de inyección de las muestras (figuras 22 y 23) con las que se va a trabajar, configurando el archivo desde la carpeta creada en el paso anterior.

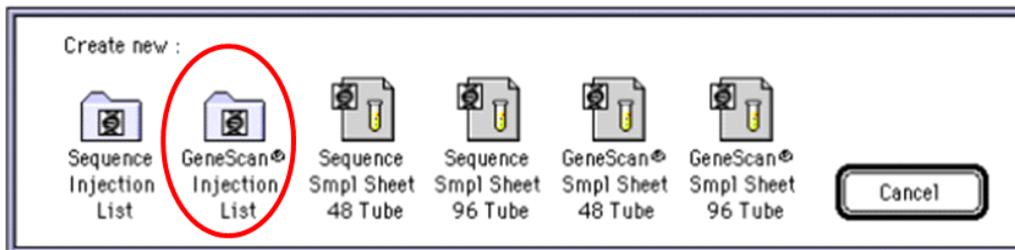


Figura 22. Carpeta que contiene la lista de inyección de las muestras a analizar.

Es posible modificar el orden de inyección de las muestras e incluso repetir algunas de las mismas, modificando algunos de los parámetros como el tiempo de inyección. La primera columna indica los datos de las muestras. La segunda columna especifica el módulo de análisis, el cual contiene las funciones específicas ejecutadas para el proceso de análisis de las muestras. Para nuestro caso el módulo seleccionado es el GS STR

3. MATERIAL Y MÉTODOS

POP 4 (1ml) D y la matriz: ROX 500_ 4 colores. El protocolo de trabajo establece los siguientes parámetros configurables:

Tabla 7. Esquema de los parámetros configurables con el software Data Collection en el protocolo de trabajo de MLPA para Duchenne.

Módulo	GS STR POP4 (1ml) D
Segundos de inyección	10
Voltaje de inyección (KV)	15
Tiempo de carrera (Run Time)	30
Matriz	Fibrosis Quística
Nº Colores	4
Polímero	POP 4
Temperatura	60°C

Voltaje y tiempo de inyección: Estos parámetros pueden modificarse para regular la cantidad de ADN que entra en el capilar. Si la muestra produce baja señal, se puede aumentar el tiempo de inyección, esto produce la inyección de más cantidad de muestra y se aumenta la señal fluorescente.

Voltaje de electroforesis: Se ha usado el polímero POP4, cuyo voltaje estándar es de 319V/cm. El capilar de sílice tiene una longitud de 47 cm, el voltaje total que se consigue es de 15K para una intensidad de corriente de 7-9 μ A. Con estas condiciones físicas un fragmento de 400 pares de bases tarda unos 40 minutos en llegar a la ventana de detección.

Temperatura de electroforesis: La temperatura óptima para el análisis son 60°C.

Tiempo de electroforesis: El tiempo de electroforesis es un 10% mayor a la media del tiempo necesario para que ocurra la migración del fragmento de tamaño.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

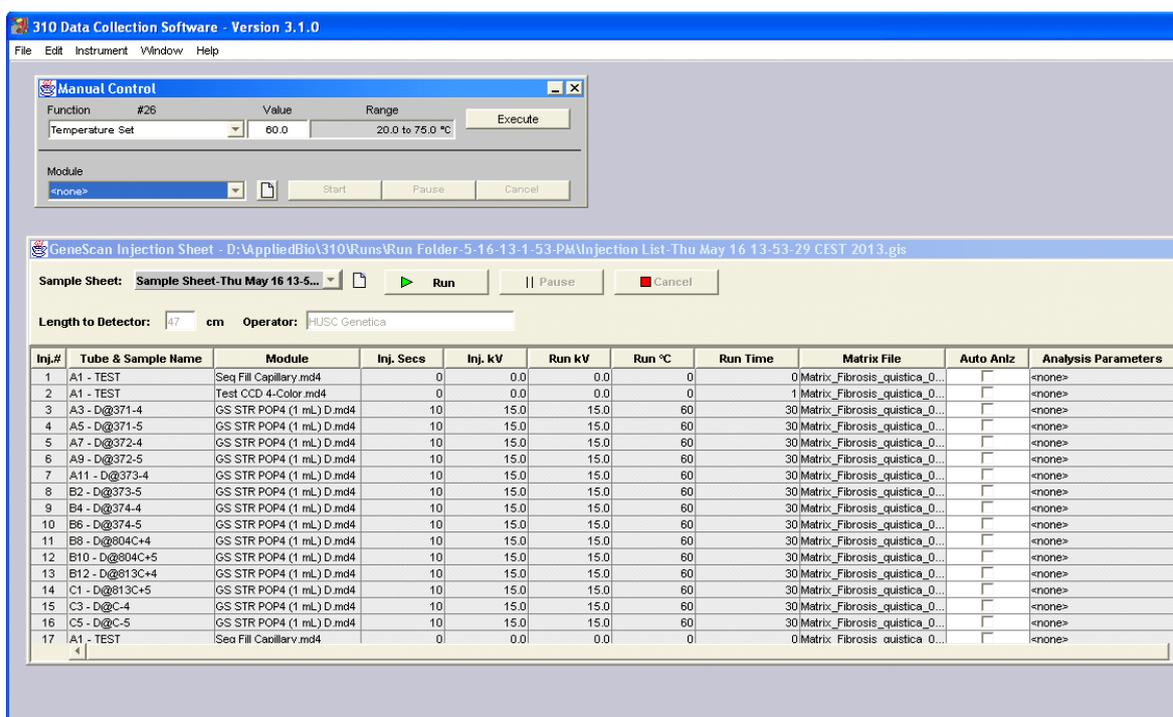


Figura 23. Lista de inyección para análisis MLPA de Duchenne.

Antes de comenzar con la inyección de las muestras se realiza se llena el capilar de polímero y se realiza un test de colores (test CCD-4 color) para comprobar la indemnidad de la membrana del capilar.

- El relleno del capilar de polímero se realiza con la función “*Seq fill capillary*”. En la lista de inyección se añade esta función previa a la realización del test de cuatro colores.
- A continuación se realiza el test de cuatro colores “*Test CCD 4- Color*” (figura 24) cuya función es comprobar que la ventana del capilar está limpia y colocada correctamente. Este test tiene una duración de cinco minutos y en el debemos comprobar que la línea basal de los cuatro colores está entre 800 y 2500 en escala vertical (intensidad de fluorescencia). Si no es así se procederá a limpiar el capilar y a repetir el test hasta que salga entre los valores anteriormente indicados.

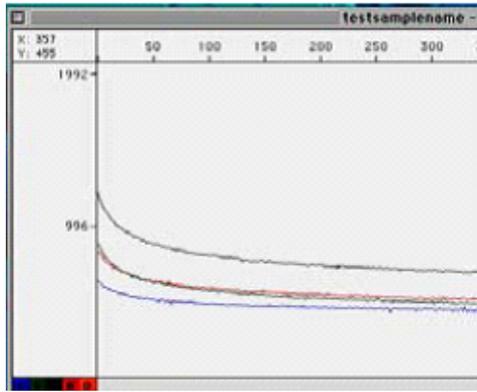


Figura 24. Test de 4 colores realizado previo a la electroforesis capilar.

Una vez completada la lista de inyección y habiéndose alcanzado la temperatura de electroforesis (60°C) se inicia el análisis electroforético pulsando el icono “run”.

3.5.5.5.5. Cierres de ABI PRISM.

Al finalizar la electroforesis es muy importante seguir el siguiente orden para cerrar el analizador:

- Cerrar “Data Collection”.
- Apagar ABI PRISM.
- Apagar el ordenador.

3.6. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS: EVALUACIÓN DE ELECTROFOREGRAMAS.

3.6.1. CALIDAD DE ANÁLISIS.

El análisis relativo de los datos obtenidos requiera, en primer lugar, evaluar el patrón de picos de MLPA que ha generado esos datos (electroforegramas). De este modo, se pueden detectar alteraciones técnicas o instrumentales que pueden alterar el resultado obtenido y que pueden falsear el análisis posterior. En algunos casos, si se aprecian este tipo de alteraciones, se repite el proceso electroforético o el proceso completo de reacción MLPA.

Lo primero a evaluar es el “raw data” obtenido:

- Abrimos el software de análisis de datos Gene Mapper® Software de Applied Biosystem.
- Seleccionamos en la base de datos del equipo la carpeta del análisis correspondiente.
- Se realiza un chequeo del “raw data”
 - ¿Presentan los patrones de picos inclinaciones anormales?
 - ¿Hay una línea de base muy alta?
 - ¿Hay presencia de picos con morfología anormal?
 - ¿Se observan picos de anchura excesiva aberrante?
 - ¿Se presentan varios patrones de picos diferentes?
 - ¿Hay uno o más picos por debajo de la señal mínima recomendable?
 - ¿Hay uno o más picos con señales por encima de la señal de fluorescencia del secuenciador?
 - ¿Hay picos aberrantes que interfieren la detección de patrones?

Si la respuesta e todas las preguntas de chequeo es “no” se puede proceder al análisis de las muestras.

3.6.2. EVALUACIÓN DE CALIDAD INTERNA.

Para comprobar la calidad interna de los resultados obtenidos se evalúan los fragmentos de control que incluye la preparación situados entre los nucleótidos 64 y 105 (tabla 8):

Tabla 8. Esquema de los fragmentos a evaluar para comprobar la calidad interna de la electroforesis capilar.

Nomenclatura	Longitud (nucleótidos)	Objetivo
Control 92 nt	92	Reacción de ligación, se comporta de modo similar a otras reacciones MLPA, sirve como punto de referencia para control del resto de fragmentos
Fragmentos Q	64, 70, 76, 82	Alertan de que la cantidad de ADN es demasiado escasa. Señales mayores de 1/3 del control 92 nt indican que la cantidad de ADN es insuficiente
Fragmentos D	88, 96	Detectan problemas en la desnaturalización. Señales inferiores al 40% del control 92 nt indican que ha ocurrido un problema durante la desnaturalización de la muestra
Fragmentos X e Y	100, 105	Evitan el posible cambio de muestras

3.6.3. MUESTRAS DE CONTROL SIN ADN.

En las muestras usadas como control negativo que no portan ADN, sólo los fragmentos Q van a dar señal, sin embargo pueden aparecer pequeños picos inespecíficos que en la mayoría de los casos no van a influir en los resultados de la reacción MLPA.

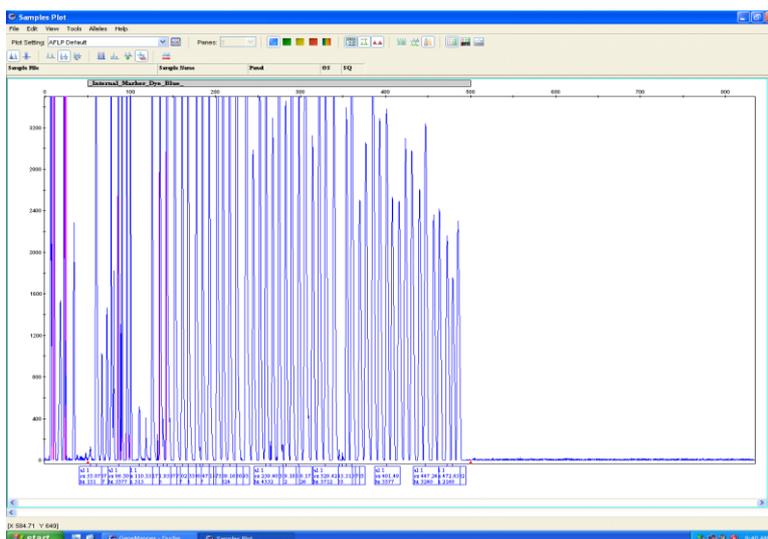
3.6.4. MUESTRAS DE CONTROL NEGATIVO.

Los datos de electroforegramas (figura 25) obtenidos para las muestras de control negativo van a usarse para la normalización de los datos.

La intensidad de fluorescencia captada por el secuenciador depende de muchos factores (degradación de fluorocromo, variabilidad entre capilares, calibración adecuada de las pipetas,...), por ello es necesaria la normalización para obtener resultados útiles tras la reacción de MLPA.

Para el cálculo del número de copias de ADN y correcta interpretación de los resultados tras la reacción son necesarios dos pasos:

- Una normalización intra-muestral en la que cada pico detectado se compara con los todos los picos obtenidos para esa misma muestra.
- Una normalización inter-muestral en la que la señal relativa de cada pico de la muestra se compara con las señales de todos y cada uno de los picos de todas las muestras incluidas en la misma carrera. El ratio final obtenido se denomina cociente de dosis de la muestra.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

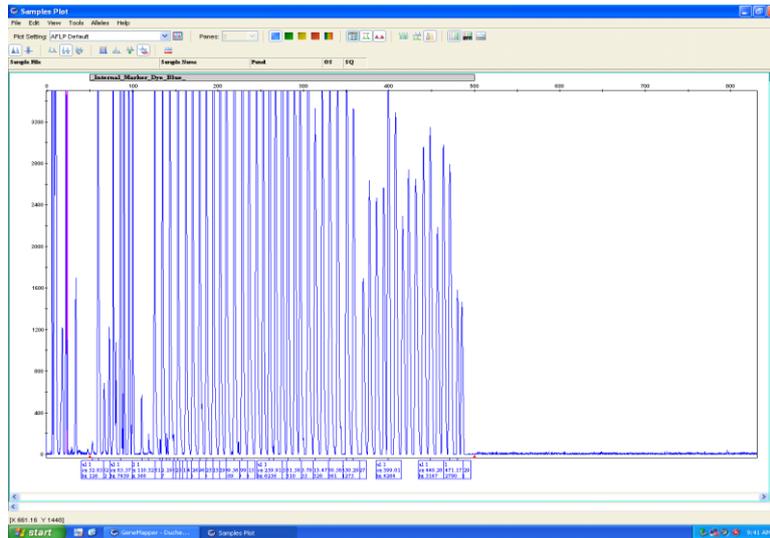


Figura 25. Electroforegrama para sondas P034 y P035.

Los picos correspondientes a los amplicones obtenidos tras la secuenciación capilar (figura 26) están identificados y asignados a los exones específicos representados en el eje “x” de la gráfica.

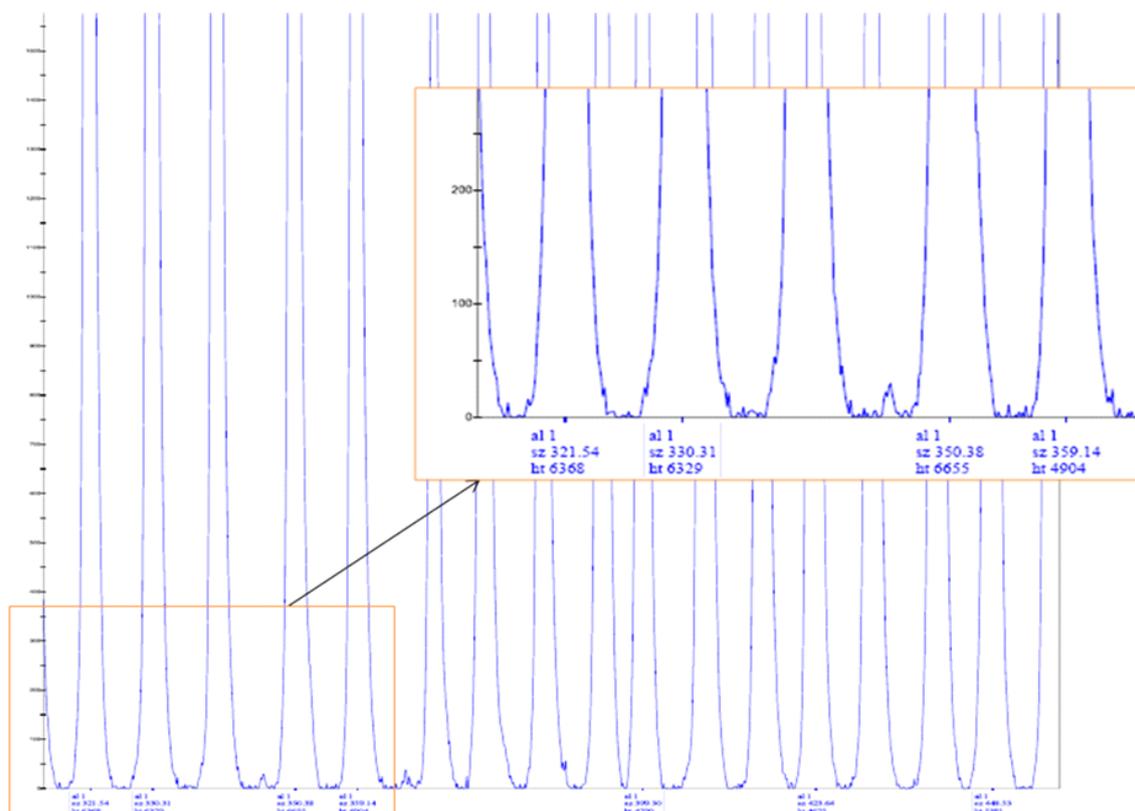


Figura 26. En el eje de abscisas se marcan las posiciones relativas correspondientes a los amplicones para cada exón.

3.6.5. INTERPRETACIÓN DEL COCIENTE DE DOSIS.

El protocolo de trabajo del fabricante recomienda realizar mediante software informático un cálculo relativo del área de cada uno de los picos (RPA) obtenidos en el electroforegrama dividiendo cada medida de área de cada pico (A_s) entre la suma de las áreas ($\sum A_s$) de los 45 picos obtenidos en el electroforegrama de la muestra. El área relativa de cada pico ($A_s/\sum A_s$) para cada exón se divide después entre el área relativa de los correspondientes picos obtenidos en los controles ($A_c/\sum A_s$). Para que los datos obtenidos sean comparables, todas las determinaciones de picos para muestras y controles se tienen que realizar en la misma carrera de electroforesis. En nuestro caso, para simplificar el cálculo se ha usado como plantilla una hoja de cálculo Excel (Microsoft®).

Para minimizar el riesgo de falsos negativos e incrementar la sensibilidad en la detección de deleciones y duplicaciones, el resultado de un test para una muestra se considera normal y fiable cuando los RPA desviados no superan el 25% del ratio esperado, de modo que todos estarán cercanos al ratio de 1. Se considera que la muestra es patológica cuando:

- En pacientes varones si uno o más exones tienen RPA igual a 0%, que indica deleción del correspondiente exón.
- Uno o más RPA se incrementan hasta el 200% (150-200%) del valor esperado en pacientes varones, que indica duplicaciones del correspondiente exón.
- Uno o más exones tienen RPA en torno al 50% (>75%) del valor esperado en pacientes mujeres, indica que es portadora de deleción del correspondiente exón.
- Uno o más exones tienen RPA incrementado aproximadamente al 150% (125-175%) del valor esperado, indica que es portadora de duplicación.
- El diagnóstico es más fiable cuando la mutación detectada compete a dos o más exones consecutivos.

Para favorecer la interpretación de los datos, los gráficos de análisis de RPA se hacen en dos partes: gráfica de carrera para la sonda P034 del MLPA (incluye los exones 1-10, 21-30, 41-50 y 61-70) y gráfica de la carrera para la sonda P035 del MLPA (incluye los exones 11-20, 31-40, 51-60 y 71-79) (figura 27).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

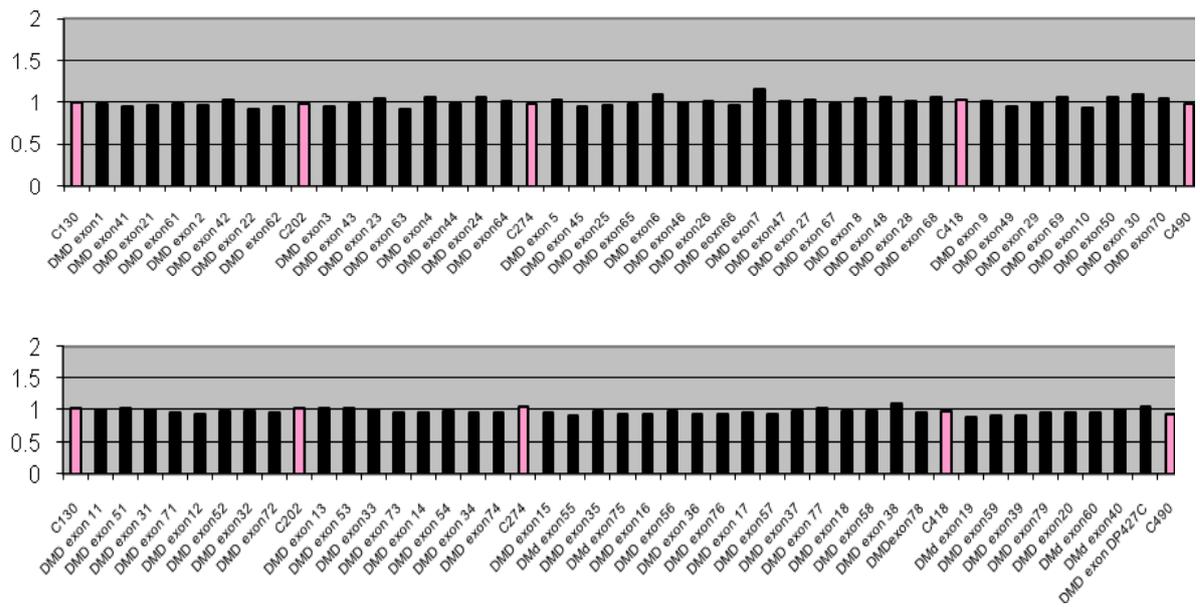


Figura 27. Gráficos de RPA para las sondas P034 y P035 para una muestra de control sano.

3.6.6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

3.6.6.1. PACIENTE CONTROL SANO.

En análisis de un paciente sano mediante MLPA la imagen del electroforegrama obtenido presenta una distribución de picos uniforme y completa: todos ellos están presentes y presentan áreas similares a las de un control sano (figura 28). Al elaborar el gráfico de RPA se advierte que están presentes todos los exones en las barras representativas, y su altura está en torno a 1 (tabla 9).

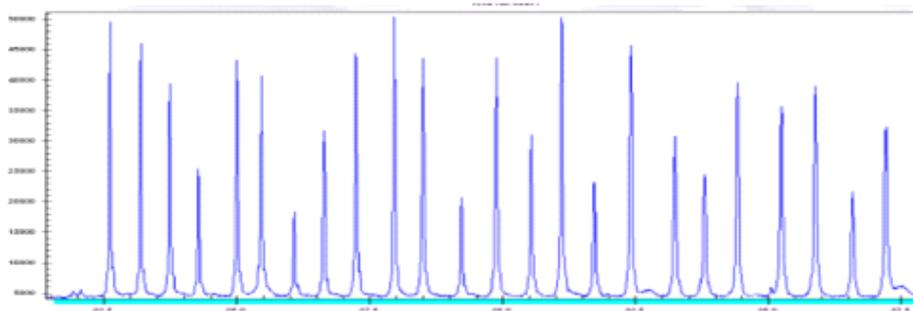
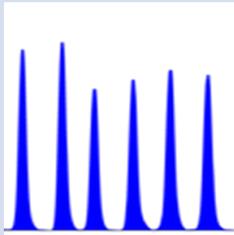
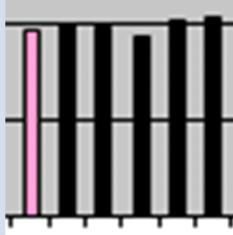


Figura 28. Electroforegrama correspondiente a un paciente sano, sin deleciones ni duplicaciones del gen DMD.

Tabla 9. Representación esquemática del electroforegrama y el gráfico RPA para pacientes sin alteraciones en el número de copias en el gen DMD.

CONTROL SANO	ELECTROFOREGRAMA	RATIO PEAK AREA (RPA)
<p>Control sano: los RPA correspondientes a los exones presentan todos ellos una altura en torno a 1.</p>		

3.6.6.2. PACIENTES CON DELECIONES.

En el análisis de un varón con deleciones la imagen del electroforegrama obtenido presenta una distribución de picos en la que se aprecia la ausencia del gráfico correspondiente al amplicón o amplicones del exón o exones correspondientes (figura 29). Al elaborar el gráfico de RPA se advierte que están ausentes algunos de los exones en las barras representativas, y su altura es 0, el resto de exones presenta una altura normal (tabla 10).

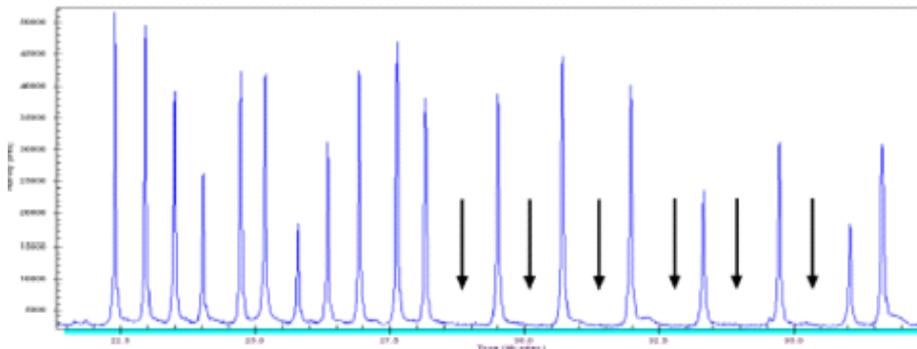


Figura 29. Electroforegrama correspondiente a un paciente varón con deleción de varios genes del gen DMD (indicados mediante flechas).

En el análisis de una mujer con deleciones la imagen del electroforegrama obtenido presenta una distribución de picos en la que se aprecia una disminución de alrededor del 50% del área del gráfico correspondiente al amplicón o amplicones del exón o exones correspondientes (figura 30). Al elaborar el gráfico de RPA se advierte que los exones delecionados presentan una altura en torno a 0.25-0.5, el resto de exones presenta una altura normal (tabla 10).

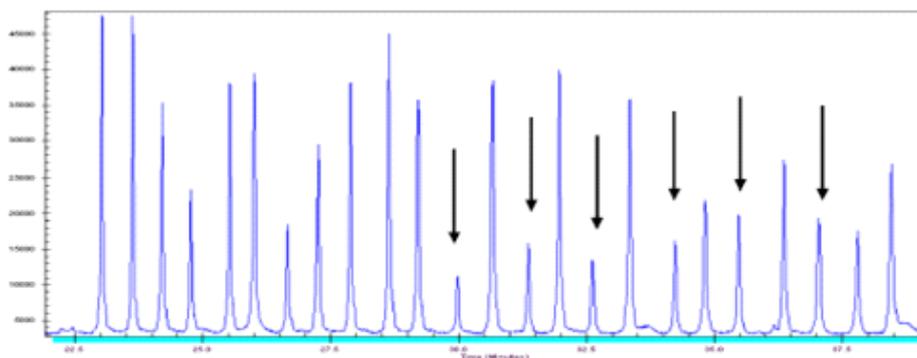
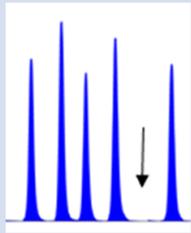
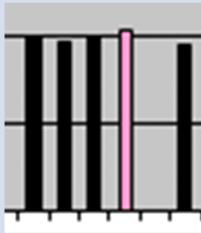
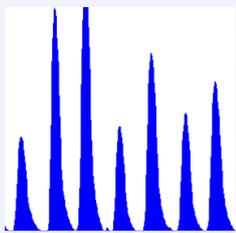
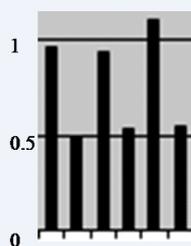


Figura 30. Electroforegrama correspondiente a una paciente mujer con deleción de varios exones del gen DMD (indicados mediante flechas).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 10. Representación esquemática del electroforegrama y el gráfico RPA para pacientes con deleciones en el gen DMD.

DELECIONES	ELECTROFOREGRAMA	RATIO PEAK AREA (RPA)
<p>Varón con deleción: los RPA correspondientes a exones delecionados presentan una altura de 0, no se pueden ver en el electroforegrama</p>		
<p>Mujer portadora de deleción: los RPA correspondientes a exones delecionados presentan una altura entre 0,25 y 0,50.</p>		

3.6.6.3. PACIENTES CON DUPLICACIONES.

En el análisis de un varón con duplicaciones la imagen del electroforegrama obtenido presenta una distribución de picos en la que se aprecia que el tamaño del área del gráfico correspondiente al amplicón o amplicones del exón o exones duplicados presenta un incremento en torno a 175-200% (figura 31). Al elaborar el gráfico de RPA se advierte que están aumentados de tamaño algunos de los exones en las barras representativas, y su altura se sitúa en torno a 1,5-2, el resto de exones presenta una altura normal (tabla 11).

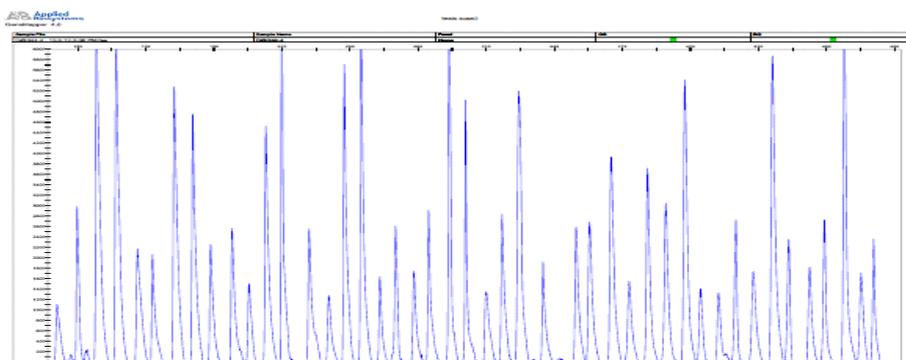


Figura 31. Electroforegrama correspondiente a un paciente varón con varias duplicaciones del gen DMD.

En el análisis de una mujer con duplicaciones la imagen del electroforegrama obtenido presenta una distribución de picos en la que se aprecia que el tamaño del área del gráfico correspondiente al amplicón o amplicones del exón o exones duplicados presenta un incremento en torno a 150-175% (figura 32). Al elaborar el gráfico de RPA se advierte que están aumentados de tamaño algunos de los exones en las barras representativas, y su altura se sitúa en torno a 1,5-1,75, el resto de exones presenta una altura normal (tabla 11).

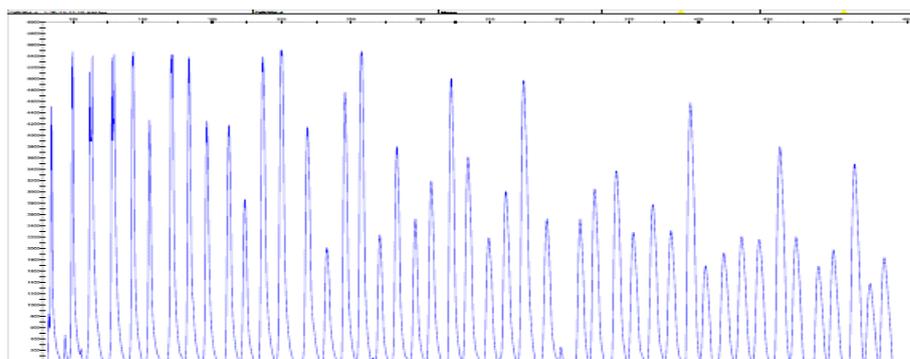
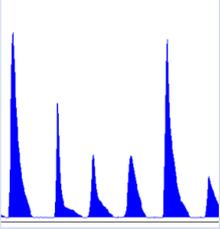
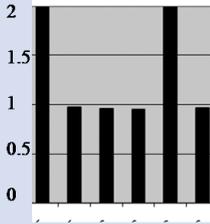
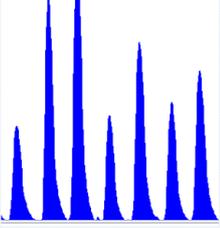
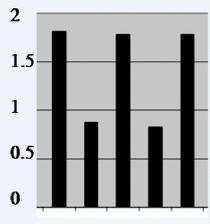


Figura 32. Electroforegrama correspondiente a una paciente mujer con duplicación de varios exones del gen DMD.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 11. Representación esquemática del electroforegrama y el gráfico RPA para pacientes con duplicaciones en el gen DMD.

DUPLICACIONES	ELECTROFOREGRAMA	RATIO PEAK AREA (RPA)
<p>Varón con duplicación: los RPA correspondientes a exones duplicados presentan una altura entre 1,75 y 2.</p>		
<p>Mujer portadora de duplicación: los RPA correspondientes a exones duplicados presentan una altura entre 1,5 y 1,75.</p>		

3.7. CONFIRMACIÓN DE DELECIÓN ÚNICA EN VARÓN.

En el caso de que se estudie un varón en el que sólo se ha diagnosticado una delección es necesario confirmar que se trata de una verdadera delección de un exón completo ya que mutaciones puntuales pueden producir defecto en la hibridación de las sondas correspondientes a ese exón; se trata de un falso positivo para esa delección. En este trabajo esta circunstancia se ha solventado realizando a los varones con delección de un exón realizando electroforesis en gel de agarosa del mismo.

Tras la extracción de ADN, en los casos que se constata una sola delección se realiza una PCR para el exón delecionado según los pares de cebadores diseñados por Chamberlain (Chamberlain et al., 1992) (tabla 12). Los exones estudiados han sido el 45, el 48, el 51 y el 52. La secuencia de cebadores empleados se detalla en la tabla 12. Las condiciones finales de amplificación han sido: buffer para PCR 1X, 1.5mM MgCl₂, 0.08mM de cada dNTPs, 0.5 mM de cada cebador, 250 ng de ADN y 0.05U de Taq polimerasa. El perfil térmico usado ha sido: 96°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 73°C por 45 segundos y 72°C por 10 minutos; se han realizado 40 ciclos.

Los productos amplificados se verificaron en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, analizando los resultados con un transiluminador del que se obtiene una impresión fotográfica.

Tabla 12. Resumen de los oligonucleótidos empleados.

EXÓN	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (primers 5'-3')
45	F: 5'AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC3' R: 3'CATTCCCTATTAGATCTGCTGCCCTAC5'
48	F: 5'TTGAATACTTGGAAATCCCAACATG3' R: 3'CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC5'
51	F: 5'GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC3' R: 3'GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC5'
52	F: 5'AATGCAGGATTTGGAACAGAGCGTCC3' R: 3'TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC5'



4. RESULTADOS.

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA MEDIANTE TECNOLOGÍA MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION PARA DIAGNÓSTICO DE Distrofia Muscular de Duchenne Becker.

Desde Mayo de 2005 a Mayo de 2013 se han realizado en nuestro laboratorio 190 estudios para detección de mutaciones del gen DMD empleando los protocolos de análisis de MLPA previamente expuestos, de ellos 84 estudios (44.21%) se han realizado en varones de edades comprendidas entre 1 y 52 años, y 106 estudios (55.78%) se han realizado en mujeres de edades comprendidas entre 1 y 72 años. Se han analizado un total de 296 cromosomas X (figura 33).

En relación con el sexo, el porcentaje de pacientes de sexo femenino estudiadas es superior al de pacientes de sexo masculino. Esto se explica porque al ser diagnosticada una mutación en un varón caso índice se realiza el estudio de portadoras de mutación primero en sus madres, y si estos estudios resultan positivos (las madres son portadoras), se estudian familiares de hasta tercer grado.

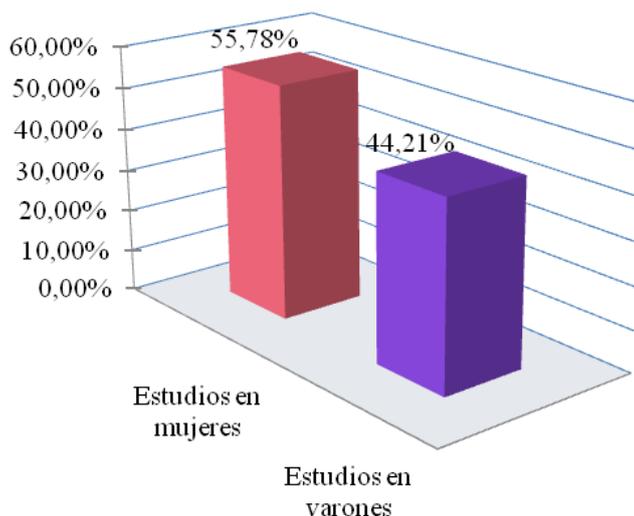


Figura 33. Gráfico de distribución de porcentajes según sexo de los estudios MLPA realizados en nuestro servicio desde Mayo de 2005 a Mayo de 2013.

4.2. VALIDEZ DE LA TECNOLOGÍA MLPA EN EL DIAGNÓSTICO DE DELECCIONES Y DUPLICACIONES DEL GEN DMD EN VARONES AFECTADOS Y EN MUJERES PORTADORAS/NO PORTADORAS.

4.2.1. VARÓN CON DELECCIÓN COMPLETA DE VARIOS EXONES Y MADRE PORTADORA.

Se muestra el caso de un paciente varón de 7 años que es remitido para estudio de MLPA del gen DMD por presentar alteraciones en la marcha con caídas frecuentes e hipertrofia de gemelos. Como dato bioquímico destaca el aumento de CK en varias determinaciones sucesivas. En la historia familiar consta que un hermano de la madre falleció con 17 años con alteraciones musculares que lo confinaron a una silla de ruedas, no se había realizado en este caso estudio de mutaciones del gen DMD. El estudio molecular realizado demuestra la delección completa de los exones 8 al 44 del gen DMD.

En el electroforegrama se observa la ausencia de los picos correspondientes a los exones delecionados (marcados con flechas, figura 34). Los resultados del electroforegrama se confirman de manera más clara a través de los gráficos RPA (figura 35) en los que se puede apreciar un valor igual a cero para los exones delecionados tal y como se expresa en material y métodos.

4. RESULTADOS

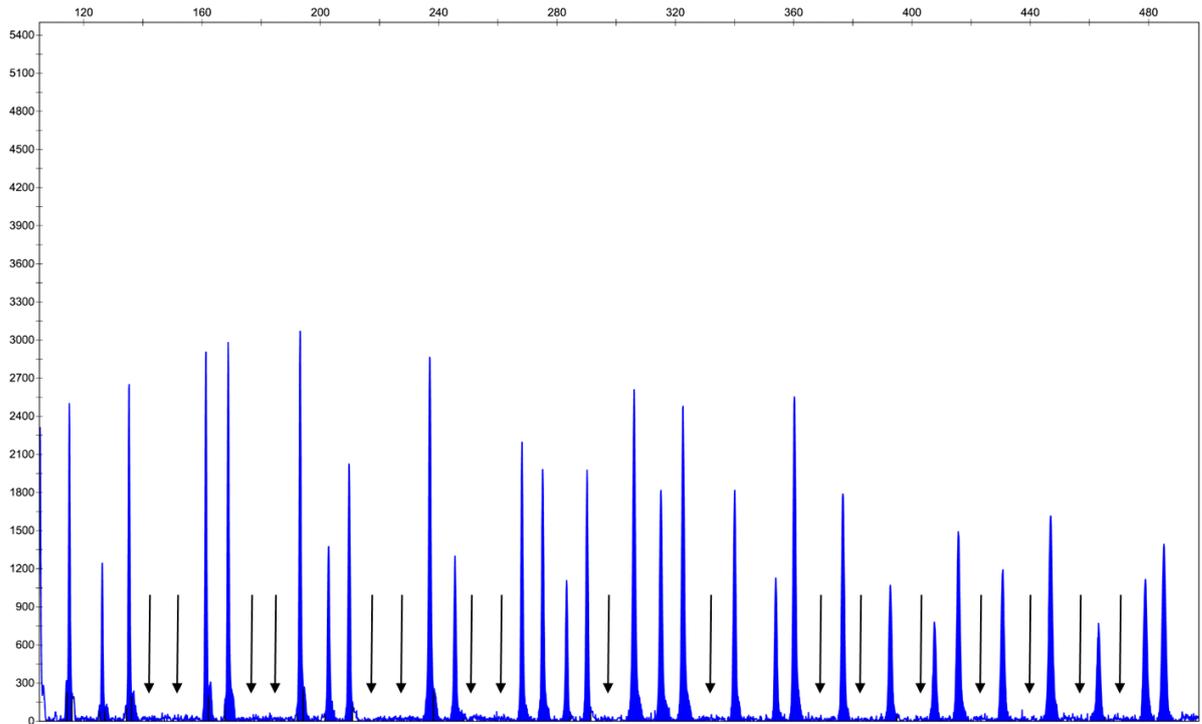


Figura 34. Electroforegrama de varón afectado de delección completa de los exones 8-44.

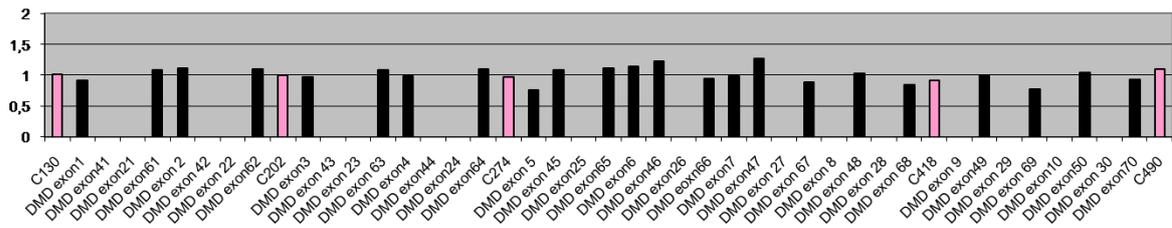


Figura 35. Gráfica RPA del paciente anterior en la que se observa ausencia total de las barras correspondiente a exones delecionados.

Después del resultado obtenido se solicita muestra materna para confirmar el estado de portadora de la madre. El resultado para la mujer fue positivo portando las mismas delecciones que se habían identificado en su hijo. Las mujeres tiene el doble dosis génica para el cromosoma X (tienen dos cromosomas X) por lo tanto, los picos de los amplicones para cada exón delecionado en el electroforegrama materno muestran un área correspondiente a la mitad de la esperable, o sea, el 50% de la dosis génica (figura 36) pues presentan uno de los cromosomas X sano, sin alteraciones en el gen y en el que

4. RESULTADOS

se produce amplificación para el exón estudiado. En el gráfico RPA los exones sin mutación se representan en una barra de altura cercana a 1 (100% de dosis génica) para los exones delecionados las barras presentan una altura comprendida entre 0,5 y 0,75 (50% de la dosis génica) (figura 37).

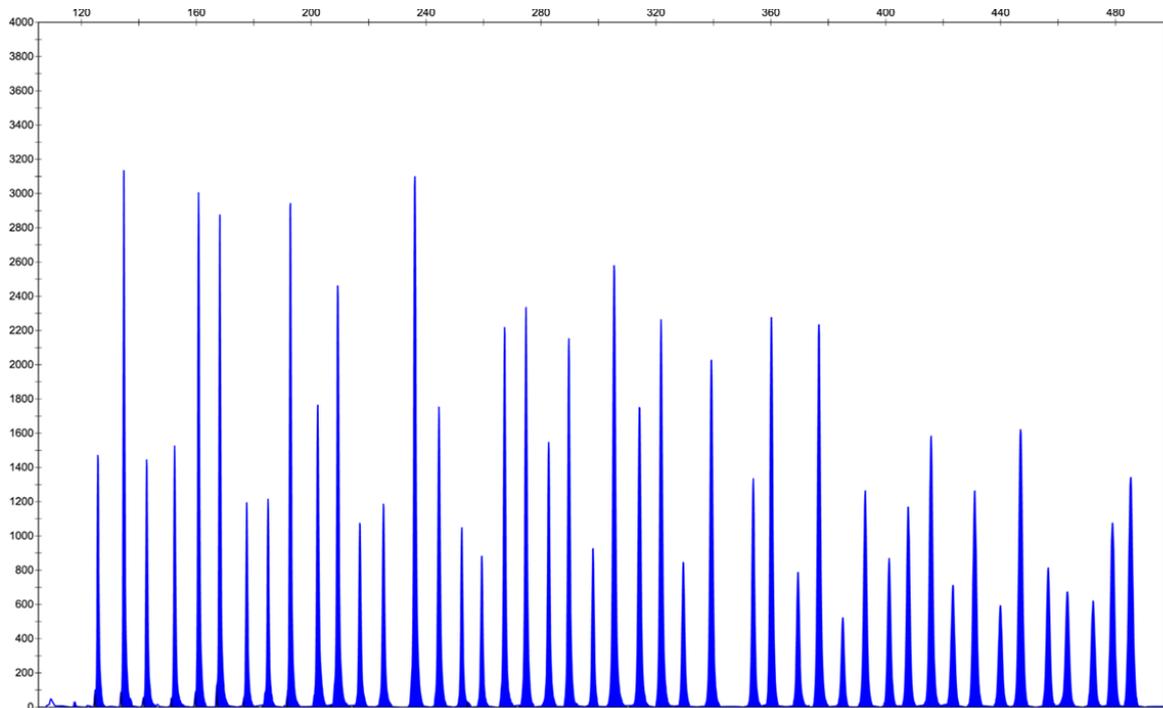


Figura 36. Electroforegrama correspondiente a la madre portadora de las deleciones del caso anterior (8-44).

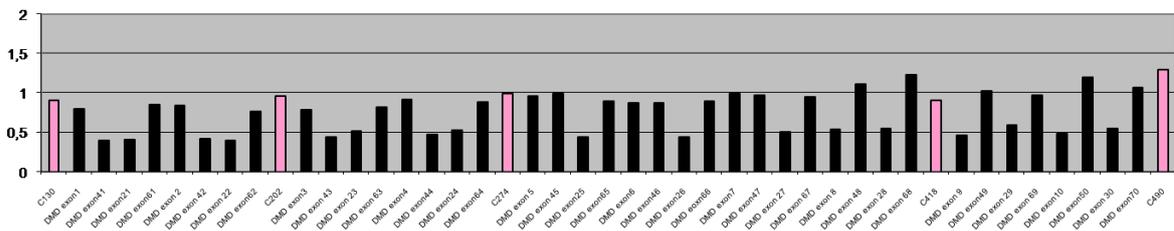


Figura 37. Gráfica RPA de la paciente anterior en la que se aprecia la mitad de altura en los exones delecionados, tienen la mitad de dosis génica correspondiente y su valor se sitúa en torno a 0,5 (50%).

4.2.2. VARÓN CON DELECIÓN COMPLETA DE VARIOS EXONES Y MADRE NO PORTADORA.

Se muestra el caso de un varón de 3 años de edad para el que se solicita el estudio de MLPA para el gen DMD al presentar clínica compatible con DMD y que cursa con Gowers positivo, alteraciones en la marcha, hipertrofia gemelar y aumento de CK. En este caso no se constatan antecedentes familiares de patología muscular.

En el electroforegrama (figura 38) se observa la ausencia de los picos correspondientes a los exones 8, 9 y 10 (marcados con flechas). En la gráfica de RPA (figura 39) se observa ausencia de los valores RPA de los exones correspondientes.

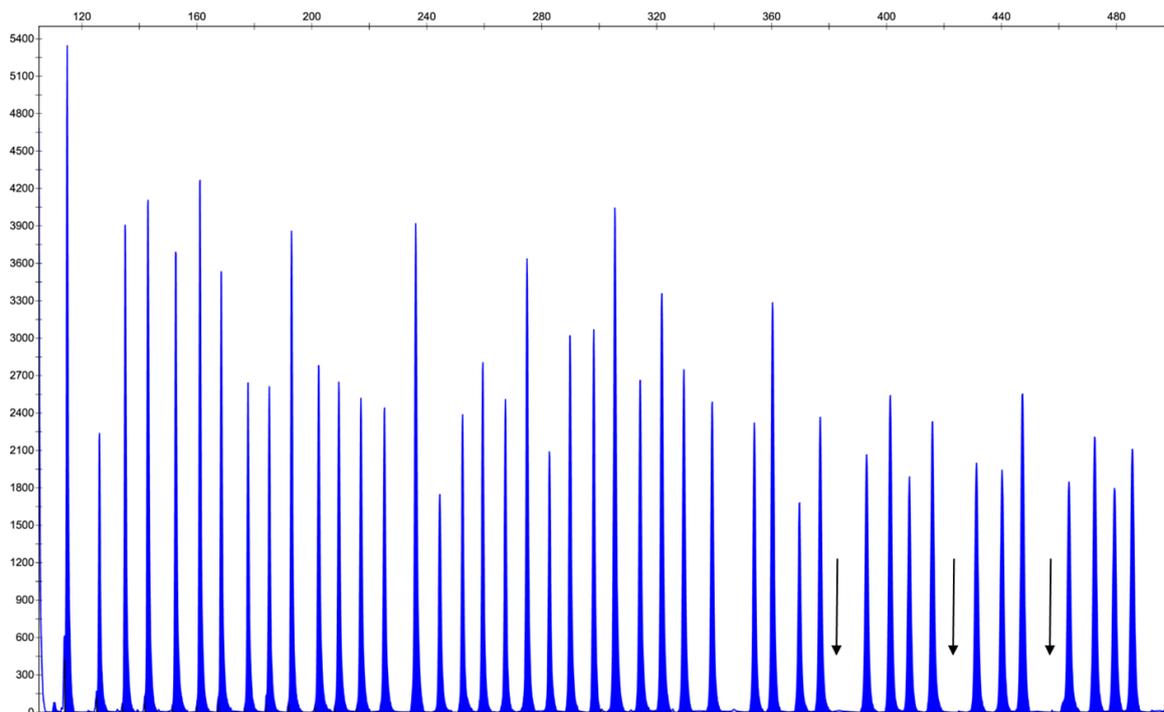


Figura 38. Electroforegrama afectado de delección completa de los exones 8-10.

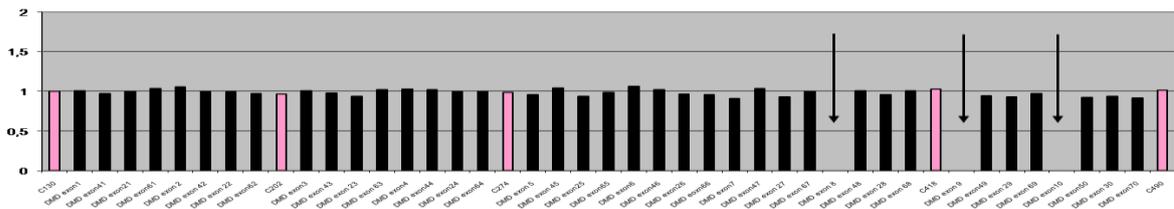


Figura 39. Gráfica RPA del paciente anterior en la que se aprecia ausencia total de las barras correspondientes a exones deletados.

4.2.3. VARÓN CON DUPLICACIÓN Y HERMANA PORTADORA.

Se muestra el caso de un varón de 9 años de edad para el que se solicita el estudio de MLPA para el gen DMD al presentar clínica compatible con DMD y que presenta Gowers positivo, alteraciones en la marcha, hipertrofia gemelar y aumento de CK. No se constatan antecedentes familiares de patología muscular.

En el electroforegrama (figura 42) se observa un aumento de área del pico correspondiente a los amplicones de los exones 48, 49 y 50 (marcados con línea roja). En la gráfica de RPA (figura 43) la barra correspondiente a los exones duplicados presenta una altura en torno a 2. Una duplicación supone que el varón para este exón presenta dosis génica doble, una ganancia del 100% para ese exón, por ello, en la gráfica RPA estos exones aparecen con un valor entre 1,75 y 2 (175% a 200% de dosis génica).

4. RESULTADOS

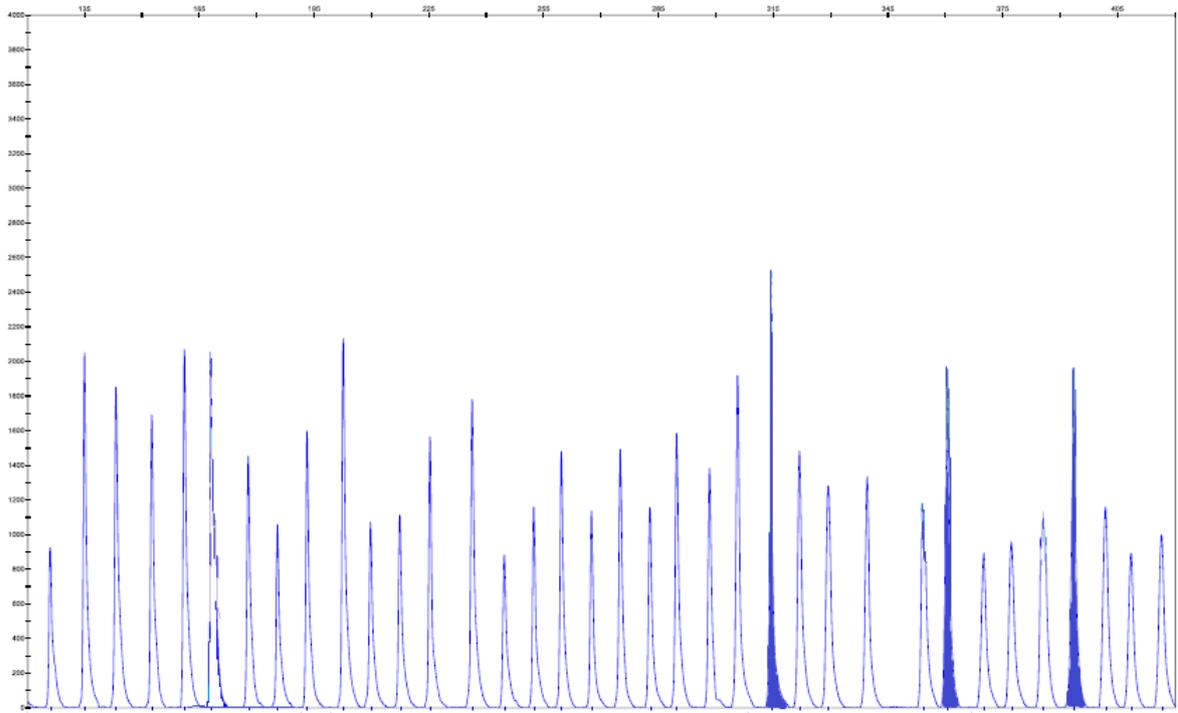


Figura 42. Gráfica RPA de la paciente anterior en la que se aprecia una altura normal en los exones que en su hijo aparecen deletados, tienen de dosis génica completa y su valor se sitúa en torno a 1 (100% de dosis génica).

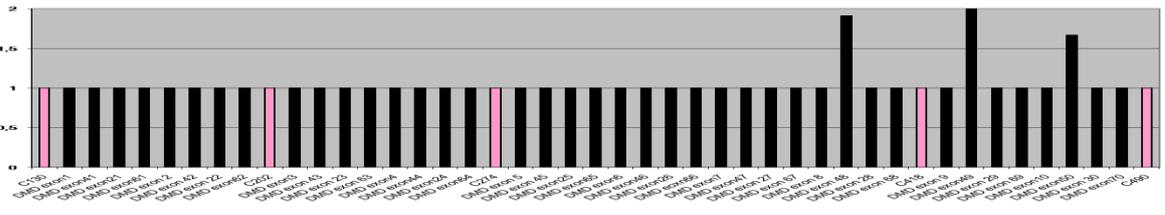


Figura 43. Gráfico RPA donde se muestra el aumento de altura de las barras representativas de los exones 48, 49 y 50 hasta una altura de 2 (200% de dosis génica).

4. RESULTADOS

Simultáneamente al estudio del varón se solicitó en su hermana. En este caso, el resultado para la niña fue positivo y se diagnosticaron las duplicaciones que se habían identificado en su hermano para los exones 48, 49 y 50. Las figuras del electroforegrama muestran los amplicones para los exones duplicados con un área superior a la esperable (figura 44) y en el gráfico RPA para todos los exones duplicados presentan una altura comprendida entre 1,50 y 1,75 (figura 45).

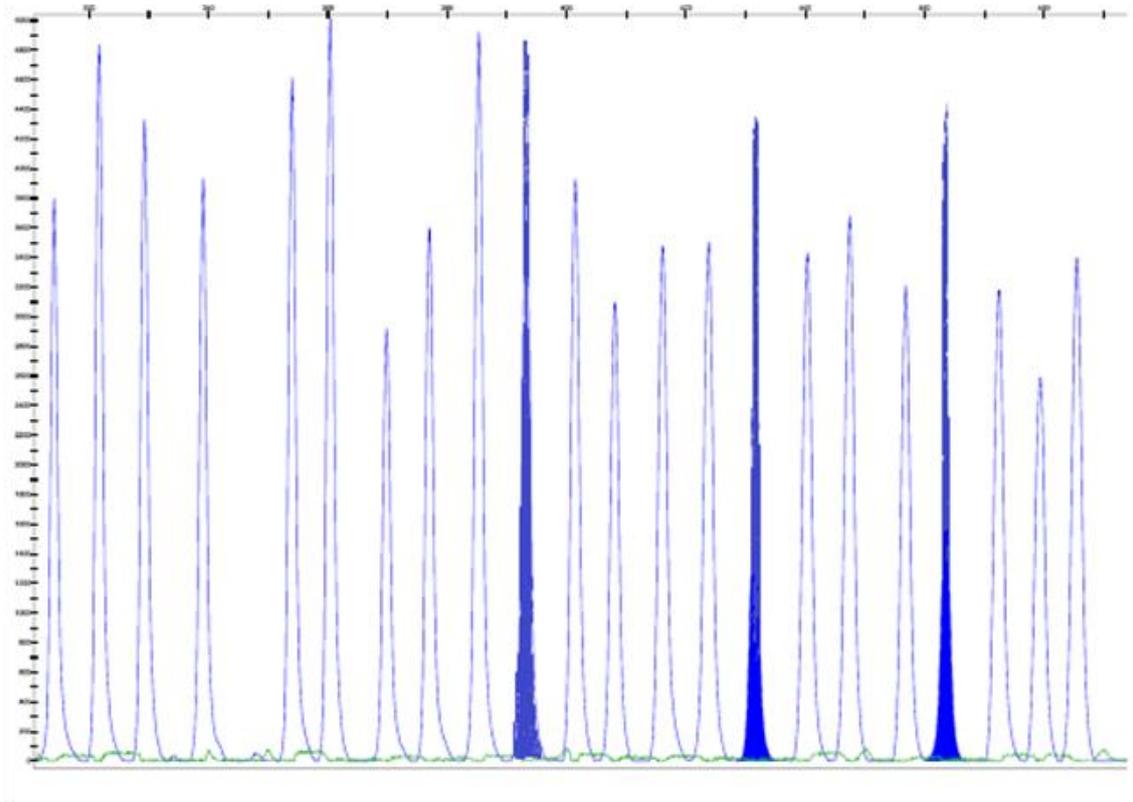


Figura 44. Electroforegrama de mujer afectada por la duplicación de los exones 48, 49 y 50. En este caso se ha sombreado el área bajo la curva de los exones duplicados.

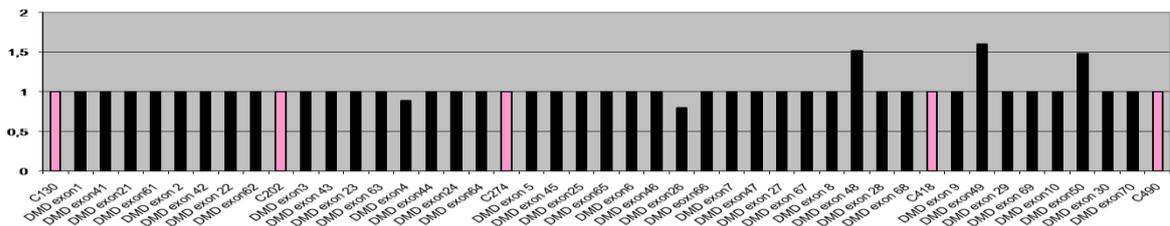


Figura 45. Gráfico RPA donde se muestra el aumento de altura de las barras representativas de los exones 48, 49 y 50 hasta una altura de 1,5 (150% de dosis génica).

4.2.4. VARÓN CON DUPLICACIÓN DEL EXÓN 2 Y MADRE NO PORTADORA.

Se muestra el caso de un varón de 4 años de edad para el que se solicita el estudio de MLPA para el gen DMD al presentar clínica compatible con DMD y que presenta Gowers positivo, alteraciones en la marcha, hipertrofia gemelar y aumento de CK. No se constatan antecedentes familiares de patología muscular.

En el electroforegrama (figura 46) se observa un aumento de área del pico correspondiente al amplicón del exón 2 (marcado con línea roja). En la gráfica de RPA (figura 47) la barra correspondiente al exón 2 presenta una altura en torno a 2. Una duplicación supone que el varón para este exón presenta dosis génica doble, una ganancia del 100% para ese exón, por ello, en la gráfica RPA este exón aparece con un valor entre 1,75 y 2 (175% a 200% de dosis génica).

4. RESULTADOS

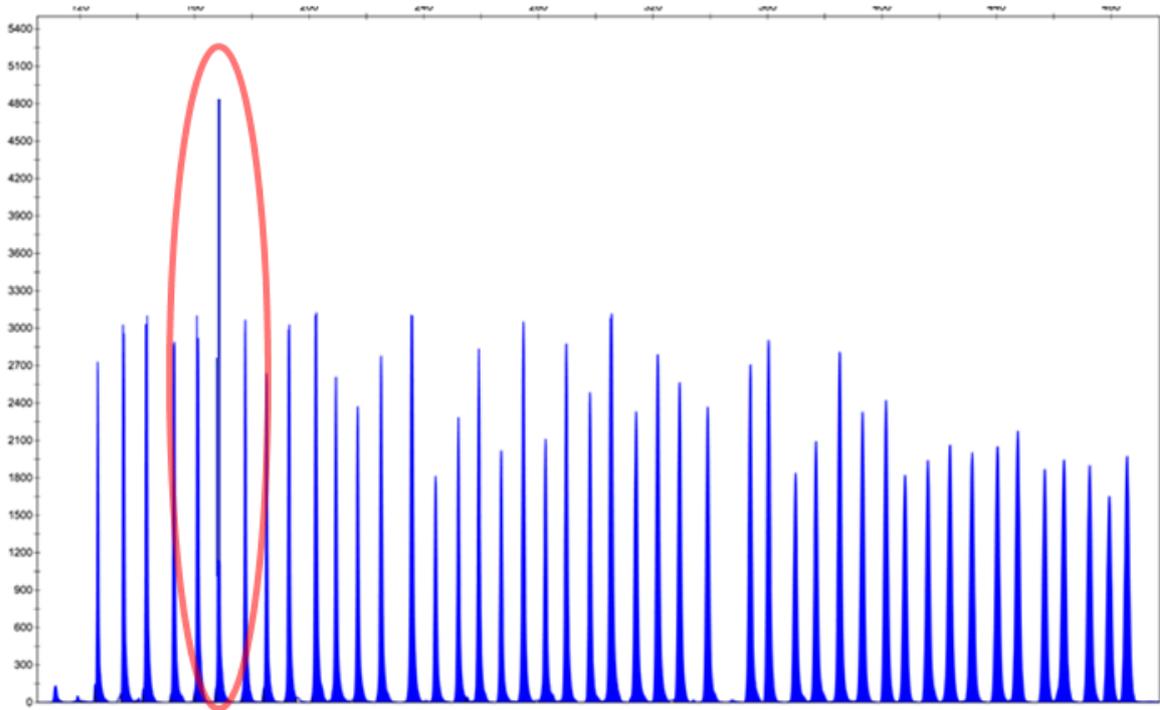


Figura 46. Electroforegrama del caso anterior afectado de duplicación del exón 2, se aprecia la altura y el incremento de área del exón afectado.

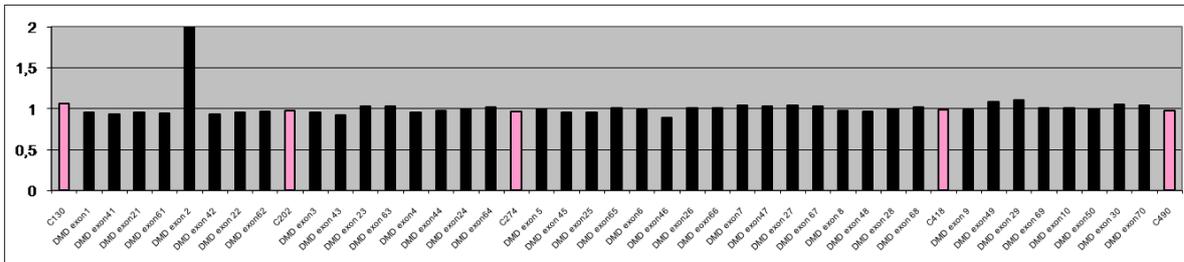


Figura 47. Gráfico RPA donde se muestra el aumento de la barra correspondiente al exón 2 hasta una altura de 2 (200% de dosis génica).

Después del resultado obtenido se solicita muestra materna para confirmar el estado de portadora de la madre. En este caso, el resultado para la mujer fue negativo y no se diagnosticó la duplicación que se había identificado en su hijo. Las figuras del electroforegrama materno muestran los amplicones para todos los exones con un área correspondiente a la esperable (figura 48) y en el gráfico RPA para todos los exones presentan una altura normal comprendida entre 0,75 y 1 (figura 49).

4.2.5. ESTUDIOS EN VARONES CON DELECIÓN EN UN ÚNICO EXÓN.

En el caso de los varones diagnosticados de delección de un solo exón, la técnica MLPA presenta una limitación debido a que mutaciones de pequeño tamaño en el exón impiden la hibridación y posterior ligado de las sondas correspondientes empeladas en su detección lo que produce como resultado u falso positivo en la delección del exón. Aunque el kit diagnóstico empleado incluye oligonucleótidos que cubren la gran mayoría de polimorfismos (SNP: single nucleotide polymorphisms) encontrados en el gen DMD puede ocurrir con muy poca probabilidad alteraciones en el gen no previstas. Por esto, en estos casos hemos empleado una técnica complementaria para confirmar el diagnóstico consistente en la amplificación por PCR y electroforesis de estos exones en geles de agarosa enfrentados a controles sanos. Se ha realizado el estudio para los pacientes con delección única de los exones 45, 48, 51 y 52: en todos los casos (9 pacientes) se ha comprobado la ausencia total de la banda correspondiente al exón estudiado (figuras 50 y 51).

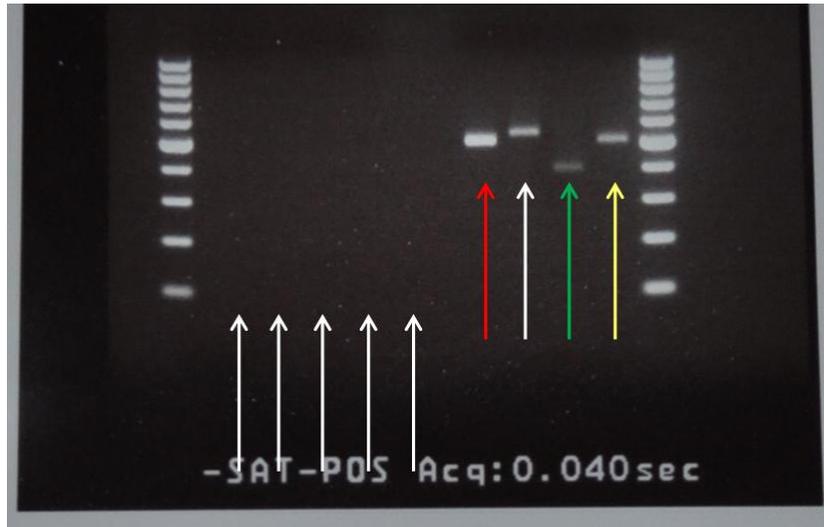


Figura 50. Las cinco flechas en blanco de la izquierda marcan los cinco pacientes varones con deleción única del exón 48, enfrentados a controles sanos para los exones 45 (en rojo), 48 (en blanco), 51 8en verde) y 52 (en amarillo). No se produce amplificación de la banda correspondiente al exón delecionado.

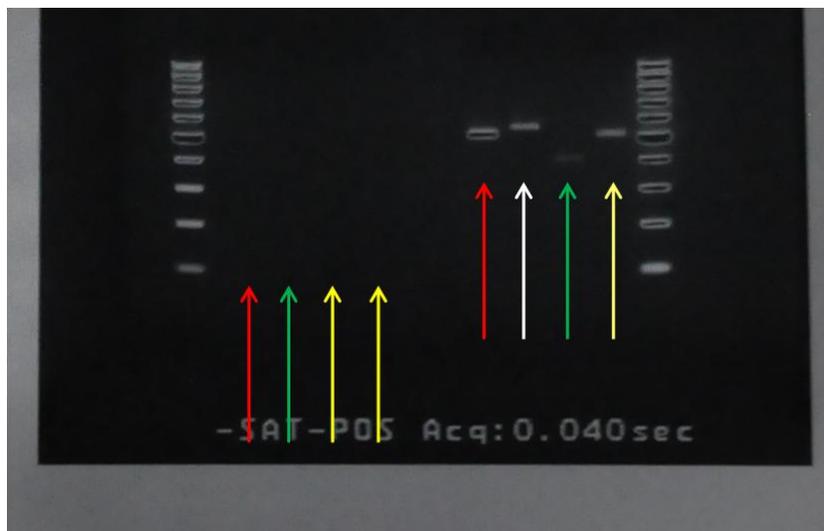


Figura 51. Las cuatro flechas coloreadas de la izquierda marcan los cuatro varones con deleción única, un paciente con deleción del exón 45 (en rojo), un paciente con deleción del exón 51 (en verde) y 2 pacientes con deleción del exón 52 (en amarillo) enfrentados a controles sanos para los exones 45 (en rojo), 48 (en blanco), 51 8en verde) y 52 (en amarillo). No se produce amplificación de la banda correspondiente al exón delecionado.

4. RESULTADOS

4.3. RESULTADOS DEL EMPLEO DE LA MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE MUTACIONES DEL GEN DE LA DISTROFINA.

4.3.1. RESULTADOS EN VARONES.

De los 84 estudios realizados en varones, 38 pacientes (45.23%) han presentado mutaciones detectables con MLPA del gen DMD y 46 pacientes (54.77%) no han presentado mutación detectable con MLPA (figura 52).

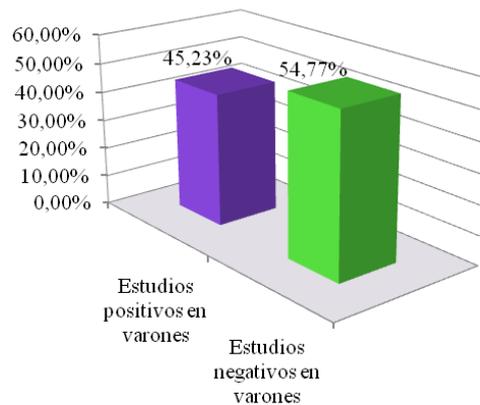


Figura 52. Gráfico de distribución de porcentajes según resultados positivos o negativos de los varones estudiados.

De entre los 38 varones afectados de mutación en el gen de la distrofina, en 34 (89.47%) se ha diagnosticado delección de exones y en 4 (10.52%) duplicación de exones (figura 53).

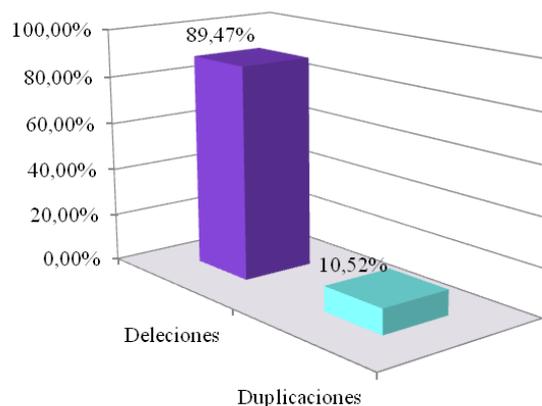


Figura 53. Distribución del porcentaje de delecciones y duplicaciones en los varones con resultado positivo de entre el total de estudios realizados en varones.

4. RESULTADOS

4.3.1.1. DELECCIONES EN VARONES.

En el caso de los 34 varones con estudio positivo para deleciones, 25 pacientes presentaron la deleción de 1 a 5 exones (73,53%), 6 pacientes presentan deleción de 6 a 10 exones (17,65%), un paciente presenta deleción de 15 exones (2,94%), un paciente presenta deleción de 37 exones (2,94%) y un paciente presenta deleción de 51 exones (2,94%) (figura 54).

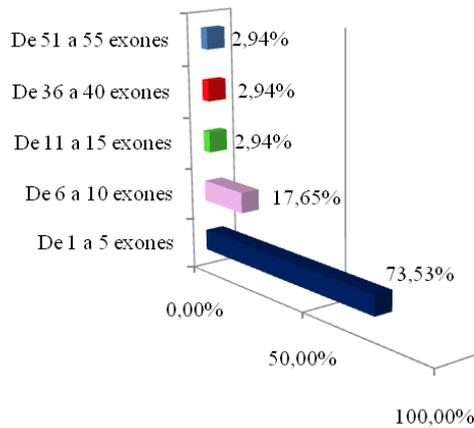


Figura 54. Porcentajes de pacientes según el número de exones delecionados de los varones estudiados con resultado positivo para deleciones.

Los datos recogidos en la tabla 13 y en la figura 55 ponen de manifiesto que la gran mayoría de las deleciones encontradas en los pacientes se sitúan en dos áreas entre los exones 3-16 y 45-52 correspondientes a las llamadas “zonas calientes” del gen DMD. De entre todos los exones, el afectado con mayor frecuencia corresponde en nuestra serie de casos al exón 48, no se han detectado alteraciones de tipo deleción en los exones comprendidos entre el 56 y 78 ni en el exón 2.

4. RESULTADOS

Tabla 13. Deleciones de los pacientes varones estudiados.

ID. PACIENTE	EXONES DELECIONADOS	N' EXONES DELECIONADOS
165	51	1
184	52	1
219	48	1
229	45	1
304	52	1
308	48	1
316	48	1
317	48	1
318	48	1
158	48, 49	2
223	1, PROMOTOR	2
254	49, 50	2
260	3, 4	2
300	49, 50	2
334	49, 50	2
171	46, 47, 48	3
240	45, 46, 47	3
250	45, 46, 47	3
251	45, 46, 47	3
161	45, 46, 47, 48	4
177	49, 50, 51, 52	4
275	45, 46, 47, 48	4
287	45, 46, 47, 48	4
266	3, 4, 5, 6, 7	5
289	3, 4, 5, 6, 7	5
182	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	8
188	48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	8

4. RESULTADOS

ID. PACIENTE	EXONES DELEACIONADOS	N° EXONES DELEACIONADOS
269	45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52	8
320	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	9
340	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	9
310	45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54	10
346	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	15
292	8 al 44	37
163	3 al 52 y promotor	51

4. RESULTADOS

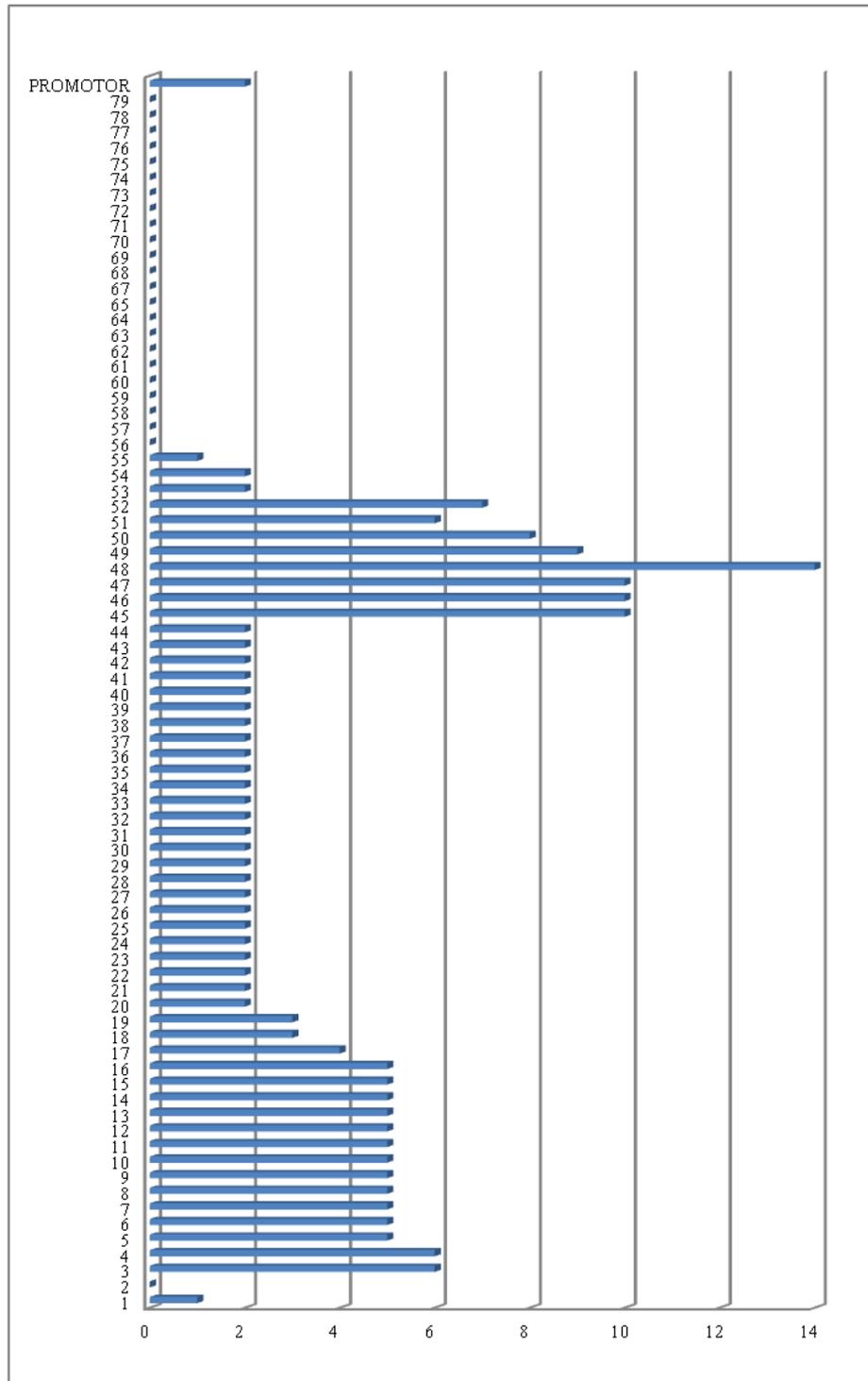


Figura 55. Representación esquemática de los exones delecionados en varones del gen DMD.

4. RESULTADOS

4.3.1.2. DUPLICACIONES EN VARONES.

De los 4 varones con estudio positivo para duplicaciones, 3 pacientes presentan la duplicación de 1 a 5 exones (75%), y un paciente presenta la duplicación de 27 exones (25%) (figura 56 y tabla 14).

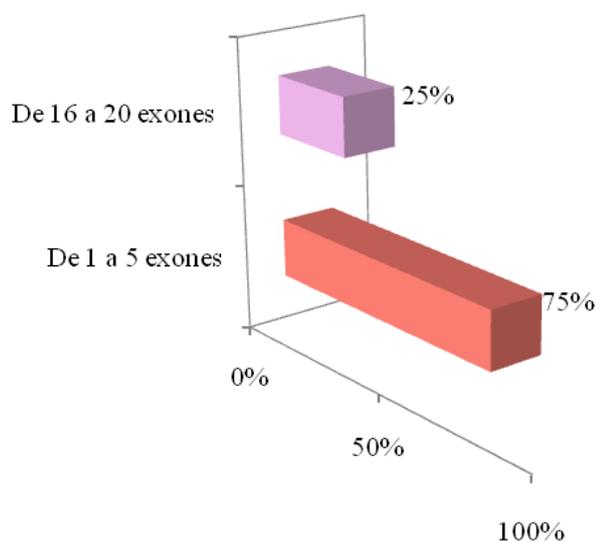


Figura 56. Porcentajes de pacientes según el número de exones duplicados de los varones estudiados con resultado positivo para duplicaciones.

Tabla 14. Duplicaciones de los varones estudiados.

ID. PACIENTE	EXONES DUPLICADOS	N° EXONES DUPLICADOS
283	52	1
341	2	1
204	48, 49, 50	3
344	19 al 44	26

4.3.1.3. ESTUDIOS EN VARONES CON RESULTADO NEGATIVO.

4. RESULTADOS

De los 46 varones a los que no se les detectó mutación alguna mediante la técnica MLPA, 15 fueron diagnosticados de DMD ya que presentaban signo de Gowers positivo, hipertrofia gemelar, trastorno de la marcha, datos electromiográficos, datos anatomo-patológicos y/o datos bioquímicos compatibles con DMDB y actualmente presentan graves problemas para la marcha (tabla 15). Estos datos hacen suponer que pueden presentar algún tipo de mutaciones no detectables mediante MLPA del tipo de pequeñas deleciones, inserciones o mutaciones puntuales, incluso en uno de estos pacientes se diagnosticó como portador de un “codón stop”.

En 4 pacientes se acabó diagnosticando otra miopatía distinta de DMDB, y en los 22 pacientes restantes no se aportaron datos clínicos suficientes o carecían de historia clínica. Los 5 pacientes restantes a los que no se les diagnosticó mutación son hermanos de casos índice diagnosticados (tabla 15).

Tabla 15. Tabla resumen de pacientes con antecedentes familiares, datos clínicos y evolutivos, datos en electromiograma y biopsia muscular compatible con DMDB. Pacientes con otras miopatías y con datos clínicos incompletos.

	EDAD	ANTECEDENTES FAMILIARES	CLINICA	DATOS LABORATORIO	ELECTROMIOGRAMA	BIOPSIA MUSCULAR	EVOLUCIÓN CLÍNICA
1	15	-	Compatible con DMB	Aumento de CK Aumento de transaminasas	-	Ausencia parcial de distrofina	Actualmente en silla de ruedas y programa de ventilación mecánica
2	1	-	Compatible con DMD	Aumento de CK	-	Ausencia de distrofina	Actualmente involución en habilidades motoras, sigue programa de Rehabilitación
3	16	-	Compatible con DMD	Aumento de CK Aumento de transaminasas	-	Ausencia de distrofina	
4	10	-	Compatible con DMD	Aumento de CK Aumento de transaminasas	Análisis genético en laboratorio externo: presencia de “codon stop” en gen DMD		
5	11	Sí	Compatible con DMD	Aumento de CK	-	Ausencia de distrofina	-
6	10	Sí	Compatible con DMD	Aumento de CK	-	Ausencia de distrofina	-
7	20	-	Compatible con DMD	Aumento de CK Aumento de transaminasas	Patrón miopático	Ausencia de distrofina	Actualmente en silla de ruedas
8	10	-	Compatible	Aumento de CK	-	-	Actualmente en

4. RESULTADOS

	EDAD	ANTECEDENTES FAMILIARES	CLINICA	DATOS LABORATORIO	ELECTROMIOGRAMA	BIOPSIA MUSCULAR	EVOLUCIÓN CLÍNICA
			con DMD				silla de ruedas
9	44	Sí	Compatible con DMB	Aumento de CK	Patrón miopático	Ausencia parcial de distrofina	Actualmente en programa de Rehabilitación
10	24	Sí	Compatible con DMB	Aumento de CK	Patrón miopático	Ausencia parcial de distrofina	Pacientes hermanos, sin datos de evolución clínica
11	22			Aumento de Transaminasas			
12	1.5	-	Compatible con DMD	Aumento de CK	Patrón miopático	Ausencia de distrofina	Actualmente en programa de Rehabilitación
13	21	-	Compatible con DMD	Aumento de CK Aumento de Transaminasas	-	Ausencia de distrofina	Actualmente en silla de ruedas
14	9	Sí	Compatible con DMB	Aumento de CK	-	Ausencia parcial de distrofina	Sin datos de evolución clínica
15	3	-	Compatible con DMD	Aumento de CK Aumento de transaminasas	-	Pendiente de resultado de biopsia muscular	Actualmente en programa de Rehabilitación
Pacientes con diagnóstico de otras miopatías				Distrofia de cinturas: 3 pacientes Miopatía de Steinert: 1 paciente			
Pacientes con datos clínicos incompletos/ausentes				22 pacientes remitidos por síntomas inespecíficos entre los que se encuentran disminución de fuerza, calambres, hipertransaminasemia, hiperCKemia, antecedentes familiares poco claros, retraso psico-motor,...			
Hermanos de casos índice diagnosticados de mutaciones				5 pacientes			

Tomando en consideración a los 15 pacientes no diagnosticados mediante MLPA con clínica compatible con DMDB y por tanto afectados de mutaciones distintas a deleciones o duplicaciones tales como pequeñas deleciones, inserciones o mutaciones puntuales del gen DMD, el número de pacientes afectados de deleciones, duplicaciones y otras mutaciones en la muestra estudiada sería:

- 34 pacientes afectados por deleciones que supone un 64.5% del total de casos clínicos positivos.
- 4 pacientes afectados por duplicaciones que suponen el 7.54% del total de casos clínicos positivos.

4. RESULTADOS

- 15 pacientes afectados de otras mutaciones que suponen el 28.30% del total de los 53 varones afectados de DMDB (figura 57).

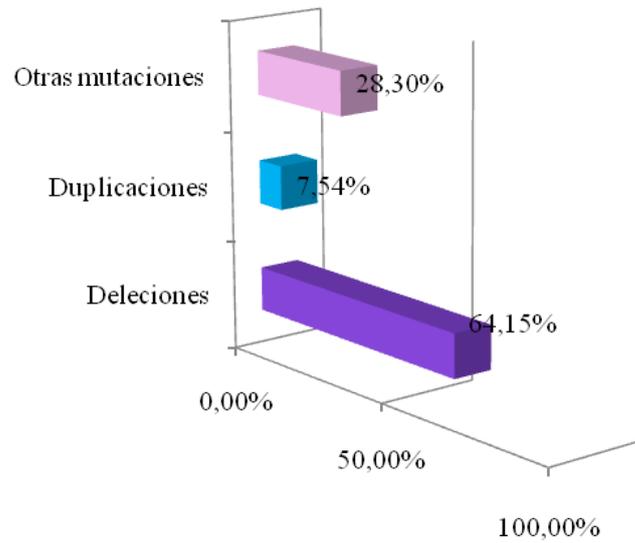


Figura 57. Gráfico que incluye el porcentaje del total de pacientes que tienen clínica compatible con DMDB.

4. RESULTADOS

4.3.2. RESULTADOS EN MUJERES.

De los 212 cromosomas X estudiados correspondientes a 106 mujeres, 39 (36,79%) se diagnosticaron como portadoras de mutación y en 67 (63,21%) no se detectaron ni deleciones ni duplicaciones (figura 58).

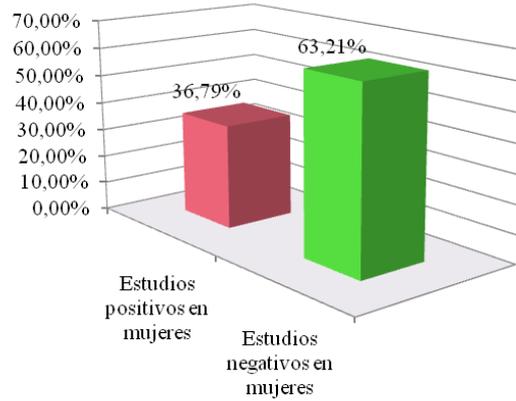


Figura 58. Gráfico de distribución de porcentajes según resultados positivos o negativos de las mujeres estudiadas.

De las 39 mujeres afectadas de mutación en el gen de la distrofina, 35 (89,74 %) se diagnosticaron de deleción de exones y 4 (10,25%) de duplicación de exones (figura 59).

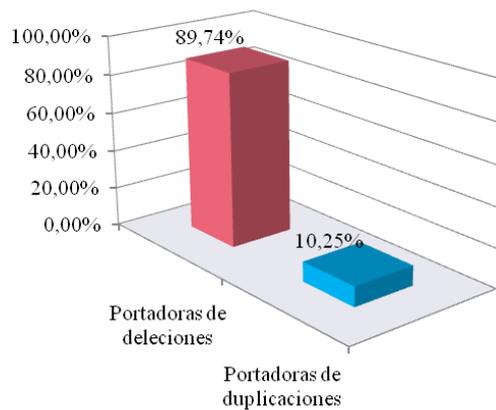


Figura 59. Gráfico de distribución de porcentajes según el resultado de los estudios MLPA realizados en mujeres que presentan deleciones y duplicaciones.

IV.4.3.1. DELECCIONES EN MUJERES.

En el caso de las 35 mujeres con estudio positivo para deleciones, 25 pacientes presentaron la deleción de 1 a 5 exones (71,43%), 6 pacientes presentan deleción de 6 a 10 exones (17,14%), 3 pacientes presentan deleción 11 a 15 exones (8,57%) y una paciente presenta deleción de 51 exones (2,86%) (figura 60).

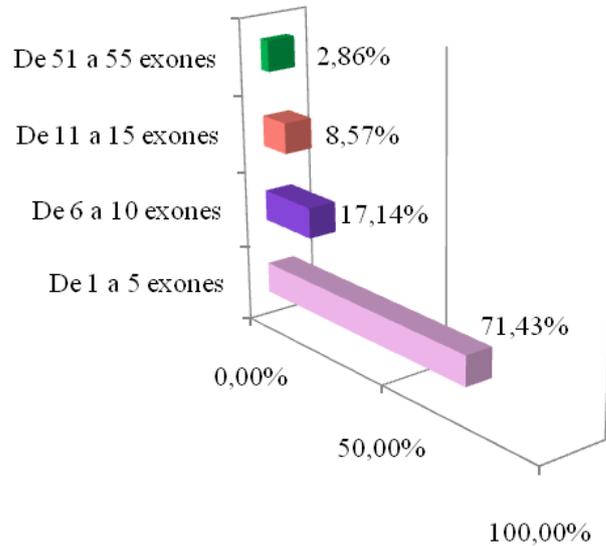


Figura 60. Porcentajes de pacientes según el número de exones delecionados de las mujeres estudiadas con resultado positivo para deleciones.

Los datos recogidos en la tabla 16 y en la figura 61 ponen de manifiesto que la gran mayoría de las deleciones encontradas en las mujeres se sitúan en dos áreas entre los exones 3-16 y 45-52 correspondientes a las llamadas “zonas calientes” del gen DMD. De entre todos los exones, el afectado con mayor frecuencia corresponde en nuestra serie de casos al exón 48, no se han detectado alteraciones de tipo deleción en los exones comprendidos entre el 56 y 78 ni en el exón 2. Como era de esperar los datos son superponibles a los obtenidos en los varones.

4. RESULTADOS

Tabla 16. Deleciones en las mujeres estudiadas.

ID PORTADORA	EXONES DELECIONADOS	N° EXONES DELECIONADOS
162	48	1
166	50	1
168	48	1
172	48	1
175	48	1
220	48	1
230	45	1
305	52	1
306	52	1
311	45	1
314	48	1
315	48	1
187	49, 50	2
222	1 y promotor	2
224	49, 50	2
225	49, 50	2
351	3, 4	2
336	49, 50	2
241	45, 46, 47	3
350	45, 46, 47	3
228	45, 46, 47, 48	4
277	3, 4, 5, 6, 7	5
290	3, 4, 5, 6, 7	5
342	3, 4, 5, 6, 7	5
185	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	8
193	48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	8
195	48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	8

4. RESULTADOS

ID PORTADORA	EXONES DELECCIONADOS	Nº EXONES DELECCIONADOS
236	48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55	8
264	45 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54	10
265	45 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54	10
355	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	15
357	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	15
365	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	15
299	8 al 44	37
164	3 al 52 y promotor	51

4. RESULTADOS

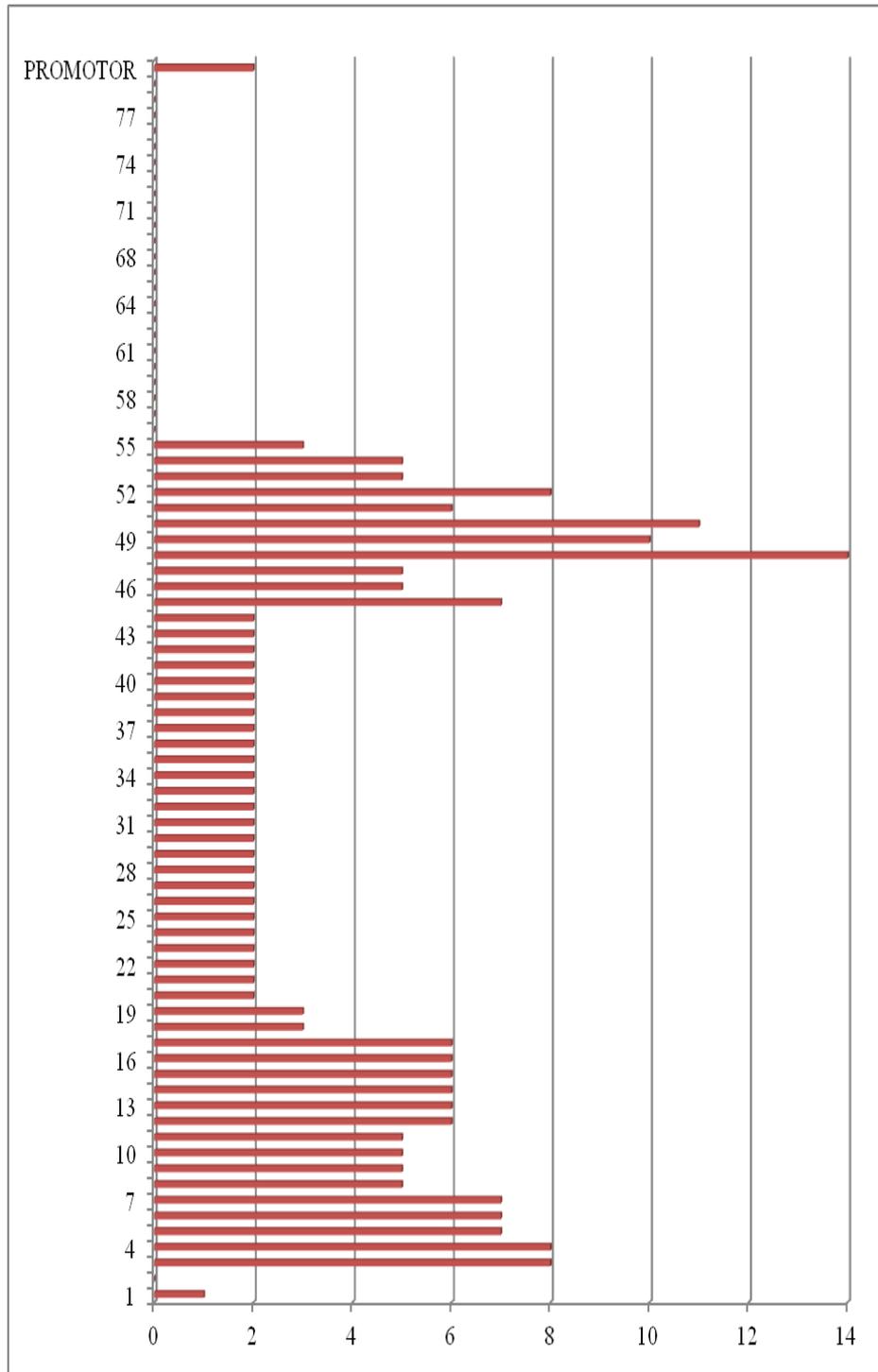


Figura 61. Representación esquemática de los exones delecionados en mujeres del gen DMD.

Los datos son superponibles a los obtenidos para los estudios en varones.

4. RESULTADOS

4.3.2.2. DUPLICACIONES EN MUJERES.

De las 4 mujeres con estudio positivo para duplicaciones, 3 pacientes presentan la duplicación de 1 a 5 exones (75%), y una paciente presenta la duplicación de 17 exones (25%) (figura 62 y tabla 17).

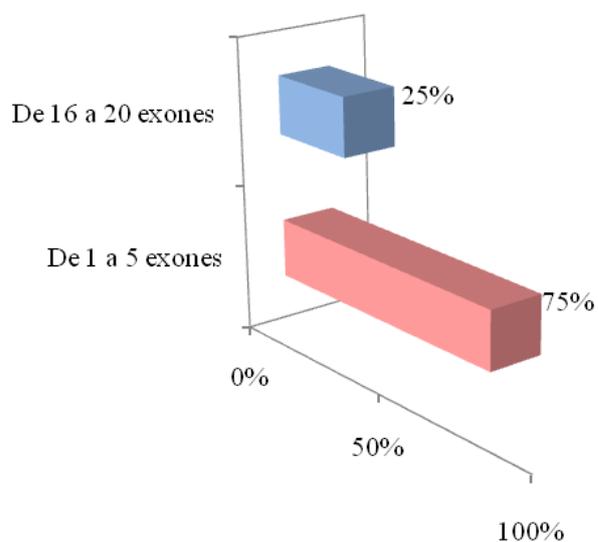


Figura 62. Porcentajes de mujeres según el número de exones duplicados de las mujeres estudiadas con resultado positivo para duplicaciones.

Tabla 17. Deleciones en las mujeres estudiadas.

ID. PORTADORA	EXONES DUPLICADOS	N' EXONES DUPLICADOS
205	48, 49, 50	3
255	48, 49, 50	3
256	48, 49, 50	3
328	61 al 77	17

4.3.3. ESTUDIOS FAMILIARES.

De las 106 mujeres estudiadas (tabla 18), 39 fueron portadoras de mutaciones detectables mediante MLPA, entre ellas se incluyen:

- 20 mujeres madres de varones con mutación positiva.
- 7 hermanas y primas de varones con mutación positiva.
- 4 tías maternas de varones con mutación positiva.
- 8 abuelas maternas de varones con mutación positiva.

De las mujeres madres de casos varones con mutación positiva (38 varones), se ha realizado estudio secuenciado hijo-madre en 24 casos, en los 14 casos índice restantes no se ha tenido acceso a muestra materna por las siguientes razones: en 4 casos la madre había fallecido, en 2 casos la madre vivía fuera de España y en 8 casos la muestra materna no llegó a nuestro laboratorio, a pesar de recomendar su estudio en el informe del caso índice.

Las mujeres restantes estudiadas con estudio negativo (67 mujeres), incluyen:

- 4 mujeres madres de varones con mutación positiva que no son portadoras de la misma.
- 25 hermanas y primas de varones con mutación positiva.
- 11 tías maternas de varones con mutación positiva.
- 4 abuelas maternas de varones con mutación positiva.
- 14 mujeres familiares de afectados ya fallecidos.
- 4 mujeres, hijas de varones afectados clínicamente de Distrofia Muscular de Becker.
- 5 niñas con valores de CK tres veces superior al rango de normalidad y clínica muscular inespecífica no sugerente de DMDB.

Todos estos datos quedan resumidos en la tabla 18.

4. RESULTADOS

Tabla 18. Resumen de las mujeres estudiadas mediante MLPA.

PARENTESCO CON EL CASO ÍNDICE	NÚMERO DE PACIENTES	RESULTADOS	
		POSITIVOS	NEGATIVOS
MADRES: madres de varones con mutaciones	24	20	4
HERMANAS Y PRIMAS: hermanas y primas de varones con mutaciones y madre portadora	32	7	25
TÍAS: tías maternas de varones con mutaciones y madre portadora	15	4	11
ABUELAS: abuelas de varones con mutaciones y madre portadora	12	8	4
CLÍNICA EN FAMILIARES FALLECIDOS: mujeres en las que se constatan antecedentes clínicos	14		14
HIJAS DE DMB: hijas de varones afectados por clínica de DMB	4		4
AUMENTO DE CK: niñas con aumento de CK y clínica muscular	5		5
TOTALES	106	39	67

4.3.3.1. ESTUDIOS DE CASOS ÍNDICE POSITIVOS Y SUS MADRES.

Los resultados de los 24 estudios familiares que incluyen madre-caso índice varón se muestran en la tabla 19. En cuatro de estos estudios no se ha diagnosticado la mutación del caso índice en la madre: un varón con delección de los exones 45-47, otro con delección de los exones 3-4, otro con delección de los exones 8-16 y un último varón con duplicación del exón 2, lo que supone un 16,66% del total de los casos familiares estudiados (figura 63).

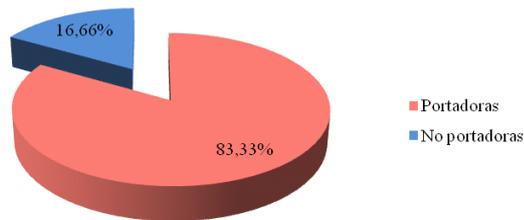


Figura 63. Porcentaje de portadoras y no portadoras diagnosticadas en estudios madre-hijo.

El hecho de no diagnosticar una mutación relacionada con DMDB en la madre de un varón afectado supone que se trata de una mutación “de novo” en el varón. Este hallazgo es relevante puesto que supone que en estos casos no se puede descartar la existencia de mosaicismos germinales que permitan la recurrencia del caso en una siguiente gestación de la madre no portadora.

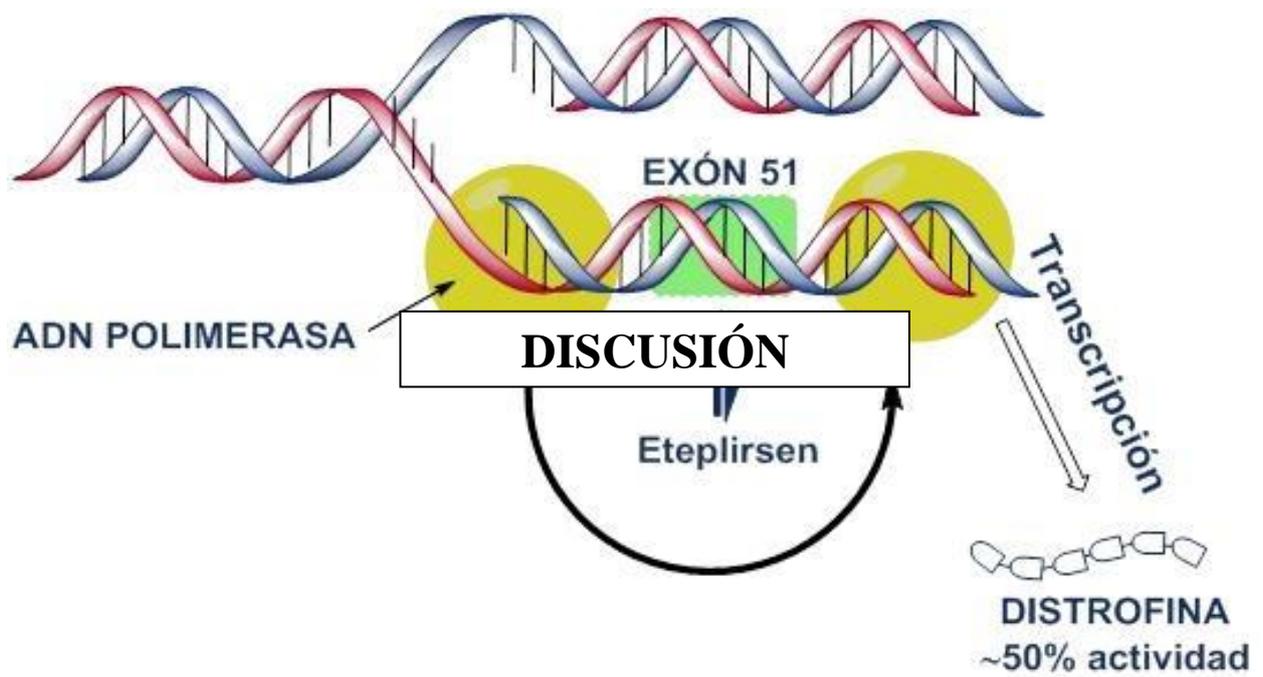
4. RESULTADOS

Tabla 19. Resumen de los estudios caso índice-madre realizados.

Exones afectados en varones			Exones afectados en mujeres	
Edad de los varones (años)	Delección	Duplicación	Delección	Duplicación
42	48-49	-	48-49	-
12	3-52- promotor	-	3-52- promotor	-
7	46-48	-	46-48	-
19	12-19	-	12-19	-
6	48-55	-	48-55	-
5	48	-	48	-
15	1- promotor	-	1- promotor	-
15	45	-	45	-
21	45-47	-	45-47	-
4	45-47	-	Mutación ausente	-
19	3-7	-	3-7	-
3	45-52	-	45-52	-

4. RESULTADOS

Exones afectados en varones			Exones afectados en mujeres	
Edad de los varones (años)	Delección	Duplicación	Delección	Duplicación
1	3-7	-	3-7	-
10	3-4	-	Mutación ausente	-
1	52	-	52	-
1	45-54	-	45-54	-
21	48	-	48	-
1	8-16	-	Mutación ausente	-
15	61-77	-	61-77	-
6	49-50	-	49-50	-
5	-	2	-	Mutación ausente
2	3-17	-	3-17	-
2	49-52	-	49-52	-
8	8-44	-	8-44	-



5. DISCUSIÓN.

La Unión Europea define una Enfermedad Rara (ER) como aquella cuya prevalencia es menor de 5/10000 habitantes en la comunidad y sobre la que falta conocimiento acerca de ciertos aspectos científicos. Se estima que en Europa hay del orden de 20 a 30 millones de personas afectadas por este tipo de patologías, y en España, unos 3 millones de personas (Comité español de representantes de personas con discapacidad- Cermi.es, 2002; Izquierdo-Martínez et al., 2003).

Dentro de las Enfermedades Raras se incluyen gran cantidad de patologías con etiopatogenia distinta, de evolución crónica con morbi-mortalidad prematura y generadoras de un alto grado de discapacidad que produce un deterioro significativo en la calidad de vida de los afectados (Posada de la Paz M et al., 2002). Las enfermedades raras son problemas importantes para la salud pública en España, sobre todo en términos de carga económica de la enfermedad.

A pesar de recibir el calificativo de raras, estas enfermedades consumen gran cantidad de recursos sanitarios y familiares, de modo que se estima que una familia invierte el 20% de su presupuesto anual en el cuidado de un miembro afectado de DMDB. Según los datos publicados en el Proyecto IMSERSO 167/10 del año 2012 los costes medios anuales para un afectado de Distrofia Muscular de Duchenne se sitúan en 94171€, muy por encima de los estimados para patología como la epidermolisis bullosa (33903€), la esclerodermia (18288€) o la fibrosis quística (37343€). Considerando la magnitud de los costes de estos pacientes, la investigación del coste-efectividad de las diferentes intervenciones para estas patologías debería ser prioritaria.

Se estima que en España puede haber unas 20000 familias afectadas por este tipo de patologías (Cermi.es, 2002), lo que supone un gran número de afectados directa o indirectamente por la enfermedad.

El rápido avance que está produciéndose en el terreno de la Biología Molecular está cambiando muchos aspectos hasta ahora tradicionales en este tipo de patologías, ya que muchas de ellas tienen un componente genético y hereditario. En la era post-genómica de los últimos veinte años, la descodificación de la información encriptada en la secuencia genómica humana ha permitido la extensión del conocimiento sobre las bases moleculares de las Enfermedades Raras, esto hace necesario la creación de test que permitan el diagnóstico rápido, seguro y fiable de estas patologías a nivel molecular. Por ello, ha aumentado enormemente el número de laboratorios dedicados a diagnóstico e investigación en Genética Molecular.

La disponibilidad de nuevas técnicas y herramientas de la biología molecular, la imaginación y osadía de los investigadores y la necesidad de abordar los estudios genéticos a través de nuevas aproximaciones condujo a mitad de los años 80 del pasado siglo a proponer un proyecto que diera como resultado el conocimiento de la estructura e todos los genes humanos. Con el apoyo del NIH (National Institutes of Health) y del Departamento de Energía de los Estados Unidos nace finalmente el 1 de Octubre de 1990 el “Proyecto Genoma Humano”.

El conocimiento de la secuencia del genoma humano ha contribuido como ningún otro acontecimiento científico al conocimiento de los genes responsables de las enfermedades, al establecimiento y clasificación de los mecanismos de las enfermedades de origen genético, al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y ha abierto las puertas a la investigación de nuevas estrategias terapéuticas. Todos estos acontecimientos están transformando la práctica de la medicina moderna al mismo tiempo que las nuevas técnicas desarrolladas gracias al “Proyecto Genoma Humano” ofrecen oportunidades sin precedentes para el estudio de la biología humana y de las enfermedades por vías completamente nuevas.

En la actualidad es posible conocer las diferencias entre un gen normal y el gen responsable de una enfermedad, lo que ha permitido diseñar pruebas específicas que detectan esas diferencias y así poder diagnosticar a nivel molecular la enfermedad.

Recientemente el análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sufrido un gran avance ya que se han podido detectar, cuantificar y en cierta manera automatizar estos procesos gracias a una nueva tecnología basada en la detección de la fluorescencia del ADN marcado (Fluorescence Based DNA Analysis Technology, FDTA). Esta combinación de tecnología PCR/FDTA ofrece el potencial suficiente para automatizar y caracterizar a bajo costo las mutaciones genéticas.

Esta tecnología permite realizar:

- Secuenciación automática de 600 bases con 98,5% de exactitud en un tiempo total de 2,5 horas.
- Medición de tamaños de diferentes fragmentos de DNA con una resolución de 2 bases en un tiempo de unos 20 minutos.
- Cuantificación de productos RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa) de hasta 1000 pares de bases con una precisión mayor del 4%.
- Detección automática de fragmentos de ADN marcados con fluorescencia mediante electroforesis capilar.

El uso de la tecnología PCR/FDAT junto con la electroforesis capilar aumenta significativamente tanto la resolución como la sensibilidad de los ensayos, lo que permite trabajar con cantidades de ADN mucho menores con un menor número de ciclos para la amplificación por PCR.

Para el diagnóstico de la Distrofia Muscular de Duchenne Becker se han empleado distintas metodologías entre las que se encuentran el southern-blot, la PCR cuantitativa, la hibridación fluorescentes in situ (FISH) e Hibridación multiplex (MAPH); pero estas técnicas sólo han conseguido el diagnóstico de regiones concretas del gen DMD (cubren un 20-30% de los 79 exones del gen) por lo que resultan insuficientes para un diagnóstico adecuado (Chamberlain et al., 1988).

En nuestro laboratorio se ha usado la tecnología PCR/FDTA desde el año 1998 para el diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne Becker: primero se usaron técnicas para la detección de alteraciones en el número de copias de exones del gen DMD en las denominadas zonas calientes (exones 3, 4, 6, 8, 12, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 51, 52, 60 y promotor cerebral, Chamberlain et al., 1988; Arauzo et al., 1999).

Posteriormente, en el año 2005 se introduce la tecnología considerada fundamental en el diagnóstico de las deleciones y duplicaciones del gen DMD en varones afectados y en portadoras, la Multiplex Ligation Probe Amplification, MLPA (Gatta et al., 2005). La mejora que supuso el uso de la tecnología MLPA en el rendimiento diagnóstico es evidente comparando los datos previos obtenidos desde 1998 a 2005 con los actuales: mediante el uso de PCR multiplex se diagnosticaron desde 1998 a 2005 un 43,39% de los varones estudiados, mientras que mediante el uso de MLPA hemos podido realizar un diagnóstico fiable en el 45,23% de estos varones.

La validez de la técnica MLPA como método diagnóstico de DMDB ha sido ampliamente refrendada por multitud de estudios (Jansen et al., 2005; Gatta et al., 2005), tanto en el diagnóstico de casos índice como de portadoras.

El conocimiento de la frecuencia de una Enfermedad Rara es esencial para la planificación asistencial y la organización de los recursos sanitarios. El estudio de la epidemiología de las Distrofias Musculares constituye una asignatura pendiente a nivel mundial, pero especialmente en España (Camacho et al., 2015) donde no existen datos sobre la incidencia ni la prevalencia de estas enfermedades. Aunque se publican gran cantidad de artículos científicos sobre la Distrofia Muscular de Duchenne Becker la gran mayoría de ellos se centran de forma habitual en aspectos fisiopatológicos, diagnósticos o terapéuticos. En este sentido, el trabajo publicado por Emery en 1991 continúa siendo una referencia a la hora de hablar de prevalencia e incidencia de la Distrofia Muscular de Duchenne. Las búsquedas que incluyen "Duchenne, incidencia y España" en la web PubMed.gov no reportan un solo artículo.

La incidencia estimada para la DMD es de 1/3500 varones (Emery AE, 1991), frente a esta cifra clásica Mah et al. en 2014 han publicado el resultado de un metaanálisis que incluye 31 estudios realizados en Norteamérica y Europa y en el que se estima la prevalencia de DMD en 4,78 por 100.000 varones, pero la incidencia no pudo analizarse por la disparidad entre estudios y la escasez de publicaciones en este sentido (Mah et al., 2014).

Durante el periodo de tiempo incluido en nuestro estudio, nacieron en las provincias estudiadas 133.230 varones, de acuerdo a los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística, lo que supone que la incidencia de la enfermedad, teniendo en cuenta sólo los 38 pacientes con diagnóstico molecular positivo mediante MLPA sería de 1 de cada 3.506 varones nacidos vivos. Esta cifra coincide con los datos publicados por autores como Emery (Emery et al., 1991), y dista un poco más de la cifra de 1 de cada 4685 publicada por Helderma- van der Enden en 2012 (Helderma-van der Enden et al., 2012). Otros datos de incidencia aportados en la literatura son las de Nigro, 1: 4608 (Nigro et al., 1983), Williams, 1: 3424 (Williams et al., 1983) y van Essen 1: 4215 (van Essen et al., 1992).

Hay que considerar que estos datos hacen referencia a la incidencia de la enfermedad debido sólo a deleciones y duplicaciones de los exones comprendidos en las zonas calientes (zonas entre los exones 2-20 y 45-53). Nuestros resultados aportan por primera vez datos de la incidencia de esta enfermedad en la población andaluza tomando en consideración los enfermos afectados de deleciones y duplicaciones en todos los exones del gen DMD.

Si se consideran además los 15 pacientes diagnosticados de DMD por su clínica la incidencia de la enfermedad en nuestra población sería de 1 de cada 2.514 varones nacidos vivos. Aunque la cifra de varones estudiados en nuestra serie pudiera parecer escasa, teniendo en cuenta los 133.230 varones nacidos los datos de cálculo reflejan que en nuestra población de estudio la incidencia está acorde con lo reportado hasta este momento por la literatura científica.

La edad media del diagnóstico en nuestro estudio fue de 8,55 años (DS 6,88 años), para otros autores la edad media del diagnóstico se sitúa en torno a los 5 años de edad (Magri et al., 2011).

Teniendo en cuenta los 15 pacientes varones con clínica y biopsia muscular compatible con DMD/DMB susceptibles de portar mutaciones no diagnosticables con MLPA tales como pequeñas deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, junto a los 38 pacientes diagnosticados con la tecnología MLPA, el porcentaje de las mutaciones detectadas en los 53 pacientes corresponde en un 64.15% a deleciones, un 7.54% a duplicaciones y un 28.30% a pequeñas deleciones, inserciones o mutaciones puntuales del gen DMD, datos que coinciden con lo publicado en la "Leiden DMD Mutation database", que considera los siguientes porcentajes: 72% para deleciones, 7% para duplicaciones y en torno a un 20% para pequeñas mutaciones no detectables mediante MLPA.

Si tiene relevancia diagnosticar una alteración molecular en un varón afectado por DMD, tanto o más importante es realizar un diagnóstico en los familiares del mismo a la hora de realizar un asesoramiento genético adecuado. Por ello, en estos casos, el diagnóstico de una mutación en una madre es de vital importancia: la probabilidad de transmitir la mutación a su descendencia para una madre portadora es del 50%, por tanto los hijos tendrían un 50% de probabilidad de padecer DMD y las hijas una probabilidad del 50% de ser portadoras y transmisoras de la patología a su descendencia.

En nuestro estudio se han diagnosticado como portadoras de mutación un 36,79% de las mujeres estudiadas: 89,24% de deleciones y 10,25% de duplicaciones. En estos casos con patrón de transmisión clásico se debe realizar el estudio de portadoras en las familiares de primer grado de la madre. Aunque habitualmente una mujer portadora no suele presentar síntomas (salvo que sufra inactivación del cromosoma X sano) se han descrito manifestaciones clínicas entre el 2,5% y 7,8% de las mismas (Soltanzadeh et al., 2010). Entre las manifestaciones que una portadora puede presentar están alteraciones musculares menores o medias como calambres o pérdida de fuerzas y miocardiopatía (Bushby et al., 2010), por lo que se requiere un control cardíaco y neurológico regular acorde con la sintomatología de la paciente.

Se han realizado 24 estudios de madre-hijo resultando que 20 de las madres (83,33%) eran portadoras de la mutación diagnosticada en su hijo. En las 4 madres restantes (16,66% de los casos) no se consiguió diagnosticar la mutación, por lo que se supone que dicha mutación ha ocurrido "de novo".

Desde que Haldane predijo en el año 1935 que la proporción de casos de mutaciones

espontáneas en el gen de la distrofina suponía un tercio de todos los enfermos de esta patología y dada la importancia de este hecho se han llevado a cabo estudios tratando de comprobar las predicciones de Haldane con resultados diferentes. En algunos casos la proporción de mutaciones esporádicas se acercan a lo predicho por Haldane (Caskey et al., 1980), mientras que otros autores encuentran que la frecuencia de estos casos es superior (Lane et al., 1983) o inferior situándose en torno a un 20% (Barbujani et al., 1990). En nuestro estudio, el porcentaje de varones afectados por una mutación esporádica (16.6%) es una cifra cercana a la reportada por Barbujani et al., 1990.

La ocurrencia de una mutación de novo durante el desarrollo del cigoto puede tener distintas consecuencias en el ulterior desarrollo del individuo dependiendo del momento en el que se produzca dicha mutación: la mayoría de los pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne y mutación de novo la presentan en todas las células (somáticas y germinales), en estos casos se determina que el origen de la mutación está en una de las células germinales de uno de los progenitores y que éstas han sufrido la mutación durante el periodo de meiosis, el cigoto derivado formado contiene la mutación en todas sus fases y en todas sus células. Si la mutación ocurre de modo espontáneo durante las mitosis del cigoto habrá una proporción de células somáticas y germinales del paciente afectado que portarán la mutación (Erickson 2010) y otras que no, dependiendo del momento de la división celular en el que ocurra la mutación, en estos casos se habla de mosaicismo somático y/o germinal y en el mismo individuo se pueden encontrar células germinales y somáticas portadoras o no de la mutación. El riesgo de recurrencia de mutación en el caso de mosaicismo germinal en mujeres no portadoras se estima entre el 4,3 y el 10% (Helderman- van den Enden 2009, van Essen 1992).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el asesoramiento familiar de una madre no portadora es, al menos, tan importante como el de una madre portadora ya que no se puede descartar la presencia de mosaicismos germinales que podrían originar la recurrencia del cuadro en una siguiente gestación.

Una mujer portadora de una mutación puede recurrir a técnicas de selección de embriones libres de mutación mediante Diagnóstico Genético Preimplantacional. En el caso de que una pareja obtenga una gestación espontáneamente, tengan un hijo afectado y no se haya diagnosticado a la madre como portadora y puesto que existe un riesgo de

recurrencia de un 4,3% se aconseja el análisis de la mutación en muestra prenatal. El descubrimiento de la mutación en el feto puede ser motivo de interrupción voluntaria de embarazo de acuerdo con el marco legal vigente (Título II de la Ley Orgánica 2/2010 de salud sexual y reproductiva y de la interrupción voluntaria del embarazo).

En la bibliografía científica, sólo hay datos para los porcentajes de mosaicismo germinal en 7 de las 63 patologías en las que se ha documentado este hecho, dos de ellas son autosómicas dominantes, la acondroplasia (riesgo de recurrencia de 0,02%, Mettler and Fraser, 2000) y la osteogénesis imperfecta (riesgo de recurrencia de 5-7%, Cohn et al., 1990), las otras cinco patologías son enfermedades ligadas al cromosoma X: Síndrome de Lisencefalia ligada a X (Gleeson et al., 2000), Síndrome de Rett (Mari et al., 2005) y Hemofilia B (Ketterling et al., 1999) el riesgo se ha estimado en un 11%, y en un 13% para Hemofilia A (Leuer et al., 2001). En estudios realizados considerando haplotipos de riesgo se ha constatado que el riesgo de transmisión de Distrofia Muscular de Duchenne cuando se hereda el haplotipo de riesgo varía según las publicaciones entre el 14% (Bakker et al., 1987) y el 20% (van Essen et al., 1992). De acuerdo con estos datos se aprecia que el riesgo de recurrencia de mutaciones con madres no portadoras para enfermedades ligadas al cromosoma X es muy superior al de patologías con otro tipo de herencia. El cálculo del porcentaje de recurrencia en el estudio de Helderman-van der Enden et al., 2012 se ha realizado estudiando la transmisión de los haplotipos de riesgo a los descendientes y dividiendo el número total de veces que se ha transmitido el haplotipo de riesgo con la mutación entre el número de veces que se ha transmitido el haplotipo de riesgo (con o sin la mutación) en las familias con mutaciones de novo y han obtenido un riesgo 8,6%; para familias en las que no se ha estudiado el haplotipo el riesgo genérico de recurrencia sigue estimado en 4,3%.

Puesto que no existe en la actualidad tratamiento efectivo de esta enfermedad, debe ponerse más énfasis en su prevención para lo que es imprescindible poder llevar a cabo no solo la detección de mutaciones del caso índice sino también la identificación de mujeres portadoras para poder realizar un consejo genético adecuado, ya que resulta crucial determinar en familias con un varón afectado si la enfermedad deriva de mutaciones *de novo* o bien si el defecto genético es heredado de una madre portadora de dicha mutación con el objeto de aconsejar a la madre en el caso de mutaciones *de novo* la conveniencia de realizar un diagnóstico prenatal en un futuro embarazo debido al

riesgo real de tener otro hijo afectado. Para estos estudios, se ha demostrado que la técnica MLPA permite caracterizar adecuadamente la alteración molecular, dejando en torno a un 28% de los pacientes sin diagnóstico molecular cierto. El gran desarrollo de las tecnologías moleculares ha permitido que se prefiera el uso de éstas previo a la realización de pruebas cruentas como la biopsia muscular, que puede ser potencialmente letal en estos pacientes.

El diagnóstico de una mutación en un paciente afectado también permite la inclusión del mismo en los últimos ensayos clínicos que optimizan el uso de nuevas terapias, para ello se ha de inscribir al afectado en un “registro de pacientes”. Este registro, en España, aún se encuentra en fase de elaboración por parte de un equipo multidisciplinar formado por neuropediatras y genetistas. Son muchos los avances que se están produciendo en el terreno de la fármaco-genética y la medicina personalizada. Desde el punto de vista del tratamiento, el término medicina personalizada hace referencia a la práctica de la medicina en la que el paciente recibe el tratamiento médico más apropiado, con dosis y combinación de drogas ajustadas a los hallazgos genéticos. Actualmente se encuentran en marcha 21 ensayos clínicos de tratamientos para la distrofia muscular en distintas fases, en algunos de ellos se ensayan con fármacos ya conocidos a distintas dosis y en otros se ensayan terapias genéticas de última generación.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La aplicación de la tecnología MLPA en el diagnóstico de la Distrofia Muscular de Duchenne Becker permite la detección de deleciones y duplicaciones en todos los exones del gen de la distrofina, tanto en varones afectados como en mujeres portadoras. La eficiencia de esta tecnología con la que se han detectado un 45,23% de los varones estudiados es superior a la detección de deleciones y duplicaciones con técnicas que solo exploran los exones de las zonas calientes del gen, con las que solo se consigue detectar un 43,39% de los varones estudiados.
2. Se determina por primera vez la incidencia de la Distrofia Muscular de Duchenne Becker en Andalucía que corresponde a 1 de cada 3506 varones nacidos vivos, de los que el 89,47% estaban afectados de deleciones y el 10,52% de duplicaciones. El conocimiento de la incidencia de la Distrofia Muscular de Duchenne Becker es un dato de importancia en relación a la estimación de los costes socio-sanitarios de esta enfermedad.
3. Se determina por primera vez en Andalucía que aproximadamente el 17% de varones afectados por mutaciones en el gen de la distrofina lo son debido a mutaciones esporádicas, siendo este un dato de extrema utilidad para establecer un adecuado asesoramiento genético.



BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A

Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. 2006; 34: 135-144.

Additional protocol Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Genetic Testing for Health Purposes. Council of Europe, chapter IV, article 8.

Almomani R, van der Stoep N, Bakker E, den Dunnen JT, Breuing MH, Ginjaar IB. Rapid and cost effective detection of small mutations in the DMD gene by high resolution melting curve analysis. *Neuromuscul Disord*. 2009: 383-90.

Arauzo M., Suárez A, Baena R, Antúnez A, Gómez Capilla JA. Diagnóstico molecular de la distrofia muscular de Duchénne-Becker y determinación de portadoras mediante un método de análisis fluorescente y electroforesis capilar. *Investig Clin*, 1999; 2 (3).

B

Bakker E, Hofker MH, Goor N, Mandel JL, Wrogemann K, Davies KE, Kunkel LM, Willar HF, Fenton WA, Sandkuyl L. Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet*. 1985; 1: 655-658.

Bakker E, van Broeckhoven CH, Bonten J, van de Vooren M, Veenema H, van Hul W, van Ommen G, Vandenberghe A, Pearson P. Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature*. 1987; 329: 554-556.

Barbujani G, Russo A, Danieli GA, Spiegler AW, Borkowska J, Petruszewicz IH. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet*. 1990; 84(6):522-6.

Barton ER, Morris L, Musaro , Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol*. 2002; 157: 137-48.

7. BIBLIOGRAFÍA

Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detections of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 1990. 86: 45-48.

Blake DJ, Weir A, Newey S E, Davies K E. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002; 82:291-329.

Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* 1996; 6: 37-47.

Bloch RJ, Morrow JS. An unusual beta-spectrin associated clusters acetylcolines receptors. *J Cell Biol.* 1989; 108: 481-493.

Boyd Y, Buckle V, Holt S, Munro E, Hunter D, Craig I. Muscular dystrophy in girls with X utosome translocation. *J Med Genet.* 1986; 23: 484-490.

Broderick JF, Winder SJ. Spectrin, α -Actinin and Dystrophyn. *Advances in Protein Chemistry.* 2005; 70: 203-233.

Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley RT, CIDD Group. Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology.* 1989; 39: 475-81.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Payndra S, Poysky J, Saphiro F, Tomezsko J, Constantin C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 77-93

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part : diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 77-93.

Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet.* 1991 Apr 27;337(8748):1022-4.

C

Camacho A, et al. Informe de la Fundación Del Cerebro sobre el impacto social de la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades neuromusculares. *Neurología.* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.02.003>

Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature.* 1989; 338: 259-62.

7. BIBLIOGRAFÍA

Carafoli E, Molinari M. Calpain: a protease in search of a function?. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247: 193-203.

Caskey CT, Nussbaum R, Cohan L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin Genet.* 1980; 18: 329-341.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nga Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988; 23: 11141-11156.

Chamberlain JS. X-linked dystrophies: from gene localization to gene therapy. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 1992; 5: 610-614.

Cohn DH, Starman BJ, Blumberg B, PH. Recurrence of lethal osteogenesis imperfecta due to parental mosaicism for a dominant mutation in a human type I collagen gene (COL1A1). *Am J Hum Genet.* 1990 Mar; 46(3): 591-601.

Crosbie RH. NO vascular control in Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med.* 2001; 7: 27-9.

Cullen MJ, Fulthorpe JJ. Stages in fibre breakdown in Duchenne muscular dystrophy: An electron-microscopic study. *J Neurol Sci.* 1975; 24: 179-200.

D

Danowski BA, Imanaka-Yoshid K, Sanger JM, Sanger JW. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 1992; 118: 1411-20.

Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizbera A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 2009;18(20):3779-94.

Darras BT, Miller DT, Urion DK. Dystrophinopathies. Editors In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. 2000 Sep 05 [updated 2014 Nov 26].

Davies KE, Pearson P L, Harper P S, Murray J M, O'Brien T, Sar-Farazi M, Williamson R. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne

muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11: 2303-2312.

De Bari C, Dell'occhio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repairs by adult human mesenchymal stem cells from sinovial membrane. *J Cell Biol.* 2003; 160: 909-18.

Deconinck N, Ragot T, Maréchal G, Perricaudet M, Gillis JM. Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of the minidystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 3570-4.

Deconinck N, Tinsley JM, Kahn D. Expression of full length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med.* 1998; 14: 1441-45.

Den Dunnen J T, Grootsholten P M, Bakker E, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet.* 1989; 45: 835-47.

Duboc D, Meune C, Lerebours G, Devaux JY, Vaksman G, Becane HM. Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45: 855-7.

E

Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR; Bullock R, Bushby K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12: 926-929.

Eckardt L, Harzer W. Facial structure and functional findings in patients with progressive muscular dystrophy (Duchenne). *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996;110(2):185-90.

Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases, a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991; 1:19-29.

Erickson RP. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat Res.* 2010 Oct;705(2):96-106. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.04.002. Epub 2010 Apr 24.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kalh SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature.* 1990; 345: 315-319.

F

Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. Alternative splicing of human dystropin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*. 1989; 338: 509-511.

Fidianska A, Glink Z, Walsk M. An ultrastructural study of the vascular and muscular basement membrane in Duchenne-type dystrophy. *Clin Neuroptol*. 1987; 6: 257-61.

Flanigan KM, von Nieerhausern A, Dunn DM, Alder J, Menell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 931-9.

Fujii K, Minami N, hayashi Y, Nishino I, Nonaka I, tanabe Y, Takanashi J, Kohno Y. Homozygous female Becker muscular dystrophy. *Am J Med Genet*. 2009. A 149A: 1052-1055.

G

Gallano P., del Río E., Rodríguez M.J., Tizzano E., Baiget M. Análisis directo del gen de la distrofina mediante PCR multiplexo XVII Congreso Nacional de Genética Humana, Prensa. Univ. Edit., PM 330/91, pp 283-284.

Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet*. 2005; 117: 92-8.

Ginjaar IB, Kneppers AL, Meulen JD, Anderson LV, Bremmer-Bout M, Van Deutekom JV, Weegenar J, den Dunnen JT, Bakker E. Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8: 793-796.

Gleeson, Joseph G. et al. Somatic and Germline Mosaic Mutations in the doublecortin Gene Are Associated with Variable Phenotypes. *The American Journal of Human Genetics*. 2000; 67 , 3: 574 – 581.

Goemans NM, Tulinius M, van der Akker JT, Burn BE, Ekhardt PF, Heuvelmans N, Holling T, Janson AA, Platenburg GJ, Sipkens JA, Sitsen JM, Aartsma-Rus A, van omen GJ, Buyse G, daron N, Verschuuren JJ; Campion GV, de Kimpre SJ,

Van Deutekom JC. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2011; 654: 1513-1522.

Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat.* 1999; 194: 323-34.

Goudemant JF, Deconick N, Tinsley JM, et al. Expression of truncated utrophin improves pH recovery in exercising muscles of dystrophic mdx mice: A 31P NMR study. *Neuromuscular Disord.* 1998; 8: 371-9.

Gregorevic P, Plant DR, Leeding KS, Bach LA, Lynch GS. Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am J Pathol.* 2002; 161: 2263-72.

H

Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet.* 1935; 31: 317-326.

Helderman-van den Enden ATJM, Ginjaar HB, Kneppers ALJ, Bakker E, Breuning MH, de Visser A. Somatic mosaicism of a point mutation in the dystrophin gene in a patient presenting with an asymmetrical muscle weakness and contractures. *Neuromuscular Disorders.* 2003; 13: 317-321.

Helderman-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, et al. Recurrence risk due to germ lines mosaicism: Duchenne and becker muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2009; 75: 465-472.

Helderman-van den Enden AT, Madan K, Breuning MH, van der Hout AH, Bakker E, de Die-Smulders CE, Ginjaar HB. An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2013 Jan;21(1):21-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.101. Epub 2012 Jun 6.

Houde S, Filiatrault M, Fournier A, et al. Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow up. *Pediatr Neurol.* 2008; 38: 200-06.

Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am J Hum Genet.* 1990;46(4):682-95.

I

Izquierdo-Martínez M, Avellaneda-Fernández A. Enfoque interdisciplinario de las enfermedades rara: un nuevo reto para un nuevo siglo. *Med Clin.* 2003; 121: 299-303.

J

Jansen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 2005; 6: 29-35.

Jarrett HW, Foster JL. Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. *J Biol Chem.* 1995; 270: 5578-5586.

Jefferies JL, Eidem BW, Belmont JW, Craigen WJ, Ware SM, Fernbach SD, Neish SR, Smith EO, Towbin JA. Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Circulation.* 2005; 112: 2799-804

K

Katayama Y, trn VK, Hoan NT, Zhang Z, Goji K, Yagi M, Takeshima Y, saiki K, Nhan NT, Matsuo M. Co-occurrence of mutations in both dystrophin- and androgen-receptor genes is a novel cause of female Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet.* 2006; 119: 516-519.

Ketterling RP et al. Germline origins in the human F9 gene: frequent G:C→A:T mosaicism and increased mutations with advanced maternal age. *Human Genetics.* December 1999, Volume 105, Issue 6, pp 629-640.

Koehler J. Blood vessel structure in Duchenne muscular dystrophy: Light and electron microscopic observations in resting muscle. *Neurology.* 1977; 27: 861-8.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco P, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic

7. BIBLIOGRAFÍA

organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987; 50: 509-517.

Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*. 1990; 265(8):4560-6.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-chaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988; 53: 219-228.

L

Lane R, Robinow M, Roses A. The genetic status of mothers of isolated cases of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 1983; 20:1-11.

Leuer, Marco et al. Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event. *The American Journal of Human Genetics*. 2001; 69-1:75 – 87.

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

López J, Linertová R, Serrano P, Hens M, Posada de la Paz M, Oliva J. los costes socio económicos y la calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con Enfermedades Raras en España. Proyecto IMSERSO. 2012.

M

Magri F, Govoni A, D'Angelo MG, Del Bo R, Ghezzi S, Sandra G, Turconi AC, Sciacco M, Ciscato P, Bordoni A, Tedeschi S, Fortunato F, Lucchini V, Bonato S, Lamperti C, Coviello D, Torrente Y, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol*. 2011 Sep;258(9):1610-23. doi: 10.1007/s00415-011-5979-z. Epub 2011 Mar 12.

Mah JK, Korngut L, Dykeman J, pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromusc Disord*. 2014; 24: 482-491.

Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NS, Bodug SE, Burghes AH, Harper PS, Thompson MW, Ray PN. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and becker muscular dystrophy. *Science*. 1988; 242: 755-759.

Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid costicosteroid for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst rev*. 2008; 1: CD03725

Mari F, Caselli R, Russo S, Cogliati F, Ariani F, Longo I, Bruttini M, Meloni I, Pescucci C, Schurfeld K, Toti P, Tassini M, Larizza L, Hayek G, Zappella M, Renieri A. Germline mosaicism in Rett syndrome identified by prenatal diagnosis. *Clin Genet*. 2005 Mar; 67(3):258-60.

Melacini P, Fanin M, Danieli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, Freda MP, Miorelli M, Mostacciolo ML, Fasoli G, Angelini C, Dalla Volta S. Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy. *Circulation*. 1996; 94:3168-75.

Merlini L, Cicognani A, Malaspina E, et al. Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2003; 27: 222-7.

Mettler G, Fraser FC. Recurrence risk for sibs of children with "sporadic" achondroplasia. *Am J Med Genet*. 2000 Jan 31;90(3):250-1.

Miike T, Sugino S, Ohtani Y, Taku K, Yoshioka K. Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at preclinical stage. *J Neurol Sci*. 1987; 82: 67-80.

Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*. 1975; 25: 1111-20.

Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988; 2: 90-95.

Monaco AP, Neve RL; Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*. 1986; 323: 646-650.

Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S, Brown SC. Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet*. 2002; 360: 1419-21.

Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology*. 2003; 2: 731-740.

N

Nakamura A, Harrod GV, Davies KE. Activations of calcineurin and stress activates protein Kinase/p38-mitogen activated protein kinase in hearts of utrophin-dystrophin knockout mice. *Neuromuscul Disord.* 2001; 11: 251-9.

Nigro G, Comi L, Limongelli FM, Giugliano M, Politano L, Petretta V, Passamano L, Stefaneli S. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve.* 1983; 6: 253-262.

O

Ozawa E. Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86(8):798-821.

P

Posada de la Paz M, Izquierdo-Martínez M, Ferrari MJ, Avellaneda A, Andrés P, Martín C. Plan de acción de la UE y del estado español sobre enfermedades de baja prevalencia. *Boletín del Real Patronato sobre Discapacidad.* 2002; 53: 25-29.

Prior TW, Bartolo C, pearl DK; Papp AC, Snyder PJ, Sedr MS, Burghes AH, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *M J Hum Genet.* 1995; 57: 22-33.

Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Ducehne muscular dystrophy. *J Mol Diagn.* 2005; 7: 317-26.

Q

Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X-chromosome in a female with Duhenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 160-165.

R

Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel R D, Worton RG. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1985; 318: 672-675.

Raymackers JM, Debaix H, Colson- Van Schoor M, et al. Consequences of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: Histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. *Neuromuscul Disord.* 2003; 13: 376-87.

Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Sci.* 1992; 89: 2331-35.

Q

Sander M, Chavoshn B, Harris SA, et al. Functional muscle ischemi in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97: 13818-23.

Sano M, Saito F, Yamamoto K, Tonomura A, Tsukagoshi H. Duchenne muscular dystrophy in a female with 45, x/46, XX-chromosome constitution. *Jinrui Idengaku Zasshi.* 1987; 32: 257-262.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: e57.

Soltanzadeh P, Friez MJ, Dunn D, von Niederhausern A, Gurvich OL, Swoboda KJ, Sampson JB, Pestronk A, Connolly AM, Florence JM, Finkel RS, Bönnemann CG, Medne L, Mendell JR, Mathews KD, Wong BL, Sussman MD, Zonana J, Kovak K, Gospe SM, Gappmaier E, Taylor LE, Howard MT, Weiss RB, Flanigan KM. Clinical and genetic characterization of manifesting carriers of DMD mutations. *Neuromuscul Disord.* 2010; 20:499–504.

Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem.* 1995; 270: 10909-14.

7. BIBLIOGRAFÍA

Spencer MJ, Mellgren RL. Overexpression of a clpstatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet.* 2002; 11:2645-55.

Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol.* 2001; 98: 235-43.

T

Timmons JA, Larsson O, Jansson E, et al. Human muscle gene expression responses to endurance training provide a novel perspective on Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* 2005; 19: 750-60.

Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, Davies K. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med.* 1998; 4: 1441-1444.

V

Van Essen AJ, Busch HF, te Meerman GJ, ten Kate LP. Birth and population prevalence of Duchenne muscular dystrophy in The Netherlands. *Hum Genet.* 1992 ;88(3):258-66.

Van Essen A, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boileau C, van Broeckhoven C, Bushby K, Clarke A, Claustres M, Covone A. Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Human Genetics.* January 1992, Volume 88, Issue 3, pp 249-257.

Van Westrum SM, Hoogerwaard EM, Dekker L, Standaar TS, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, major-Krakauer DF, van Essen AJ, Leschot NJ, Wilde , de Haan RJ, de VM, van der Kooi AJ. Cardiac abnormalities in follow-up study on carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology.* 2011; 77: 62-66.

7. BIBLIOGRAFÍA

W

Wheling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol.* 2001; 155: 123-31.

Williams WR, Thompson MW, Morton NE. Complex segregation analysis and computer-assisted genetic risk assessment for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet.* 1983;14(2):315-33.

Y

Yilmaz O, Karaduman A, Toploglu H. Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur J Neurol.* 2004; 11: 541-4.

SUSANA GARCÍA LINARES

UNIVERSIDAD DE GRANADA, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E
INMUNOLOGÍA



ugr

Universidad
de Granada