



***IDENTIFICACIÓN DE LA DELECIÓN DEL EXÓN 45 Y EXÓN 51 DEL GEN DMD EN
UNA FAMILIA COLOMBIANA PROVENIENTE DE CÓRDOBA NARIÑO.***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C.
2019



**IDENTIFICACIÓN DE LA DELECIÓN DEL EXÓN 45 Y EXÓN 51 DEL GEN DMD EN
UNA FAMILIA COLOMBIANA PROVENIENTE DE CÓRDOBA NARIÑO.**

NATALIA VANESSA MARTÍNEZ ROSERO

Proyecto presentado como requisito para optar al título de:
Bacterióloga y laboratorista clínico

DIRECTOR

Dr. HUMBERTO ARBOLEDA GRANADOS.
Md. MSc. Genética humana. Director Instituto de Genética
Universidad Nacional De Colombia

CODIRECTORA

Dra. RUTH MELIDA SANCHEZ MORA. MSc-PhD
Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca

ASESORA

ANA GABRIELA CONCHA MERA
Biol. PhD(e) Ciencias Biomédicas
Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C.
2019

DEDICATORIA

A Dios, por la vida, a mi familia por el apoyo incondicional y principalmente dedico este proyecto a la memoria de mis dos hermanos Cristian y Steven, quienes, a pesar haber pasado y sufrido una enfermedad tan difícil de llevar, lucharon hasta su último suspiro, siendo hoy y siempre motivo de inspiración, para investigar y aportar información para no seguir transmitiendo Distrofia Muscular De Duchenne a nuevas generaciones en nuestra familia. Esto es por ustedes, por transmitirme seguridad y fuerza, para culminar este proceso de formación personal.

Natalia Vanessa Martínez Rosero

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Humberto Arboleda Granados, por su dedicación, tiempo y apoyo durante todo el proceso y desarrollo de este proyecto.

A la doctora Ruth Mélida Sánchez, por su confianza, comprensión y apoyo desde el inicio, hasta la culminación de este proyecto.

A la doctora Ana Gabriela Concha Mera, por todas las enseñanzas académicas, por la paciencia y el apoyo moral, para el desarrollo de este proyecto.

A los docentes de la Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca, por sus enseñanzas académicas y éticas para formarme como profesional y como persona.

A mi madre, por ser paciente, ser una guerrera y apoyarme en todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos por ser fuente de inspiración y admiración para no rendirme en el desarrollo y culminación de este proyecto.

A todo el personal del Instituto De Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

Natalia Vanessa Martínez Rosero

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	12
INTRODUCCION	13
1. ANTECEDENTES	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1 DISTROFIAS MUSCULARES	21
3.2 CLASIFICACIÓN DISTROFIAS MUSCULARES	21
3.3 DISTROFINOPATIAS	23
3.3.1 Generalidades de Distrofia Muscular De Duchenne	23
3.3.2 Generalidades de Distrofia Muscular De Becker	26
3.4 EPIDEMIOLOGÍA	27
3.5 PATRÓN DE HERENCIA	28
3.6 PORTADORAS	29
3.7 GEN DMD	29
3.7.1 Mutaciones en el gen DMD	30
3.7.2 Regla de marco de lectura	31
3.8 DISTROFINA	32
3.9 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA ENFERMEDAD	34
3.9.1 Técnica PCR convencional (<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>)	36
3.9.2 Técnica RFLPs (<i>Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción</i>)	37
3.10 TRATAMIENTO TERAPÉUTICO	38
4. DISEÑO METODOLOGICO	39
4.1 Tipo de estudio	39
4.2 Población	39
4.3 Muestra de estudio	39
4.4 Criterios de inclusión	40
4.5 Criterios de exclusión	40

4.6	Indicadores	40
4.7	Hipótesis	40
5.	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	41
5.1	FASE I: identificación de la delección del exón 45 y 51 del gen DMD en participantes de la familia por técnica PCR (<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>)	41
5.1.1	Muestra analítica	41
5.1.2	Recolección de muestra biológica	41
5.1.3	Caracterización clínica de los participantes	42
5.1.4	Extracción del material genético	42
5.1.5	Diseño de primer´s de exones 45 y 51 del gen DMD	42
5.1.6	Estandarización de Técnica PCR convencional (<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>)	43
5.1.7	Electroforesis	44
5.1.8	Purificación	44
5.1.9	Secuenciación	44
5.2	FASE II: Identificación de las portadoras de la delección en exón 45 gen DMD por RFLPs (<i>Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción</i>)	45
5.2.1	Extracción material genético.....	45
5.2.2	Diseño de Primer´s para ERT87.8 <i>TaqI</i> y ERT 87.15 <i>XmnI</i>	45
5.2.3	Estandarización de Técnica PCR convencional (<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>)	45
5.2.4	Digestión de ADN con RFLPs (<i>Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción</i>)	46
5.2.5	Electroforesis	46
5.3	CONSEJERIA GENETICA	47
6.	RESULTADOS	48
6.1	ÁRBOL GENEALÓGICO	48
6.2	CARACTERIZACIÓN CLINICA DE LOS PARTICIPANTES EN ESTUDIO	49
6.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	52

6.3.1	FASE I: Identificación de delección del exón 45 y 51 del gen DMD, en participantes de la familia por técnica PCR.	52
6.3.1.1	Extracción de material genético	52
6.3.1.2	Diseño de primer`s	52
6.3.1.3	Amplificación del exón 45 y 51 de los participantes	54
6.3.2	FASE II: Identificación de portadoras de la delección del exón 45 en el gen DMD por técnica RFLPs	56
6.3.2.1	Primer`s enzimas de restricción TaqI y XmnI	56
6.3.2.2	Amplificación por Técnica PCR convencional (<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>)	56
6.3.2.3	Digestión de ADN con RFLPs (<i>Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción</i>)	57
6.3.2.4	Resultados Electroforesis	58
6.3.2.5	Índice de heterocigocidad y homocigocidad en participantes.	
6.3.2.6	Consejería genética.....	63
7.	DISCUSIÓN	64
8.	CONCLUSIONES	68
9.	RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS		

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Características clínica, paciente afectado con DMD	23
Figura 2: Comparación evolución clínica de DMD y DMB en el tiempo	25
Figura 3: Registro de distrofinopatías en Colombia.....	27
Figura 4: Patrón de herencia DMD/B	28
Figura 5: Ubicación del gen DMD en el cromosoma X	29
Figura 6: Diagrama esquemático del gen (exones)	30
Figura 7: Transcripciones de distrofina en individuos sanos, DMD y DMB	31
Figura 8: Proteína Distrofina (dominios y regiones)	32
Figura 9: Ubicación de la proteína en la célula	33
Figura 10: Algoritmo diagnóstico DMD/DMB Fuente: Elaboración propia	34
Figura 11: Biopsia musculo gastrocnémios.	35
Figura 12: Técnica PCR (<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>)	36
Figura 13: Actividad enzimas de restricción	37
Figura 14: Árbol genealógico de la familia objeto de estudio	48
Figura 15: Característica de musculo gastrocnémios en paciente DMD	49
Figura 16: Clasificación de los participantes de la familia colombiana	52
Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa exón 45 y 51	51
Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa pERT 87.8 (<i>TaqI</i>) y pERT 87.15 (<i>XmnI</i>)...55	55
Figura 19: Electroforesis y árbol genealógico para clasificación fenotípica de pacientes.	58
Figura 20: Clasificación genotípica por RFLPs	62
Figura 21: Algoritmo asesoramiento genético	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación Distrofias musculares	21
Tabla 2: Comparación clínica, distrofinopatías DMD/B	26
Tabla 3: Tratamiento, Ayudas multidisciplinarias para DMD/B	38
Tabla 4: Primer´s diseñados para los exones 45 y 51	43
Tabla 5: Condiciones PCR para la amplificación (estandarización)	43
Tabla 6: Primer`s enzimas de restricción <i>TaqI</i> y <i>XmnI</i>	45
Tabla 7: Condiciones y los reactivos utilizados para la amplificación	45
Tabla 8: Condiciones óptimas para digestión de enzimas de restricción <i>TaqI</i> y <i>XmnI</i> ..	46
Tabla 9: Sesiones para consejería genética	47
Tabla 10 Caracterización participantes	51
Tabla 10: Cuantificación de la extracción de DNA.	53
Tabla 11: Clasificación pacientes seleccionado para el estudio	62

ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado

Anexo 2: electrocardiogramas, radiografía con Edema pulmonar y electrocardiograma de pacientes fallecidos DMD

Anexo 3: Protocolo extracción de DNA

Anexo 4: Secuencia exones 45 y 51 gen DMD

Anexo 5: Protocolo purificación de amplificadores

Anexo 6: Geles estandarización de muestras DMD 45-11 y DMD 45 -16



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

IDENTIFICACIÓN DE LA DELECCIÓN DEL EXÓN 45 Y EXÓN 51 DEL GEN DMD EN UNA FAMILIA COLOMBIANA PROVENIENTE DE CÓRDOBA NARIÑO.

RESUMEN

La Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y su variante la de Becker (DMB), son enfermedades neurodegenerativas, catalogadas como huérfanas, se presentan en 1 de cada 3.500 a 6.000 varones recién nacidos vivos, con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X, siendo las mujeres portadoras del gen mutado (1). La caracterización de las mutaciones en el gen DMD, varían de acuerdo al efecto que se produce en el marco abierto de lectura del gen, presentándose deleciones (65%), duplicaciones (5%) y mutaciones puntuales (30%), como principal causa de la enfermedad. Estas mutaciones llevan al desarrollo fenotípico de la DMD más severa y la DMB más leve, generando debilidad muscular progresiva, por ausencia parcial o total de una de las proteínas estructurales del músculo, como la distrofina. La enfermedad no tiene cura, pero sí cuentan con posibles tratamientos, que han dado resultados favorables en algunos pacientes (2).

En este trabajo se realizaron técnicas moleculares como; PCR convencional (*polymerase chain reaction*) y así mismo RFLPs (*Restriction fragment length polymorphisms*) en muestras de ADN de una familia colombiana, para la identificación de la mutación en los exones 45 y 51 del gen DMD. La información clínica se obtuvo con historia clínica y construcción de árbol genealógico. Con el análisis de resultados, se confirmó la presencia de la deleción en el exón 45 del gen DMD, en uno de los integrantes de la familia, así mismo se identificó a las mujeres portadoras de la mutación del gen.

Palabras clave: DMD, DMB, gen DMD, PCR, RFLPs, exones, mutaciones, deleciones, duplicaciones, distrofina.

INTRODUCCIÓN

Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y su variante Distrofia Muscular de Becker (DMB), hacen parte del grupo de enfermedades musculares, las cuales se las clasifica como las distrofinopatías más severas, con un patrón de herencia recesivo ligadas al cromosoma X, presentándose en 1 de cada 3500 a 6000 recién nacidos vivos varones en el mundo (1). Estas enfermedades son diagnosticadas en la infancia, generalmente se presentan antes de los 5 años con un pronóstico grave y esperanza de vida significativamente reducida, producidas por mutaciones presentes en el gen DMD, que codifica para una de las proteínas estructurales del músculo, como la distrofina. Estas mutaciones varían de acuerdo al efecto que se produce en el marco abierto de lectura, presentándose deleciones (65%), duplicaciones (5%) y mutaciones puntuales (30%) entre otras, que son la principal causa de la enfermedad (2).

Los pacientes presentan manifestaciones clínicas que incluyen; caídas frecuentes, dificultad para levantarse desde una posición acostada o sentada (*Maniobra de Gowers*), problemas para correr y saltar (*Marcha de pato*), caminar sobre los dedos de los pies, pseudohipertrofia de gemelos, dolor, rigidez muscular y dificultad de aprendizaje (3,4), debido a la degeneración que se produce en la fibra muscular, por la ausencia parcial o total de la distrofina, ocasionado daño en la membrana celular de las fibras, produciendo elevación de la creatina fosfoquinasa sérica (CPK) y aumento del influjo de calcio al interior de la fibra muscular, activando proteasas calcio dependientes, que van a degradar las proteínas del complejo glicoproteico, generando un ciclo de degeneración y regeneración, necrosis, fibrosis y con el tiempo reemplazo de la fibra muscular por tejido adiposo (5). Este ciclo conduce a un pronóstico en el cual los pacientes deben permanecer en silla de ruedas, entre los 12 y 15 años de edad, dependiendo de la variable. La muerte se produce como resultado de complicaciones respiratorias o cardíacas en los adolescentes de 20 años o más. Otras causas de muerte son neumonía, aspiración u obstrucción de las vías respiratorias (6).

En Colombia, la resolución número 5265/18, emitida por el ministerio de salud y protección social, el 27 de noviembre de 2018, con el código CIE G710, cataloga a la Distrofia muscular de Dúchenne (DMD) y Distrofia Muscular de Becker (DMB) como huérfanas, siendo estas crónicamente debilitante, graves y con una prevalencia mínima, lo que ha llevado a que el enfoque investigativo y la historia natural de la enfermedad, sea mínima (7). Hasta el momento ha sido difícil el desarrollo de un tratamiento eficaz, por ende, no tienen cura, sin embargo, cuentan con posibles tratamientos, que incluyen; fármacos, terapia física, terapia génica, entre otros, que han dado resultados favorables en algunos pacientes (2).

Cabe resaltar que en otros países el análisis y desarrollo terapéutico ha tenido grandes logros, pero en Colombia debido a que no se cuenta con un registro completo de pacientes con distrofinopatías, a los altos costos de análisis genético, el poco avance investigativo y el acceso a la información por parte de las mujeres portadoras del gen mutado, han llevado a que la enfermedad en los pocos pacientes que la presentaban y/o la presentan, avance muy rápido y disminuya la expectativa y calidad de vida de los mismos.

Hasta el momento para llegar a un diagnóstico claro de la enfermedad, se debe tener en cuenta principalmente; el fenotipo, la historia clínica y la genealogía. Adicional a esto, es muy importante realizar técnicas moleculares, que ayuden a confirmar la causa de la enfermedad, entre estas la PCR (*reacción en cadena de la polimerasa*), electroforesis y secuenciación, para confirmar el tipo de mutación presente en el gen DMD, que está dando origen al fenotipo DMD y DMB. Cabe resaltar que las pruebas antes mencionadas no sirven como diagnóstico para identificación de mujeres portadoras de la mutación, por ende, se deben realizar ensayos con microsatélites (STR), FISH (hibridación fluorescente in situ) y en algunos casos RFLPs (*polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*), como primeras óptimas opciones.

Teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto de investigación, buscó identificar la delección del exón 45 (previamente identificada en uno de sus integrantes) y 51, en una familia colombiana, proveniente de Córdoba Nariño, conformada por 42 individuos. Para esto se realizó genealogía, estudio de historias clínicas, genotipificación mediante PCR convencional, y electroforesis, como soporte, para la identificación de la mutación en los exones 45 y 51 del gen DMD en 20 individuos, incluyendo hombres y mujeres, teniendo en cuenta que hasta el momento se han reportado 4 casos de DMD en 2 generaciones, (3 de ellos ya fallecidos) de los cuales se logró identificar solamente la presencia de la delección en el exón 45, en uno de los participantes de la generación IV, quien actualmente presenta el fenotipo compatible con DMD, confirmando por la técnica de secuenciación, la mutación que conlleva a la ausencia total de este exón. Una vez obtenido el amplificado de la PCR, se comprobó que hubiera buena cantidad del producto para poder hacer la genotipificación de las portadoras a partir de la técnica molecular RFLPs (*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*) técnica que usa enzimas de restricción dirigidas a un sitio blanco para confirmar con mayor facilidad a las portadoras de la familia quienes actualmente no presentan signos ni síntomas, pero tienen la mutación asociada al fenotipo DMD en nuevas generaciones. Como promoción y prevención, esta familia ya cuenta con asesoramiento genético, dando cumplimiento a los objetivos propuesto en el trabajo.

Se pretende dejar este proyecto como fundamento teórico y metodológico para futuras investigaciones sobre el tema con el fin de contribuir a la clasificación e identificación de enfermos y portadoras de Distrofia muscular de Duchenne y su variante Distrofia muscular de Becker en Colombia y en el mundo.

1. ANTECEDENTES

Emery A, Emery M. en su artículo “Edward Meryon (1809-1880) and muscular Dystrophy” relatan que las primeras descripciones compatibles con Distrofia Muscular, fueron realizadas en el siglo XIX por el cirujano y anatomista Charles Bell, quien describe, que en 1830 en la publicación “*El Sistema Nervioso del Cuerpo Humano*” en el cual se describe a un paciente de 18 años, que a sus 10 años de edad ya manifestaba debilidad muscular. Sin embargo, para la época no se contaba con descripción patológica del músculo para establecer un diagnóstico más claro (8).

Eslava A. en su tesis, describe que entre los años 1836 y 1847, en el Hospital de Londres, el Dr. W.J. Little, brinda detalles claros de las características de la enfermedad, como debilidad muscular progresiva que afecta los miembros inferiores, contracturas en las rodillas y cadera, teniendo en cuenta un caso clínico de dos hermanos, quienes pierden su capacidad para caminar entre los 8 y 11 años y fallecen a los 15 años por falla cardiorrespiratoria. Durante la necropsia, el examen de los gastrocnemios y los soleos mostró que el tejido muscular había sido reemplazado por grasa. Estas descripciones son consistentes clínicamente con un diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne, sin embargo, la primera descripción sistemática y detallada de la enfermedad debe atribuirse a Edward Meryon (9).

Emery A, Emery M. relatan que Edward Meryon en 1851 presentó en la reunión de la Sociedad Médica y Quirúrgica el caso de ocho niños afectados en tres familias, en el cual se describió detalladamente la clínica de los pacientes: “*dificultad para caminar desde la temprana edad, posteriormente para subir escaleras, la marcha se pierde y la muerte ocurre en la segunda década. No se observan fasciculaciones ni otros signos de disfunción nerviosa*”. Definiéndola, así como una enfermedad de origen muscular (8).

Fernández J, *et al.* en su artículo dicen que más adelante el médico francés Guillaume Benjamín Amand Duchenne, pionero en describir diversos trastornos musculares y nerviosos y en desarrollar el tratamiento óptimo para distrofias, en el año de 1858,

documenta el caso de un niño de 9 años que estaba perdiendo la capacidad de caminar, buscó casos similares y diez años más tarde, en 1868, publicó un trabajo extenso sobre la enfermedad, que ahora lleva su nombre (Distrofia muscular de Duchenne) (10).

Herrera A, *et al.* aclaran que para los años 1930 a 1960, el médico alemán Peter Emil Becker, fue el primero en describir la variante de distrofia muscular de Duchenne, con patrón de herencia ligado al X, con menos severidad y que permite una mayor supervivencia en los pacientes y que más tarde se llamará distrofia muscular de Becker (DMB) (11). Chaustre D, Chona W. en su artículo “Distrofia muscular de Duchenne. Perspectivas desde la rehabilitación” relatan que para esta misma época Gowers describe el signo clásico que lleva su nombre después de observar varios niños con DMD y DMB quienes se levantaban del piso en 3 tiempos. Además, a partir del año 1950 diferentes grupos de investigadores reportaron el aumento de los niveles de enzimas musculares incluida la creatina quinasa (CK) tanto en pacientes con diagnóstico de la enfermedad como en mujeres portadoras, utilizándolo como parámetro importante en el diagnóstico DMD/B (12).

Hacia 1986, Kunkel *et al.*, aisló el gen DMD que codifica para la proteína relacionada con la DMD y finalmente Hoffman en 1987, identificó la proteína codificada por este gen que se llamaría posteriormente distrofina, molécula en la cual en la actualidad se centran las investigaciones y se espera que los resultados de estos estudios permitan diseñar estrategias para el manejo de la enfermedad (13).

En el año de 1989 Backer *et al*, realizó el primer diagnóstico prenatal de una portadora y su feto afectado, usando la técnica fragmentos de restricción enzimáticos (RFLPs) (32).

Chamberlain JS, *et al* en 2003 planteó que para realizar el diagnóstico de DMD/DMB, con eficiencia, confiabilidad y facilidad, se debe hacer mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para entonces realizó un estudio en pacientes

masculinos con signos clínicos de DMD / BMD. Seleccionados para su análisis al azar, sin saber si una deleción estaba presente dentro del gen de la distrofina. En los resultados de electroforesis encontró la presencia de mutaciones, por lo que concluyó que la técnica PCR multiplex representa un método sensible y preciso para la detección de la eliminación del 46% de todos los casos de DMD / BMD. El método requiere 1 día para el análisis, es fácil de realizar y no utiliza marcadores radiactivos. Como tal, la PCR multiplex representa un método eficiente y rápido para el diagnóstico prenatal o postnatal de DMD / DMB (14).

La Academia Americana de Neurología, en el año 2005 publicó directrices para uso de corticoides (prednisona) que son eficaces en el retraso de la progresión de la DMD. Por otra parte, se realizaron ensayo en ratones deficientes de distrofina, se ha administrado un compuesto que bloquea la miostatina mostrando un aumento de masa de las proteínas del músculo y la fuerza., además los oligonucleótidos antisentido se usaron para bloquear las partes defectuosas de los genes y permitir la síntesis de proteína casi normal, esta técnica se denomina “salto de exón” (15)

Vieitez I, *et al* 2017, en su investigación sobre el “Espectro mutacional de la distrofia muscular de Duchenne en España: estudio de 284 casos de varones con DMD diagnosticados genéticamente”, describen principalmente la historia clínica indicativa de DMD, los antecedentes familiares, el análisis genético del gen DMD y/o estudio de la biopsia de los pacientes. La metodología utilizada para el desarrollo del trabajo se basó en: extracción de ADN, PCR multiplex, MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) y secuenciación. Las técnicas utilizadas, arrojaron como resultados de tipificación genética de deleciones (46,1%) y grandes duplicaciones (19,7%) en el gen de la distrofina (17).

Almeida de Silva C, *et al*. En su artículo publicado en 2018 realizaron el estudio y el diagnóstico de un paciente masculino de 14 años con distrofia muscular de Becker, el cual presentaba un signo característico de la enfermedad como lo es el aumento de enzimas como la creatina quinasa, ligero retraso en la adquisición de hitos del motor,

además dificultad para caminar sobre sus talones, signo miopático (manos apoyadas en los muslos para pararse), paladar arqueado alto, hipertrofia de la pantorrilla , escápulas aladas , hipotonía muscular global. Para confirmar la degeneración a nivel muscular realizaron transferencia mediante western blot en la cual se mostró una reducción de la distrofina (20% de lo normal) para ambos anticuerpos (C y N-terminal), lo que permitió el diagnóstico de distrofia muscular de Becker (18).

En cuanto a las técnicas usadas para la identificación de portadoras de DMD, Fujishita S, *et al.* En su trabajo de investigación realizado en el año 2012, para el diagnóstico, utilizaron las técnicas moleculares PCR y la técnica RFLPs, el ensayo se hizo en 62 pacientes (57 probandos) con distrofia muscular de Duchenne o Becker y 226 miembros de 57 familias. Realizaron el procedimiento de PCR con los cebadores dirigidos a la región blanco, en este caso el lugar de la mutación y la posterior digestión con endonucleasas que detectaron en un 84% de las madres, obteniendo un patrón heterocigoto en al menos uno de los locus afectados. Por lo tanto, concluyeron que el estudio de PCR y los cebadores utilizados en el presente estudio son útiles y convincentes para el diagnóstico rápido de DMD/DMB (19).

En el estudio realizado por Fonseca D, *et al* 2017, realizó la identificación de 14 mujeres portadoras en 2 familias afectadas con distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/DMB) determinando mediante la extracción de ADN genómico, seguido de la amplificación de 10 STRs, intragénicos y extragénicos del gen de la distrofina, se construyeron haplotipos para los afectados y las mujeres por línea materna en los grupos familiares (16).

Por otra parte, Hernández P. *et al* 2017. En su estudio, Identificaron a 7 portadoras y 15 no portadoras de la delección en el gen DMD mediante PCR multiplex cuantitativa y análisis de dosis génica, aquí se estudiaron con los polimorfismos intragénicos dinucleótidos D45 y SK12, para construir haplotipos del cromosoma X; 63% de las mujeres analizadas fueron 'informativas' (heterocigotas) en este estudio. Se brindó asesoramiento genético después del análisis molecular descrito, informando los riesgos de la DMD/ DMB (40).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar la delección del exón 45 y 51 del gen DMD que está comprometida para Distrofia muscular de Duchenne en una familia colombiana, del municipio de Córdoba, Nariño.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el origen y el alcance de Distrofia muscular en las diferentes generaciones I, II, III, IV, V, de la familia del municipio de Córdoba, Nariño.
- Tipificar el exón 45 y 51, del gen DMD, en 20 integrantes de la familia particularmente involucradas en la enfermedad.
- Identificar genéticamente a las portadoras y a los afectados por DMD, de la familia objeto de estudio.
- Establecer medidas como la consejería genética para la orientación de futuras generaciones de la familia del estudio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares, son enfermedades de tipo hereditario, caracterizadas por debilidad muscular progresiva (miopatía) que afecta principalmente a los músculos inferiores y en específico a otros músculos como: respiratorios, corazón, músculo liso, músculo esquelético, produciendo atrofia (pérdida de masa muscular), que con el tiempo y dependiendo del tipo de distrofia, afecta más un grupo muscular que a otro (20).

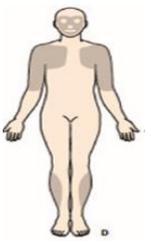
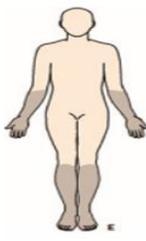
Para identificar las distrofias musculares, se tiene en cuenta características clínicas como; edad de inicio, gravedad de los signos y síntomas y progresión de los mismos, el patrón de herencia y el grupo de músculos afectados que permiten hacer la clasificación de la siguiente manera: enfermedad de Duchenne/Becker, distrofia de Emery-Dreifuss, distrofia miotónica, distrofia facioescapulohumeral, distrofia oculofaríngea, distrofia de cinturas (Tabla 1) (21).

3.2 CLASIFICACIÓN DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares se clasifican de acuerdo a múltiples parámetros como la edad, el sexo, proteína implicada, entre otras. Varios autores las han clasificado como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación distrofias musculares. Se clasifican teniendo en cuenta edad, sexo, músculo afectado, síntomas, locus y proteína afectada. Tomado y modificado de (20, 21, 22, 23).

	Distrofia muscular de Duchenne/Becker	Distrofia de Emery-Dreifuss	Distrofia miotónica
Edad de aparición	Entre los 2 o 3 años de edad	Entre los 10 y 20 años de edad	Depende de la forma clínica la clásica: en la juventud la congénita: al nacer
Sexo	Afecta solo a varones	Afecta solo a varones	Ambos sexos
Músculos afectados	La debilidad comienza en los músculos del tronco, pero luego se extiende a	La debilidad comienza en los brazos y más tarde también las piernas. Aparece rigidez	La miotonia (rigidez) se manifiesta en los músculos de las manos, la cara y la

	los de los brazos y piernas.	de los codos, talones y columna	lengua
Síntomas	Miocardopatía dilatada, síntomas respiratorios, escoliosis	Alteraciones de la conducción cardiaca, lipodistrofia	Alteraciones de la conducción cardiaca, dolor muscular, retraso mental, dificultad para tragar, diarrea y estreñimiento, neuropatía, diabetes
Locus	Xp21.2	Xq28	2q
Proteína afectada	Distrofina	Emerina	Disferlina
			
	Distrofia de cinturas	Distrofia facioescapulohumeral	Distrofias musculares congénita
Edad de aparición	Dependiendo del gen afectado puede aparecer en la niñez tipo 1B o en la edad adulta tipos 1A y 1C	En la juventud y edad adulta	aparición Al nacimiento
Sexo	Ambos sexos	Ambos sexos	Ambos sexo
Músculos afectados	Hombros (deltoides, pectorales), cintura (glúteos) y cuádriceps	Músculos faciales En algunos casos, la debilidad afecta las piernas (gemelos); en otros, a los hombros y la parte superior de los brazos (deltoides y bíceps).	Músculos de extremidades superiores e inferiores
Síntomas	Depende de la forma clínica: bloqueo auriculo-ventricular (tipo 1E), miocardopatía dilatada (tipos 2C y 2F), fracaso cardiaco (tipo 2I)	Sordera y degeneración de la retina	Síntomas respiratorios, alteración de la sustancia blanca del SNC
Locus	5q	4q	6q
Proteína afectada	Miotilina	ND	Laminina alfa-2 (merosina)
			

ND: Ningún dato.

3.3 DISTROFINOPATÍAS

Son enfermedades neurodegenerativas, con alteraciones genéticas y bioquímicas, que comparten características clínicas con fenotipo variable. El espectro clínico incluye las formas clásicas y graves como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la variante con fenotipo de inicio más tardío como es la distrofia muscular de Becker (DMB) (24). Tienen un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X, en el cual se ven afectados directamente los varones y rara vez las mujeres. Los pacientes que la padecen, presentan debilidad muscular progresiva, retraso psicomotriz, caídas frecuentes, atraso en el habla, signo de Gowers (apoyo sobre sus piernas para levantarse en 3 tiempos), pseudohipertrofia de gemelos (figura 1B), como se muestra en la (figura 1A) (25). Además, constituyen un grupo heterogéneo de trastornos causados por alteraciones en el gen DMD, en el cual se ve comprometida o no la funcionalidad de una de las proteínas que se encuentra en el sarcolema de las fibras musculares, por lo que se las clasifica como, Distrofinopatías (alteración en la proteína distrofina) (26).

(A)



(B)



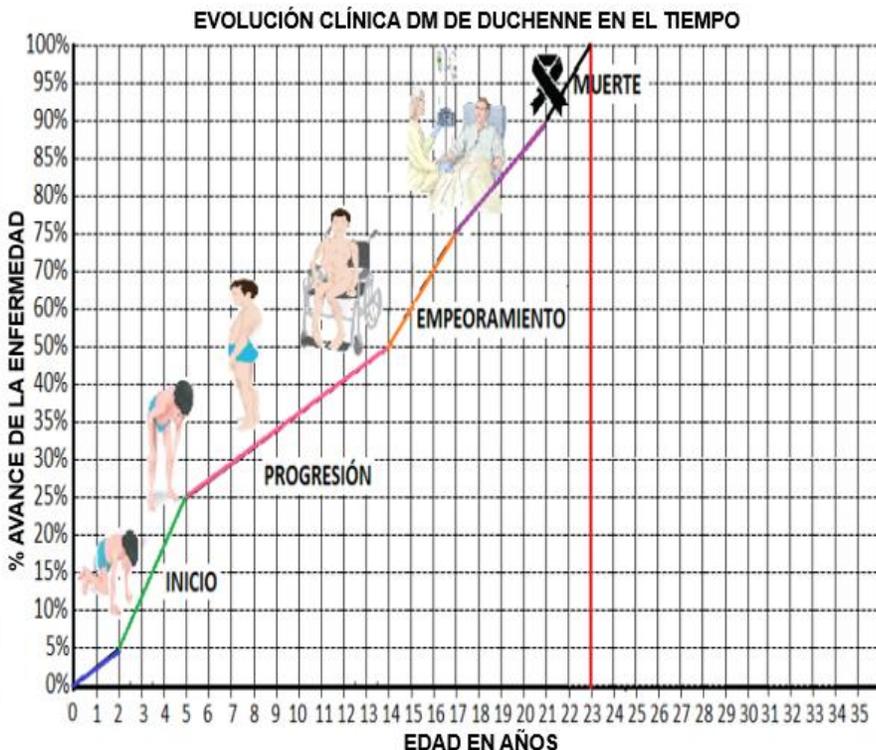
Figura 1. Características clínica paciente afectado con DMD/B. (A) dificultad para levantarse del piso, apoyo en las rodillas, inestabilidad (Signo de Gowers) (8). (B) Pseudohipertrofia gemelar en paciente DMD/B (29).

3.3.1 Generalidades de la distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las afecciones neuromusculares más frecuentes y complicadas en el ser humano, fue descubierta inicialmente por el médico inglés, Edward Meryon (8), pero su nombre se debe a la descripción, identificación clínica y análisis de cambios histopatológicos del músculo realizada por Guillaume Amand Duchenne (10). Su incidencia se estima en 1 de cada 3.500 a 6.000 recién nacidos vivos varones y se estiman 20000 nuevos casos a nivel mundial cada año.

Inicia desde la infancia hasta adolescencia, corresponde a una enfermedad recesiva ligada cromosoma X, en el cual se ven afectados los varones, siendo las mujeres portadoras de la mutación en el gen DMD, que codifica la proteína Distrofina (27), genéticamente si el número de nucleótidos que se duplica o deleciona, no son múltiplos de tres, ocasiona un corrimiento en el marco de lectura, lo que produce la incorporación de aminoácidos aberrantes durante la traducción de la proteína; adicionalmente se pueden generar codones de parada prematuros que conllevan a la interrupción temprana de la traducción y una proteína truncada (9), haciendo que las manifestaciones clínicas de la enfermedad avancen abruptamente entre los tres y cinco años de edad, y los pacientes quedan confinados a usar silla de ruedas cuando empieza un desarrollo exacerbado de atrofia muscular, dañando músculos de la pelvis y proximales de las piernas, finalmente afectando a todo el cuerpo, con un pronóstico de vida muy corto (27) (figura 2) . La causa principal de la muerte ocurre en la segunda década de su vida, por complicaciones graves, donde se ven afectados directamente el músculo cardíaco y el sistema respiratorio (28).

Muerte	
ETAPA NO AMBULATORIA TARDÍA	<ul style="list-style-type: none"> •Perdida movilidad miembros superiores e inferiores •Empeoramiento escoliosis •Falla cardio-respiratoria
ETAPA NO AMBULATORIA TEMPRANA	<ul style="list-style-type: none"> •Uso de silla de ruedas •Escoliosis •Problemas respiratorios
ETAPA AMBULATORIA TARDÍA	<ul style="list-style-type: none"> •Marcha con dificultad •Dificultad para subir escaleras •Contracturas en el tendón de Aquiles •Hipertrofia de gemelos
ETAPA AMBULATORIA TEMPRANA	<ul style="list-style-type: none"> •"Signo de Gowers" •Caídas frecuentes •Marcha puntas de pies
ETAPA PRE SINTOMÁTICA	<ul style="list-style-type: none"> •Retraso de desarrollo •CK elevada



Muerte	
ETAPA NO AMBULATORIA TARDÍA	<ul style="list-style-type: none"> •Perdida movilidad miembros superiores e inferiores •Empeoramiento escoliosis •Falla cardio-respiratoria
ETAPA NO AMBULATORIA TEMPRANA	<ul style="list-style-type: none"> •Uso de silla de ruedas •Escoliosis •Problemas respiratorios
ETAPA AMBULATORIA TARDÍA	<ul style="list-style-type: none"> •Marcha con dificultad •Dificultad para subir escaleras •Contracturas en el tendón de Aquiles •Hipertrofia de gemelos
ETAPA AMBULATORIA TEMPRANA	<ul style="list-style-type: none"> •"Signo de Gowers" •Caídas frecuentes •Marcha puntas de pies
ETAPA PRE SINTOMÁTICA	<ul style="list-style-type: none"> •Retraso de desarrollo •CK elevada

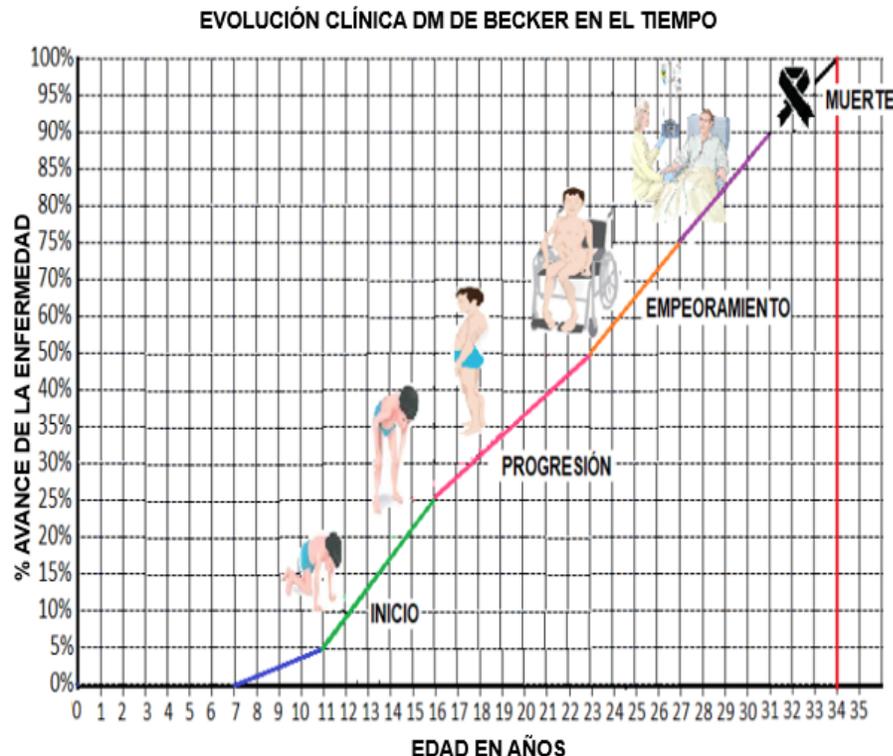


Figura 2. Comparación de la evolución clínica, de las etapas de la enfermedad de DMD Y DMB en el tiempo. *Fuente:* Elaboración propia.

3.3.2 Generalidades de las distrofias Muscular de Becker

La distrofia muscular tipo Becker (DMB) es una variante alélica de DMD, con una prevalencia de 1 en 30,000 recién nacidos varones. La DMB tiene un curso menos severo, que la DMD y una supervivencia más larga. La mutación es originada en el gen DMD, que codifica la distrofina, y los efectos en el fenotipo no dependen del tamaño de la deleción, sino de si se altera o no el marco de lectura. Si el número de nucleótidos que se duplica o deleciona es divisible por tres, no hay corrimiento del marco de lectura y la proteína será más larga o más corta en el centro, pero mantiene los dominios N-terminal y C-terminal, fundamentales para conectar la actina a la matriz extracelular y será parcialmente funcional. Lo que hace que haya producción de niveles bajos de distrofia, reduciendo los signos y síntomas en los pacientes y manteniendo una capacidad ambulatoria a la edad de 16 años o mayores (9) (28).

Tabla 2. Comparación distrofinopatías DMD/B. *Fuente:* elaboración propia.

	DMD	DMB	% progreso enfermedad
Descubierta por	Guillaume Aman Duchenne.	Peter Emil Becker	
Incidencia	1 de cada 3500 a 6000 Recién nacidos vivos, varones, en el mundo	1 de cada 18.000 a 31.000 Recién nacidos vivos, varones, en el mundo	
Etapa pre sintomática: <ul style="list-style-type: none"> ● Retraso de desarrollo ● CK elevada 	Entre 0 y 2 años	Entre 7 y 11 años	5%/100
Etapa ambulatoria temprana: <ul style="list-style-type: none"> ● “Signo de Gowers” ● Caídas frecuentes ● Marcha puntas de pies 	Entre 3 y 5 años	Entre 12 y 16 años	25%/100
Etapa ambulatoria tardía: <ul style="list-style-type: none"> ● Marcha con dificultad ● Dificultad para subir escaleras ● Contracturas en el tendón de Aquiles ● Hipertrofia de gemelos 	Entre 6 y 14 años	Entre 17 y 23 años	50%/100
Etapa no ambulatoria temprana: <ul style="list-style-type: none"> ● Uso de silla de ruedas ● Escoliosis ● Problemas respiratorios 	Entre 15 y 17 años	Entre 24 y 27 años	75%/100

Etapa no ambulatoria tardía	Entre 18 y 20 años	Entre 28 y 31 años	99%/100
<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida movilidad miembros superiores e inferiores • Empeoramiento escoliosis • Falla cardio-respiratoria 			
Fallecimiento	Entre 20 y 23 años	Entre 32 y 34 años	100%

3.4 EPIDEMIOLOGIA

La incidencia estimada, varía entre 3600 a 6000 recién nacidos vivos para DMD, mientras que la DMB es 5 veces menos frecuente. A nivel mundial, la prevalencia varía de 0.95 (África del Sur) a 16,76 (Suecia) por cada 100.000 hombres para el caso de DMD y de 0.13 (África del Sur) a 7.29 (Inglaterra) para la DMB. Colombia no cuenta con datos estadísticos de la enfermedad, debido a la falta de registros, diagnóstico y un código CIE-10 específico, siendo clasificada la enfermedad bajo el código G71.0 que corresponde a Distrofias Musculares, generando un gran subregistro de los pacientes (9).

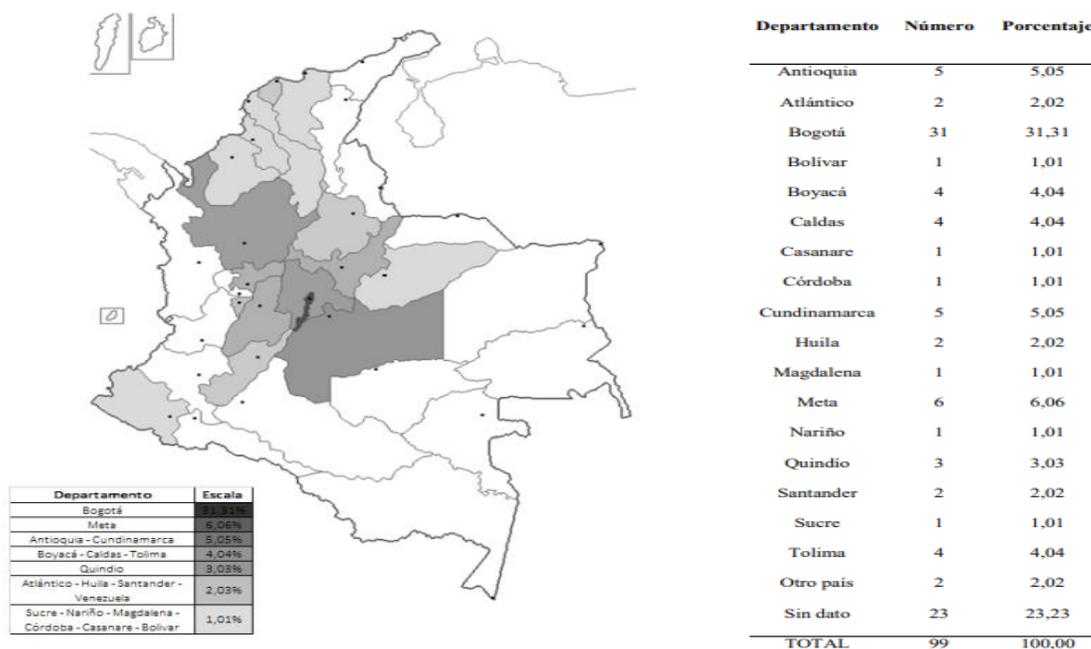


Figura 3: Registro distrofinopatías en Colombia. Tomado de (9)

En Colombia el registro de afectados DMD/DMB incluyen 99 familias de los distintos departamentos como se muestran en la figura 3

3.5 PATRÓN DE HERENCIA DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE O DE BECKER (DMD/B).

El gen DMD, ubicado en el cromosoma X, participa en la producción de distrofina, para la funcionalidad normal del músculo y así mismo está involucrado en cambios genéticos que incluyen mutaciones, que impiden la actividad de la proteína y provoca la distrofia muscular de Duchenne o de Becker (DMD/B) (31). Dado que los hombres, solo cuentan con un cromosoma X, una copia alterada del gen en cada célula es suficiente para causar la condición, mientras que las mujeres al tener dos cromosomas X, una mutación tendría que ocurrir en ambas copias del gen para causar el trastorno. Por lo tanto, un hijo varón podrá heredar un cromosoma X (mutado) de su madre y un cromosoma Y (normal) de su padre y así manifestar la enfermedad. Las mujeres casi nunca presentan DMD/B, dado que, si tienen una mutación en alguno de sus cromosomas X, este permanecerá silenciado y el otro tendrá funcionalidad normal y producirá suficiente distrofina para mantener los músculos fuertes (30), cumpliendo el rol de portadoras. (Figura 4).

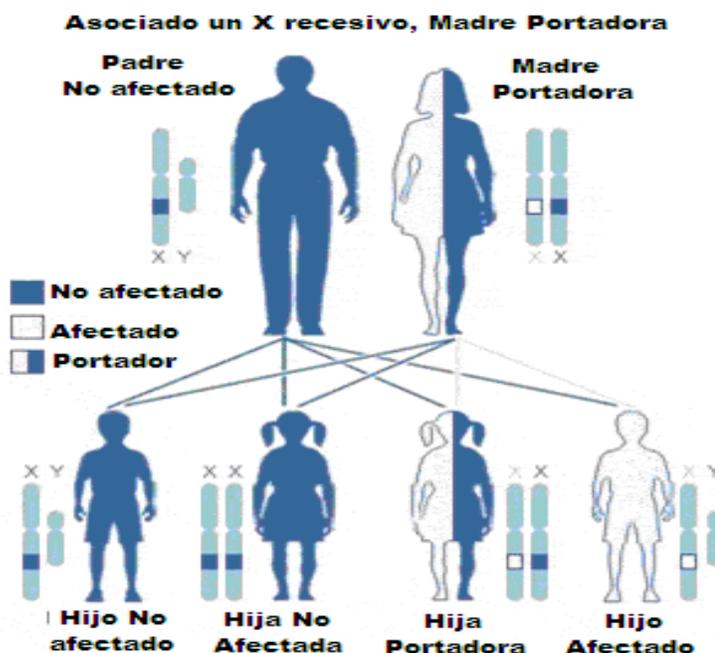


Figura 4. Patrón de herencia distrofia muscular de Duchenne/Becker. Tomado de (31).

3.6 PORTADORAS

En la mayoría de casos, las portadoras de distrofinopatías no presentan signos ni síntomas, sin embargo, pueden padecer un 10% de manifestaciones, que con el tiempo van aumentando, entre estas: mialgias y calambres (5%) debilidad muscular (17%) miocardiopatía dilatada (5%). En estudios recientes se ha demostrado que problemas cardíacos son más comunes en portadoras de fenotipos DMD y no de DMB (32).

3.7 GEN DMD

Descrito en el año 1987, como *gen DMD*, Ubicación citogenética: Xp21.2-xp21.1, lo que indica que se encuentra en el brazo corto (p) del cromosoma X, en su ubicación molecular cuenta con 31,119,219 a 33,339,609 pares de bases (pb) en el cromosoma X, su tamaño es de 2.4Mb (5) (figura 5), aproximadamente el 99% del gen está constituido por intrones y el 1% restante corresponde a 79 exones por lo que lo cataloga como el gen más grande del genoma humano, incluyendo siete promotores que codifican para siete isoformas de la proteína distrofina (9). Este gen DMD tiene una gran heterogeneidad mutacional, siendo las deleciones las mutaciones más comunes con un 68%, las duplicaciones se encuentran en el 11% de los casos y el 20% restante son pequeñas mutaciones puntuales. Adicionalmente se estima que cerca de un tercio de las mutaciones son de *Novo* (9).

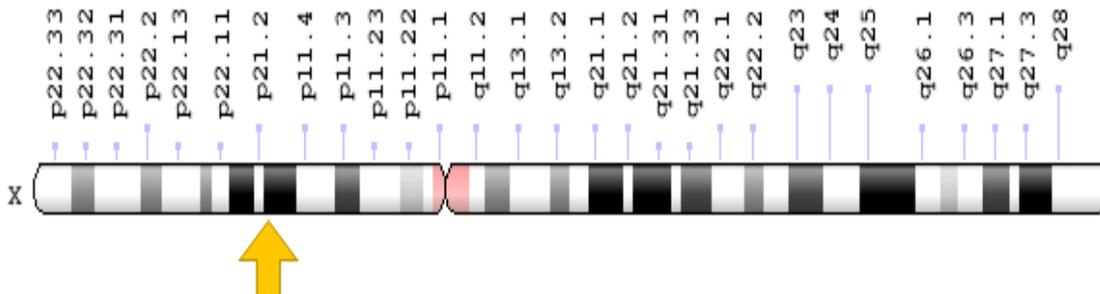


Figura 5. Ubicación del Gen DMD en cromosoma X. Tomado de (33).

3.7.1 Mutaciones en el gen DMD

El gen de la DMD consta de 79 exones distribuidos en más de 2.4 millones de nucleótidos en el cromosoma X, lo que le confiere un gran tamaño, esto ha dificultado el análisis mutaciones utilizando la técnica PCR por lo que años atrás se requirió realizar la secuenciación de todo el ADNc de más de 11 kilobases, para identificar las mutaciones, donde se determinó que las eliminaciones de uno o más de estos exones representan el 68% de los casos de distrofinopatías (6).

Las mutaciones que se encuentran con más frecuencia en la DMD/B son grandes deleciones (68%), duplicaciones (11%) o mutaciones puntuales en el 20% de los casos. Las deleciones pueden localizarse en cualquier parte del gen, no obstante, existen unas regiones en donde se presentan con mayor frecuencia, llamadas regiones proclive o *hot spot*, entre los exones 45-55 (80%) y entre los exones 1-19 (20%) respectivamente (5).(figura 6).

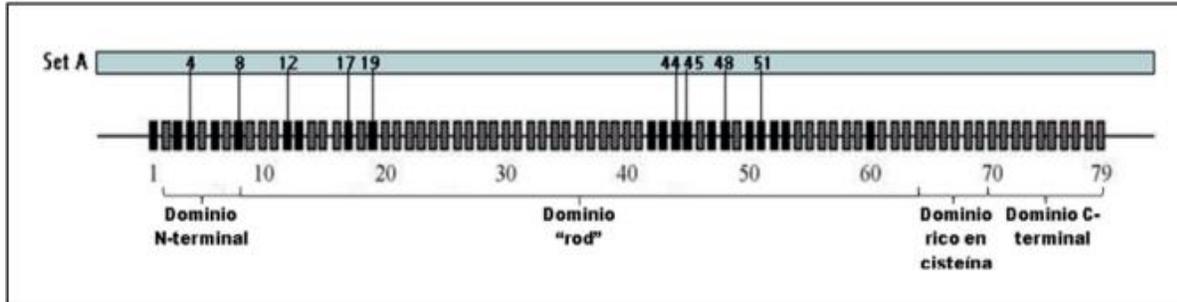


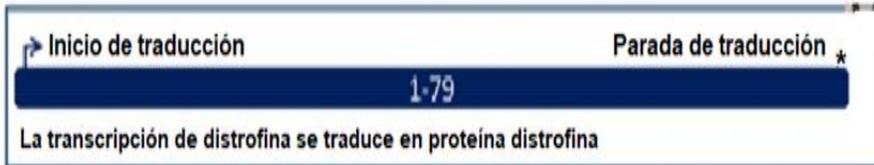
Figura 6: Diagrama esquemático del gen DMD. Se muestran las localizaciones relativas de los exones 4,8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 y 51 considerados los más comunes en deleciones. Los corchetes indican los exones involucrados en la expresión de los diferentes dominios de la proteína distrofina. Las líneas verticales señalan su localización relativa. Tomado de (34).

Estas mutaciones alteran principalmente la estructura y también la expresión de la proteína distrofina y, dependiendo de su tipo y posición, determinan la capacidad funcional remanente, dando lugar a diferentes rangos de severidad en el fenotipo de DMD o DMB. Así, la deleción de una base puede producir una DMD severa, mientras que la eliminación de varios exones puede producir una DMB leve (34).

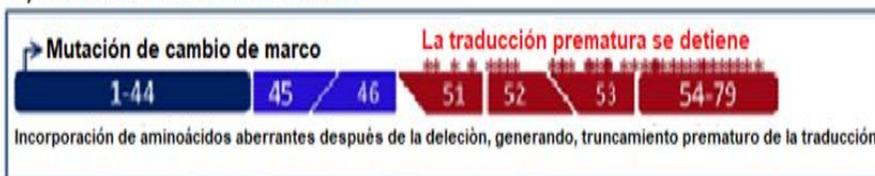
3.7.2 Regla del marco de lectura

En el caso del gen DMD, los efectos en el fenotipo no dependen del tamaño de la deleción, sino de si se altera o no el marco de lectura, entonces, si el número de nucleótidos que se duplica o delecióna es divisible por tres, no hay corrimiento del marco de lectura y la proteína será más larga o más corta en el centro, pero mantiene los dominios N- terminal y C-terminal, fundamentales para conectar la actina a la matriz extracelular y será parcialmente funcional (este tipo de mutaciones son encontradas en los pacientes con DMB) (35). En el caso de la duplicación o deleción de nucleótidos que no son múltiplos de tres, ocasiona un corrimiento en el marco de lectura, lo que produce la incorporación de aminoácidos aberrantes durante la traducción de la proteína; adicionalmente se pueden generar codones de parada prematuros que conllevan a la interrupción temprana de la traducción y una proteína truncada (figura 7). En este caso la ausencia de proteína funcional conlleva a la presentación del cuadro severo de distrofia muscular, conocido como DMD (6),(9),(35).

A) Normal

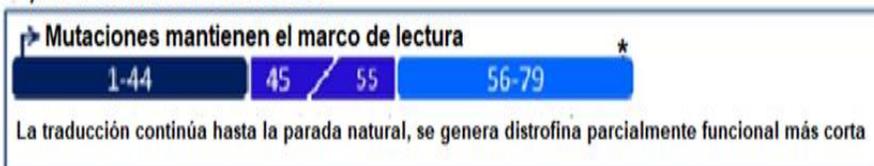


B) Distrofia Muscular de Duchenne



Una deleción de los exones 47-50, panel superior, que conducen a la inclusión de aminoácidos aberrantes y al truncamiento prematuro de la traducción.

C) Distrofia Muscular de Becker



Una deleción de los exones 46-54, la traducción de proteínas no se detiene prematuramente, sino que continúa hasta que el codón de detención natural al final del ARNm. Sin embargo, la distrofina generada será más corta porque carecerá de los aminoácidos codificados por los

Figura 7: Transcripción de distrofina en individuos sanos DMD y DMB. Tomado de (35).

3.8 DISTROFINA

La distrofina es una de las proteínas estructurales del músculo, principalmente del esquelético, cardíaco y liso, codificada por el gen DMD. Se localiza en la cara citoplasmática de la membrana plasmática de las fibras musculares y hace parte del complejo glicoproteico, que brinda resistencia al estrés mecánico que genera la contracción muscular, en la célula, protegiéndola de ser degradada (5). Está constituida por 3,685 aminoácidos, su tamaño es de aproximadamente 427 kDa y consta de cuatro dominios estructurales principales.

- El dominio N- terminal, codificado por los exones 1 a 8, con un dominio de unión a la F- actina, con dos dominios de homología a calponina CH1 y CH2.
- El segundo dominio “rod”, ubicado en la parte central de la distrofina, codificado por los exones 8 a 11, constituido por 24 repeticiones de 109 aminoácidos, que a su vez están interrumpidas por regiones ricas en prolina, dándole flexibilidad a la molécula, para asociarse a la actina.
- El tercer dominio, asociado a distroglicano, codificado por los exones 62 a 69 es el dominio rico en Cys compuesto por un dominio WW y un dominio ZZ. Este dominio se une a la proteína de membrana β -dystroglycan y a varias otras proteínas como la plectina, anquirina y la proteína de filamento intermedio
- El dominio C- terminal, que contiene 400 aminoácidos, codificado por los exones 69 a 79, es el encargado de formar un complejo glicoproteínas en el sarcoplasma (34) (35) (37).(figura 8)

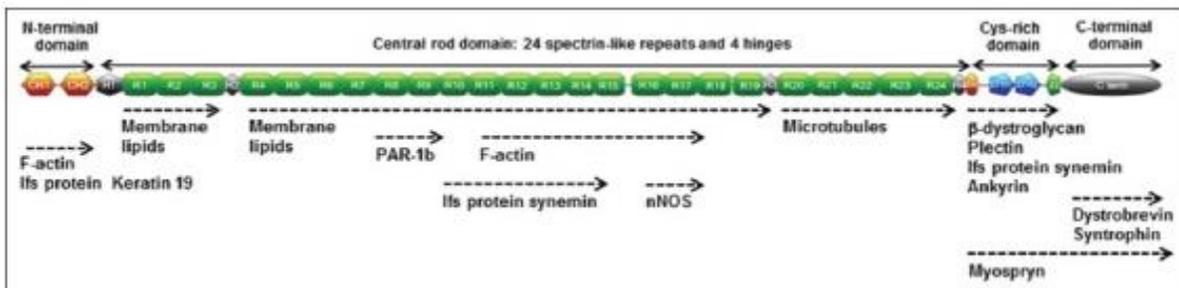


Figura 8. Esquema de la proteína distrofina. Se muestran los 4 dominios y sus diferentes regiones. Tomado de (36)

En las Distrofinopatías, la cantidad de distrofina disminuida ocasiona debilidad mecánica de la membrana plasmática, permitiendo la entrada masiva de calcio extracelular que produce la elevación de la creatinina fosfoquinasa (CPK), provocando lesión y necrosis de las fibras musculares (34). En la presentación de Becker se genera una proteína parcialmente funcional y en consecuencia los pacientes afectados tienen un curso clínico atenuado (5). (figura 9)

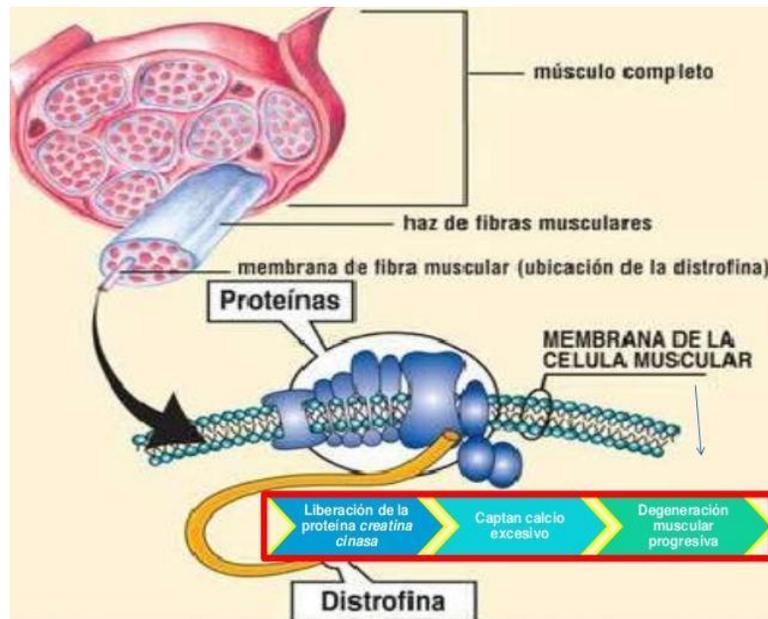


Figura 9. Ubicación de distrofina en la célula. Tomado de (38).

La proteína distrofina a su vez contempla varias isoformas como: muscular, cortical, cerebral, retiniana, la de la célula de Schwann y la glía (12). Aunque los síntomas de la DMD se relacionan principalmente con las isoformas musculares, se ha planteado que la ausencia de distrofina en el cerebro es la causa del déficit cognitivo observado en pacientes con DMD (39). También se ha demostrado que en los pacientes en quienes la mutación afecta la isoforma retiniana Dp260, presentan mayor debilidad para la visión rojo-verde. Los fibroblastos y las plaquetas expresan las isoformas Dp116 y Dp71 respectivamente; el mayor sangrado observado durante cirugías en estos pacientes se ha vinculado con las mutaciones que afectan dichas isoformas (12,48).

3.9 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA ENFERMEDAD

La importancia del diagnóstico rápido de una distrofia muscular, es la posibilidad de minimizar el impacto de la enfermedad tanto en hombres como en mujeres, para esto se debe tener en cuenta, en primer lugar, el fenotipo del paciente, este debe presentar, signos y síntomas típicos de estas enfermedades, seguido de su historia familiar (genealogía) dado que hasta el momento se las describe como enfermedades genéticas. Anexo a esto el profesional de la salud deberá solicitar los exámenes que se describen continuación y además incluir el asesoramiento familiar que en estos casos es imprescindible y requiere la colaboración de especialistas en genética clínica (44).

A continuación, se presenta un algoritmo para identificación de la distrofia muscular.

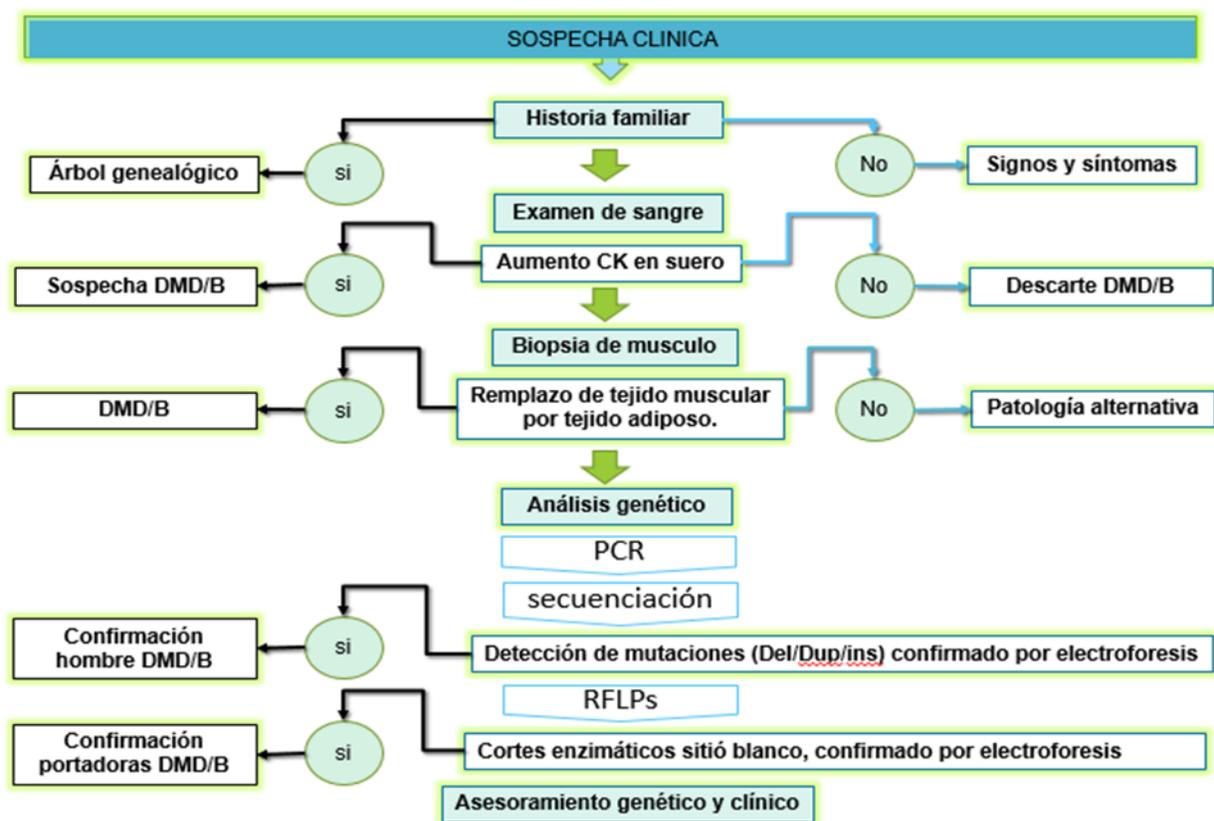


Figura 10. Algoritmo diagnóstico DMD/DMB Fuente: Elaboración propia

Evaluación clínica:

Análisis de sangre

- Se miden los niveles de creatina quinasa en suero, dado que es una enzima que se libera al torrente sanguíneo cuando las fibras musculares se están deteriorando (los niveles altos de esta enzima constituyen un marcador preciso para identificar daño muscular)
- Valor de referencia:
 - Mujeres: 0,5 a 1,0 mg/dl (45-90 $\mu\text{mol/l}$)
 - Hombres: 0,7 a 1,2 mg/dl (60-110 $\mu\text{mol/l}$).
 - Paciente DMD/B: valores $> 1,2$ mg/dl (44).

Biopsias de músculo

- Se observa bajo un microscopio la cantidad de tejido muscular presente en el paciente, dado que por la pérdida de distrofina, las fibras musculares pierden funcionalidad lo que conlleva al reemplazo de estas, por tejido adiposo, lo que facilita determinar el avance de la enfermedad (figura 11). (40)

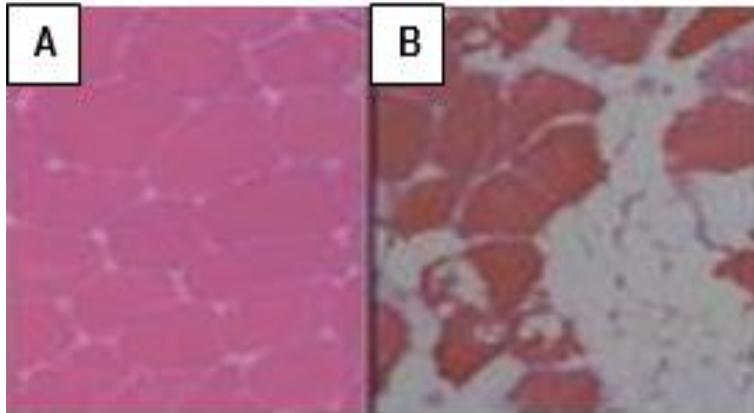


Figura 11. Biopsia musculo gastrocnémios. A) Paciente normal. B) Paciente DMD/B. Tomado de (40,47).

Pruebas neurológicas

- Para descartar otros trastornos del sistema nervioso, identificar patrones de atrofia y debilidad muscular, verificar los reflejos y la coordinación y detectar contracciones (49).

Pruebas cardiacas

- como un electrocardiograma (ECG) para medir el ritmo y la frecuencia cardíaca.

Evaluaciones mediante ejercicios

- Para evaluar el nivel de fuerza, movilidad y función respiratoria del paciente que teniendo en cuenta la edad y el progreso de la enfermedad, estas se ven disminuidas.

Pruebas genéticas

- Que incluyen PCR, secuenciación, RFLPs, Microsatélites entre otras, para identificar el lugar en donde se ha producido algún tipo de mutación en el gen de la distrofina, que conduce al fenotipo DMD/DMB y a su vez identificación de portadoras.

3.9.1 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Es una técnica molecular, estudiada por Chien et al. 1976 quien aisló a *Thermus aquaticus* (enzima termoestable) y desarrollada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1985, utilizada para amplificar o hacer varias copias de un fragmento en específico de ADN, tienen como objetivo producir suficiente ADN de la región blanco para su posterior visualización por electroforesis en gel, secuenciar o clonar (45). (Figura 12).

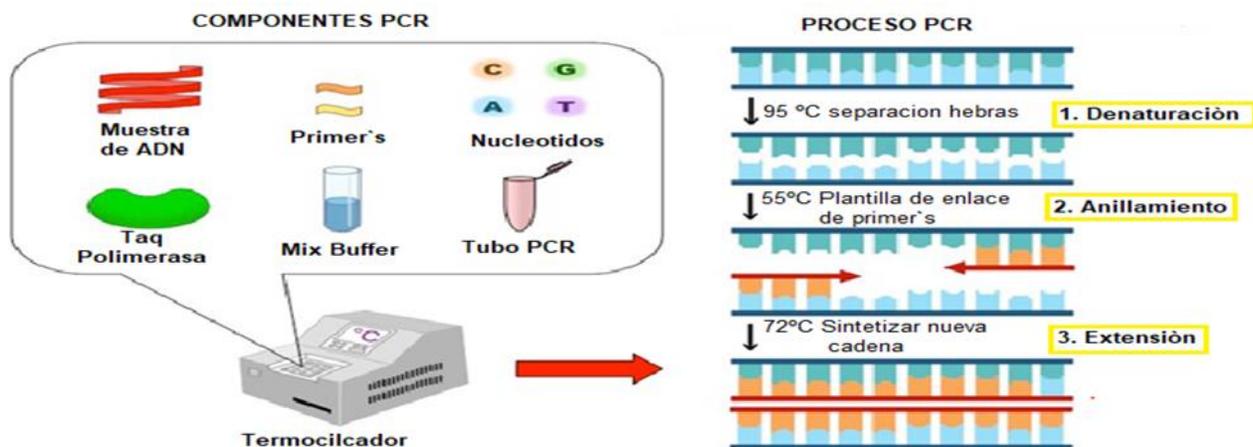
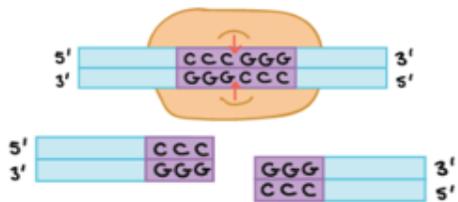


Figura 12. Técnica PCR (41).

3.9.2 RFLPs (*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*)

Es una técnica que se usa como marcador para identificar grupos particulares de personas con riesgo a contraer ciertas enfermedades genéticas. Utiliza secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos. Estas enzimas producen un gran número de cortes en lugares reconocidos por sus secuencias polimórficas. Los RFLP son marcadores génicos del ADN y se pueden encontrar en regiones que codifican proteínas o exones, en los intrones o en el ADN que separa un gen de otro. Estas enzimas son capaces de reconocer uno o varios puntos cercanos o distantes y cortarlos. Una vez que las enzimas actúan sobre el ADN extraído, va a ser fragmentado en secciones de diferente tamaño, produciendo "extremos romos" cortes a la mitad de la secuencia blanco que no dejan extremos de cadena sencilla y "extremos cohesivos" cortes que se pueden aparear con secuencias complementarias y dejan extremos de cadena sencilla (43). (figura 13)

Extremos Romos:



Extremos cohesivos:

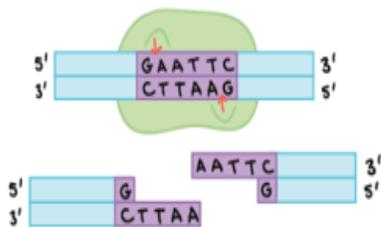


Figura 13. Actividad

enzimas de restricción. Tomado de (43).

Enzima	<u>TaqI</u>	<u>XmnI</u>
Producida por	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Xanthomonas manihotis</i>
Actividad catalítica	Genera extremos cohesivos	Genera extremos ramos
Sitio de reconocimiento	5' TCGA 3' AGCT	5'...GAANN [↓] NNTTC...3' 3'...CTTNN [↓] NNAAG...5'
Resultado de corte	5' --- TCGA --- 3' 3' --- AGC T --- 5'	5'...GAANN [↓] NNTTC...3' 3'...CTTNN [↓] NNAAG...5'

3.10 TRATAMIENTO

Hasta el momento Distrofia muscular de Dúchenne y distrofia muscular de Becker, no cuentan con un tratamiento efectivo al 100%, pero si con ayudas multidisciplinares que previenen que la degeneración de los pacientes a nivel muscular avance rápidamente. Especialidades como: rehabilitación, ortopedia, cardiología, neurología, neumatología, nutrición, psicología y genética, se han visto involucradas en el tratamiento de pacientes DMD/B dando resultados favorables en las últimas décadas (32). El tratamiento debe enfocarse principalmente en cuatro aspectos: el mantenimiento de la fuerza muscular del paciente, la prevención del desarrollo de deformidades de la columna vertebral, el manejo de complicaciones respiratorias, y la prevención y tratamiento de alteraciones cardíacas (40).

Tabla 3: Tratamiento. Ayudas multidisciplinares para pacientes DMD/B según avance de la enfermedad. Tomado de (15,40,44).

Concepto	Etapa 1: Pre-sintomática	Etapa 2: Ambulatoria Temprana	Etapa 3: Ambulatoria Avanzada	Etapa 4: No Ambulatoria Temprana	Etapa 5: No Ambulatoria Avanzada
Signos clínicos de sospecha	-Puede ser diagnosticada en esta etapa si la creatina-kinasa se encuentra elevada o si hay una historia familiar positiva -Puede mostrar un retraso de desarrollo pero sin alteración en la marcha	-Maniobra de Gower -Marcha con balanceo -Tal vez camine de puntillas -Puede subir las escaleras	-Marcha cada vez más dificultosa -Pierde la capacidad de subir escaleras y levantarse del piso	-Tal vez sea capaz de autopropulsarse por un tiempo -Capaz de mantener la postura -Tal vez desarrolle escoliosis	-Función de miembros superiores mantenimiento postural es cada vez más limitada
Diagnóstico	-Examen diagnóstico y consejo genético		Probable que sea diagnosticada antes de llegar a esta etapa al menos que se retrase por otras razones (ej. patología concomitante)		
Manejo Neuromuscular	-Planeación anticipatoria para acontecimientos futuros -Asegurar de cumplir con el calendario de inmunización	-Seguir con la evaluación para asegurar que la enfermedad evolucione como se esperaba en conjunto con la interpretación de exámenes diagnósticos -Una evaluación de al menos cada 6 meses de función, fuerza, y amplitud de movimiento para definir la fase de la enfermedad y determinar la necesidad de intervención con glucocorticoides, manejo continuo del régimen de glucocorticoides, manejo de efectos secundarios			
Manejo Ortopédico	-Cirugía ortopédica rara vez es necesaria		-Considerar opciones quirúrgicas para contracturas del tendón de Aquiles en ciertas situaciones	-Monitorear la escoliosis: intervención con fusión espinal posterior en situaciones definidas -Posible intervención para posición de pie y en posición de silla de ruedas	

Manejo de la Rehabilitación	-Educación y apoyo -Medidas preventivas para mantener la extensibilidad muscular y minimizar contracturas -Alentar ejercicios/actividades apropiadas -Soporte para mantener función y participación social -Provisión de aparatos adaptativos apropiados	-Sigue con medidas previas -Provisión de sillas de ruedas y asientos apropiadas y ayuda y adaptaciones para permitir la independencia máxima en las actividades de la vida cotidiana, función, y participación		
Manejo Pulmonar	-Función respiratoria normal -Asegurar que el calendario de inmunización incluya las vacunas neumocócica 23-valente e influenza	-Riesgo bajo de problemas respiratorios -Monitorear el progreso	-Riesgo en aumento de impedimento respiratorio -Se detonan las evaluaciones respiratorias	-Riesgo alto de impedimento respiratorio -Se detonan revisiones e intervenciones respiratorias
Manejo Cardíaco	-Ecocardiograma en el momento del diagnóstico o antes de los 6 años de edad	-Un máximo de 24 meses entre revisiones hasta los 10 años de edad, y después cada año	-Realizar las mismas evaluaciones que en el grupo más joven -Conforme aumente la edad, aumenta riesgo de problemas cardíacos; requieren intervención, aunque sean asintomáticos -Cuando se detecte deterioro de función cardíaca, realizar intervenciones estándares de insuficiencia cardíaca	
Manejo gastrointestinal, del lenguaje, de deglución, y de nutrición	-Monitorear aumento de peso normal para su edad -Evaluación nutricional para monitorear exceso/falta de peso			-Atención a posible disfagia
Manejo Psicosocial	-Apoyo familiar, evaluación/intervención temprana de desarrollo, aprendizaje, y comportamiento.	-Evaluación/intervención de aprendizaje, comportamiento, y manejo de la situación. Fomenta independencia y desarrollo social.		-Planeación de transición a servicios para adultos.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio:

- Descriptivo, experimental.

4.2 Población:

- Familia colombiana que reside en el municipio de Córdoba Nariño.

4.3 Muestra de estudio:

- La familia colombiana del estudio está compuesta por aproximadamente 42 integrantes, de los cuales a 20 se le realizó el estudio. Se incluyeron hombres y mujeres, entre los 2 y 75 años de edad que residen en el municipio de Córdoba, Nariño. Posteriormente, con previa aceptación por medio de la firma de un consentimiento informado (ver anexo 1) para su participación en el estudio, se procedió a tomar las muestras. Teniendo en cuenta que hasta el momento

existen 4 casos reportados para DMD en la familia (3 de ellos fallecidos) que no cuentan con estudios genéticos que confirmen un diagnóstico para Distrofia Muscular de Duchenne.

4.4 Criterios de inclusión:

- En el estudio se incluyeron a miembros de la familia, teniendo en cuenta.
 - ✓ Sexo: se incluyó a hombres y mujeres
 - ✓ Edad: Entre 2 y 85 años
 - ✓ Nivel de escolaridad: Primaria, Bachillerato, Universitario.
 - ✓ Residencia: Córdoba Nariño
 - ✓ Participantes con o sin diagnóstico para distrofia muscular de Duchenne y otras patologías

4.5 Criterios de exclusión:

- Miembros de la familia que no residen en el municipio de Córdoba, participantes que no decidieron hacer parte del estudio y a su vez los que no firmaron el consentimiento informado.

4.6 Indicadores:

- Para determinar la presencia de la mutación que conlleva al fenotipo de Distrofia muscular de Duchenne en los participantes del estudio, se tuvo en cuenta: Árbol genealógico, historia clínica, signos y síntomas (actuales), edad, sexo, fotografías y antecedentes. Se incluyeron resultados previos de uno de los integrantes que demuestran mutación en el exón 45.

4.7 Hipótesis:

- La técnica de PCR para la detección de deleciones en personas con DMD/DMB es útil para la identificación de hombres afectados, dado que solo presentan un cromosoma X en su cariotipo, lo que facilita la identificación de mutaciones presentes en este, por el contrario, las mujeres son heterocigotas y presentarán un alelo mutado en uno de los cromosomas X mientras el otro X estará libre de mutación y se expresión será normal. (30), lo que dificulta la identificación por

esta técnica, cuando estas refieren grandes deleciones, dicho lo anterior es necesario acudir a otras técnicas moleculares, como *RFLPs*, entre otros, como apoyo diagnóstico completo que identifique a las portadoras, para brindar un diagnóstico más certero, que lleve a la orientación terapéutica y a tratamientos adecuados en las familias.

5. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo a través de 2 fases con actividades definidas para cada una, como se describe a continuación:

5.1 FASE I: Identificación de deleción del exón 45 y 51 del gen DMD, en participantes de la familia por técnica PCR.

5.1.1 Muestra analítica:

- Sangre total

5.1.2 Recolección de muestra:

- Se socializo a cada uno de los participantes, los procedimientos que incluyen; importancia de consentimiento informado y riesgos de la toma de muestra (venopunción).
- Se extrajo la muestra de sangre total, en tubos tapa lila con anticoagulante (EDTA) para preservación de la muestra.
- Se tuvo en cuenta el “*manual de toma, preparación, embalaje, transporte y remisión de muestras en laboratorio clínico*”, de la E.S.E departamental “Solución salud” Versión 3, Código MN-LAB-01, Página 1 de 18 (42) .Para toma y transporte de las muestras desde el municipio de Córdoba Nariño, donde reside la familia, hasta la ciudad de Bogotá (Instituto de Genética UNAL) donde se hicieron alícuotas y se almacenaron a 70°C para su preservación, para posterior análisis de las mismas.

5.1.3 Caracterización clínica de los pacientes:

Se tuvieron en cuenta historias clínicas de tres de los individuos de la familia que fallecieron, hace 3 años, para determinar datos clínicos y paraclínicos de referencia, que incluyen, electrocardiogramas y radiografías (ver anexo 2). Además, se hizo el registro de un individuo de 7 años que actualmente, presenta diagnóstico clínico y paraclínico de DMD y permanece en control y tratamiento en la ciudad de Pasto – Nariño. Así mismo, se tuvo en cuenta a las mujeres portadoras familiares de los pacientes, para posterior asesoría genética, para prevenir y evitar el riesgo de heredar la mutación a las próximas generaciones.

5.1.4 Extracción del material genético

- Para la extracción del material genético, de las muestras se utilizó un kit de extracción de ADN comercial (ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep de promega) teniendo en cuenta el protocolo de la casa comercial (ver anexo 3). Se hizo posterior cuantificación de las muestras por espectrofotometría, con un NanoDrop 2000, para evaluar la pureza, calidad y cantidad del material genético extraído, teniendo en cuenta la relación 260/280.

5.1.5 Diseño de primers de exones 45 y 51 del gen DMD.

Para la amplificación de los exones de los exones 45 y 51 se descargaron las secuencias de la base de datos Ensembl genome browser 97 (ver anexo 4), luego con el software Primer3 Input (versión 0.4.0) se diseñaron las secuencias de los primers. Teniendo en cuenta que el gen DMD es uno de los más grandes en el genoma, el diseño de los primers fue dirigido directamente a los exones mencionados y las secuencias seleccionadas se muestra en la tabla 4. Se analizó la especificidad de los primers a través de una PCR *in silico* en la plataforma BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu>).

Tabla 4. Características de los Primers diseñados para los exones previamente seleccionados.

GEN	EXÓN	LEFT PRIMER	% GC	Tm (c)	RIGHT PRIMER	% GC	Tm (c)	TAMAÑO (pb)
DMD	45	5'AAACATGGAACA TCCTTGTGGGGAC3'	48.0	65.8	3'CATTCTATTAGAT CTGTCGCCCTAC5'	46.15	66.3	547
DMD	51	5'GAAATTGGCTCT TTAGCTTGTGTTTC3'	38.46	63.2	3'GGAGAGTAAAGTGAT TGGTGGAAAATC5'	40.74	65.3	388

Estas secuencias fueron previamente probadas a través de una PCR *in silico* en la plataforma BiSearch, con el fin de evidenciar que los primers se acoplaran a la región de interés.

5.1.6 Técnica PCR convencional

La técnica de PCR para la amplificación del material genético se estandarizo utilizando el termociclador BIO-RAD C1000 TOUCH. Se utilizaron las condiciones que se muestran en la siguiente tabla 5:

Tabla 5: Condiciones y reactivos utilizados para la amplificación de los exones 45 y 51 del gen DMD

REACTIVOS	PRIMER EXON 45	X22	PRIMER EXON 51
Buffer	5 µl	110 µl	5 µl
Dntp` s	2 µl	44 µl	2 µl
Primer Left	1.5 µl	33 µl	1.5 µl
Primer Right	1.5 µl	33 µl	1.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl	33 µl	1.5 µl
H ₂ O	10.375 µl	228.25 µl	10.375 µl
GoTaq	0,125 µl	2.75 µl	0,125 µl
DNA	3 µl	3 µl	3 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl
Tº Denaturación inicial	95 ° C durante 5 minutos		95 ° C durante 5 minutos
Tº Denaturación	98 ° C durante 20 segundos		98 ° C durante 20 segundos
Gradiente	66.1 ° C durante 15 segundos		66.1 ° C durante 15 segundos
Extensión	72 ° C durante 30 segundos (35 ciclos)		72 ° C durante 30 segundos (35 ciclos)

Extensión final	75 ° C durante 5 minutos		75 ° C durante 5 minutos
Infinite hold	4 ° C ∞		4 ° C ∞

- Siguiendo el protocolo de la técnica se amplificaron los fragmentos de interés a partir de la Master Mix que incluye Buffer, MgCl, primer`s, DNTPs, H2O y la acción de la enzima GoTaq polimerasa®, con la muestra de cada participante. La PCR es un proceso repetitivo que requiere tres pasos fundamentales a saber: denaturación de la doble cadena de ADN molde, anillamiento de los dos primers de oligonucleótidos al molde de cadena sencilla y extensión enzimática de los primers para producir las copias que van a servir como molde en las siguientes repeticiones.

5.1.7 Electroforesis

- Los productos obtenidos de la PCR, se visualizaron en un gel de agarosa, al 1.5% (teñidos con SYBR® safe) y se visualizaron bajo un fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc CA, USA)

5.1.8 Purificación:

- Los productos amplificados obtenidos fueron purificados, con el método de etanol acetato, ya estandarizados en el laboratorio de Neurociencias (ver anexo 5). Se realizó la cuantificación en el equipo NanoDrop 2000, para verificar la cantidad y calidad del amplificado, para su posterior secuenciación

5.1.9 Secuenciación:

- Se utilizaron 5 de productos purificados y se enviaron a secuenciación en el departamento SsiGMol del Instituto de Genética de la universidad Nacional de Colombia, donde se procesaron en el equipo 3500 Genetic Analyzer For

Resequencing & Fragment Analysis. Para confirmar que las regiones amplificadas correspondieran a los exones 45 y 51.

5.2 FASE II: Identificación de portadoras de la delección del exón 45 en el gen DMD por técnica RFLPs

5.2.1 Extracción de material genético

- Para la extracción del material genético, de las muestras se utilizó un kit de extracción de ADN comercial (ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep de promega) teniendo en cuenta el protocolo de la casa comercial (ver anexo 3). Se hizo posterior cuantificación de las muestras por espectrofotometría, con un NanoDrop 2000, para evaluar la calidad y cantidad del material genético extraído

5.2.2 Diseño de primer´s para pERT87.8 Taql y pERT 87.15B XmnI

- Obtenidos de literatura, se analizaron dos sitios polimórficos intragénicos del locus DMD, utilizados en otros ensayos y poblaciones: pERT87-15/XmnI y pERT87.8/TaqI. (51), así mismo comprobando su especificidad a través de una PCR *in silico* en la plataforma Bisearch. (Ver tabla 6) Información tomada de (51).

Tabla 6. Primer´s enzimas de restricción *TaqI* y *XmnI*

ENZIMA	LEFT PRIMER	% GC	Tm (c)	RIGHT PRIMER	% GC	Tm (c)	TAMAÑO (pb)
pERT87-8- (TaqI)	5'GTCAGTTGGTCAGT AAAAGCC3'	47.62	59.4	3'CCAATTA AAAACCA CAGCAG5'	42.11	53.0	A1: 145pb A2:71/72pb
pERT87-15B (XmnI)	5'GACTGGAGCAAGG GTCGCC3'	68.42	38.1	3'ACAATTTCCCTTT CATTCCAG5'	63.8	55.5	A1:740pb A:2520/220pb

5.2.3 Estandarización de técnica RFLPs (*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*)

La técnica de PCR para la amplificación del material genético se estandarizó utilizando el termociclador BIO-RAD C1000 TOUCH. Se utilizaron las condiciones que se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Condiciones y los reactivos utilizados para la amplificación

REACTIVOS	ERT87-8- (TaqI)	X22	ERT87-15B (Xmnl)
Primer Left	0.5 µl	11 µl	0.5 µl
Primer Right	0.5µl	11 µl	0.5µl
H ₂ O	8.5µl	187 µl	8.5µl
GoTaq	12.5µl	275 µl	12.5µl
DNA	3µl	3 µl	3µl
Volumen final	25 µl		25 µl
T° Denaturación inicial	94 ° C durante 30 segundos		94 ° C durante 30 segundos
T° Denaturación	94 ° C durante 30 segundos		94 ° C durante 30 segundos
Gradiente	56.5 ° C durante 30 segundos		56.5 ° C durante 30 segundos
Extensión	68 ° C durante 1 minuto (30 ciclos)		68 ° C durante 1 minuto (30 ciclos)
Extensión final	68 ° C durante 5 minutos		68 ° C durante 5 minutos
Infinite hold	4 ° C ∞		4 ° C ∞

5.2.4 Digestión DNA con enzimas de restricción

- Una vez obtenido el amplificado, se procede a realizar la digestión con RFLPs (Restriction fragment length polymorphisms) para el reconocimiento y corte de secuencias específicas de ADN, para el caso de usaron las enzimas TaqI y Xmnl el producto se mezcló con una Master mix, que incluye, Buffer, enzimas, ADN y H₂O si lo requiere (ver condiciones tabla 8) Información tomada de (51).

La enzima TaqI reconoce y actúa sobre la secuencia 5´ T´CGA 3´, en tanto que Xmnl reconoce 5´GAANN´NNTTC 3´, donde N es cualquier base.

Los productos de restricción de *TaqI* y *Xmnl*, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % a 120V 20 minutos y fueron teñidos con SYBR® safe para su

respectiva visualización bajo el documentador donde se analizaron los resultados de la figura 19.

Tabla 8. Condiciones óptimas para digestión de enzimas

REACTIVOS	ERT87-8- (TaqI)	X20	ERT87-15B (Xmnl)
Buffer	0.5 µl		0.5 µl
Enzima	2.5µl		2.5µl
DNA	20 µl		20 µl
H2O	2 µl		2 µl
Volumen final	25 µl		25 µl
Tº Digestión	64 °C durante 7 minutos		64 °C durante 7 minutos

5.2.5 Electroforesis.

- Una vez obtenidos los productos de digestión se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (teñidos con SYBR® safe). Los resultados se visualizaron en fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc CA, USA)

5.3 CONSEJERIA GENETICA

Una vez obtenidos los resultados genéticos, confirmando la presencia de mutaciones para DMD en la familia colombiana, involucrada para distrofia muscular de Duchenne, es importante para los participantes contar con consejería genética, ya que enfermedades de este tipo representan alrededor del 10 % de la población, por ello su atención va desde su prevención, mejorar su calidad de vida y la integración social. Para lo anterior se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

Tabla 9. Sesiones para consejería genética (46).

Primera sesión	Segunda sesión	Tercera sesión
<ul style="list-style-type: none"> • Presentación del caso -Fenotipo (Signos y síntomas) -Genealogía (Historia familiar) 	<ul style="list-style-type: none"> • Entregar los resultados de los exámenes realizados. •Profundizar en el conocimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Valorar grado de comprensión de la familia sobre la información ofrecida.

<p>Exámenes complementarios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ofrecer información general sobre la enfermedad. • Conocer inquietudes, pensamientos y creencias que poseen los pacientes. 	<p>de la enfermedad.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mantener apoyo psicológico y afianzarlo. • Brindar opciones reproductivas. • Entregar hoja educativo-informativa. • Invitar a familiares de los pacientes a la próxima consulta. 	<ul style="list-style-type: none"> • Esclarecer dudas para disminuir temores, ansiedad, preocupaciones, así como los sentimientos de culpa. • Continuar el apoyo psicológico. • Brindar seguimiento el servicio genético.
---	--	--

6. RESULTADOS

6.1 ÁRBOL GENEALÓGICO

El patrón de herencia de Distrofia Muscular De Duchenne, en la familia colombiana del estudio, proveniente de Córdoba Nariño, se demuestra con árbol genealógico, (figura 14) que incluye a hombres y mujeres, de 5 generaciones, entre los 2 y 85 años de edad, identificando a participantes sanos, afectados, portadoras, posibles portadoras y fallecidos por DMD y por otras causas. Se pueden observar que el probando de la generación IV (IV-4), es miembro de la familia, en donde se encontraron 2 de sus hermanos fallecidos (III-2 y IV 2-3), un hermano afectado (IV-5) y con una madre y abuela portadoras (III-3 y II-3). También se encontró un tío muerto y afectado (III-2). Asimismo, se pueden observar un total de 11 mujeres en las diferentes generaciones que podrían llegar a ser portadoras de la alteración que se presentan en el gen de la DMD en esta familia.

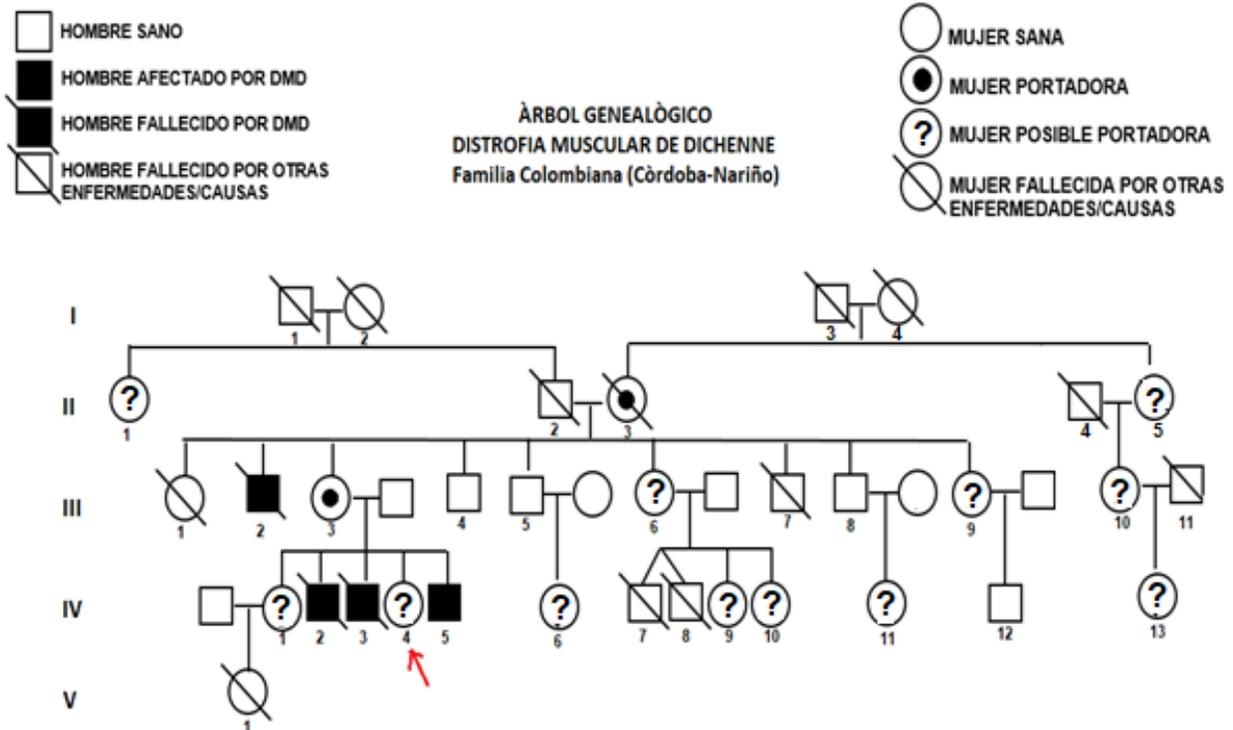


Figura 14. Árbol genealógico de la familia del estudio. La flecha indica el primer paciente que ingresa a consulta genética (Probando)

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Se incluyen a 20 integrantes de la familia quienes firmaron consentimiento informado y aceptaron participar voluntariamente en el estudio. Se tomaron fotografías del músculo gastrocnémio en niño afectado con DMD, con el fin de evaluar las características propias de la enfermedad, que son producidas por el remplazo de tejido fibroso por tejido adiposo, ocasionado hinchazón o inflamación en los músculos (ver figura 15). Además, se tuvo en cuenta la descripción de la genealogía para determinar con claridad los casos con DMD en la familia.



Figura 15. Fotografías del músculo gastrocnémio del niño afectado. Participante (IV-5) de la familia, de siete años de edad quien tiene DMD. Las flechas muestran inflamación del musculo gastrocnémio, debido al tejido suplantado. (Fotografía obtenida y publicada con el consentimiento informado de los padres).

Se hizo una selección de 20 integrantes de la familia para realizar análisis molecular (ver tabla 5), de las 20 muestras obtenidas el 65% (n=13) son mujeres y el 35% (n=7) son hombres. De la generación I, no se hizo selección porque ya habían fallecido, sin embargo, la familia reporta que ninguno de ellos manifestó el fenotipo para DMD. De la generación II, se seleccionó a 2 mujeres posibles portadoras (II-1, II-4), los demás individuos habían fallecido (II-2, II-3, II-5, II-6). De la generación III y IV, se estudian a hombres y mujeres vivos quienes reportaron las siguientes características:

- **III-1**, mujer, murió a los 33 años, causas dolores de cabeza e inflamación de cuerpo completo (No hay diagnostico concreto). No tuvo hijos.
- **III-2**, hombre, fallece en el hospital infantil de la ciudad de Pasto, por “parálisis muscular” años después es diagnosticado en el Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt, en la ciudad de Bogotá con Distrofia Muscular de Duchenne. Fallece a los 15 años por infarto cardiorrespiratorio.
- **III-3**, mujer sana, portadora de la mutación del gen DMD.
 - **IV-1**; mujer sana, posible portadora de DMD (su hija muere al nacer por falta de oxígeno y por mala formación de sus riñones, V-1)
 - **IV-2**; hombre quien recibió 2 operaciones por presentar, Pie equinovaro congénito, es el segundo afectado por DMD diagnosticado en el hospital de Quito-Ecuador. (Muerte a los 25 años por infarto cardiorrespiratorio, característica DMD)
 - **IV-3**; hombre, también es afectado por DMD y es diagnosticado con DMD en el hospital infantil de la ciudad de Pasto. (Muerte a los 23 por infarto cardiorrespiratorio)
 - **IV-4**; Mujer sana, posible portadora de DMD
 - **IV-5**; Niño de 7 años, quien actualmente presenta DMD diagnosticado, en el hospital Departamental de la ciudad de Pasto con diagnóstico genético del laboratorio BIOTECGEN S.A de EEUU
- **III-4**, hombre, actualmente presenta cáncer de tiroides. No tiene hijos.
- **III-5**, hombre sana

- IV-6; sana, posible portadora DMD.
- **III-6**, Mujer posiblemente portadora.
 - IV-7, IV-8; varones gemelos, mueren a los 3 meses de vida, por presentar Raquitismo e hidrocefalia.
 - IV-9; Mujer con Lupus Eritematoso sistémico. Posible portadora DMD
 - IV-10; Mujer Sana. Posible portadora DMD
- **III-7**, Hombre fallecido, muerte accidental
- **III-8**, hombre sano
- - IV-11; sana. Posible portadora DMD
- **III-9**, mujer sana
- IV-12; niño de 11 años sano.

Tabla 10. Caracterización de participantes seleccionados para el estudio.

CÓDIGO		GÉNERO	EDAD	DIAGNÓSTICO	PORTADORA
DMD 45 - 1	(II-1)	F	85	Sin DMD	
DMD 45 - 2	(III-3)	F	55	Sin DMD	+
DMD 45 - 3	(IV-1)	F	31	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 4	(IV-5)	M	7	Afectado DMD	
DMD 45 - 5	(IV-4)	F	23	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 6	*	M	50	Sin DMD	
DMD 45 - 7	*	M	50	Sin DMD	
DMD 45 - 8	(III-6)	F	49	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 9	(IV-9)	F	22	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 10	(IV-10)	F	21	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 11	(III-4)	M	53	Sin DMD	
DMD 45 - 12	(III-8)	M	43	Sin DMD	
DMD 45 - 13	IV-11)	F	13	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 14	(III-9)	F	41	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 15	(IV-12)	M	10	Sin DMD	
DMD 45 - 16	(III-5)	M	51	Sin DMD	
DMD 45 - 17	(IV-6)	F	33	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 18	(II-5)	F	75	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 19	(III-10)	F	6	Sin DMD	Sin datos
DMD 45 - 20	(IV-13)	F	3	Sin DMD	Sin datos

*Esposos de las participantes III-3 y la III-6

De los 20 participantes, el 5% (n=1) participantes de la generación IV presenta Distrofia Muscular De Duchenne, el 60% (n=12) corresponde a las mujeres posibles portadoras DMD (aún sin confirmar genéticamente), el 5% (n=1) participantes mujer de la generación III es portadora y el 30% (n=6) hombres sanos.



Figura 16. Clasificación de los participantes de la familia colombiana.

6.3 CARACTERIZACION MOLECULAR

6.3.1 FASE I: Identificación de delección del exón 45 y 51 del gen DMD, en participantes de la familia por técnica PCR

6.3.1.1 Extracción del material genético

En la tabla número 11, se puede evidenciar que la concentración de ADN está en un rango de (35.5 ng/μl y 123.6 ng/μl), es decir una concentración óptima para su amplificación, también se observa que la relación 260/280 muestra un ADN con una buena pureza de las muestras y la relación 260/230 que nos indica que no se observa contaminación.

Tabla 11: Cuantificación de las muestras de DNA de los participantes.

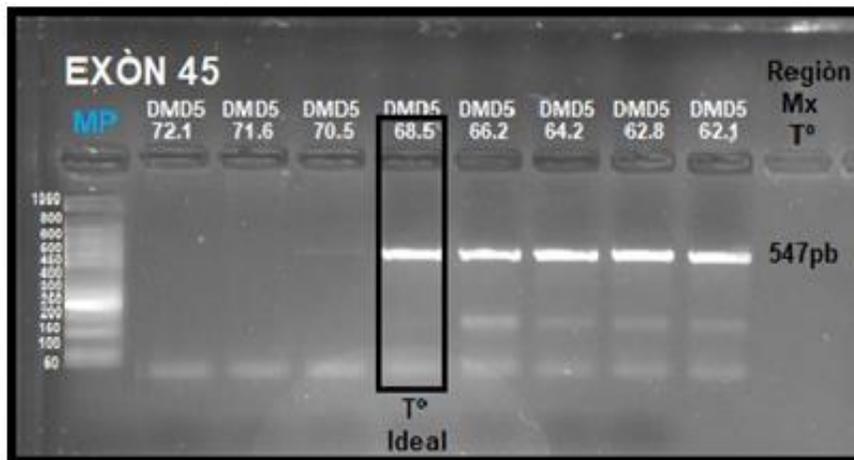
Nº	Simple ID	Date and Time	Nucleic Acid Conc	Unit	A260	A280	260 /280	260 /230	Sample Type
1	DMD 45 - 1	30/04/19	58.8	ng/μl	1.137	0.601	1.89	2.02	DNA
2	DMD 45 - 2	30/04/19	115.3	ng/μl	2.307	1.203	1.92	1.97	DNA
3	DMD 45 - 3	30/04/19	114.9	ng/μl	2.297	1.203	1.91	1.91	DNA
4	DMD 45 - 4	30/04/19	55.2	ng/μl	1.044	0.544	1.92	2.25	DNA
5	DMD 45 - 5	30/04/19	123.6	ng/μl	2.171	1.294	1.91	1.85	DNA
6	DMD 45 - 6	30/04/19	108.7	ng/μl	2.174	1.151	1.89	1.77	DNA
7	DMD 45 - 7	30/04/19	92.5	ng/μl	1.878	1.952	1.91	2.11	DNA
8	DMD 45 - 8	30/04/19	118.3	ng/μl	2.166	1.243	1.90	2.06	DNA
9	DMD 45 - 9	30/04/19	91.6	ng/μl	1.832	0.942	1.94	2.13	DNA
10	DMD 45 - 10	30/04/19	80.6	ng/μl	1.611	0.858	1.88	1.77	DNA
11	DMD 45 - 11	30/04/19	185.8	ng/μl	2.717	1.919	1.94	2.10	DNA
12	DMD 45 - 12	30/04/19	51.6	ng/μl	1.032	0.545	1.90	2.27	DNA
13	DMD 45 - 13	30/04/19	38.7	ng/μl	0.774	0.401	1.93	2.36	DNA
14	DMD 45 - 14	30/04/19	90.1	ng/μl	1.802	0.934	1.93	2.17	DNA
15	DMD 45 - 15	30/04/19	78.3	ng/μl	1.567	0.809	1.94	2.16	DNA
16	DMD 45 - 16	30/04/19	196.9	ng/μl	3.939	2.051	1.92	2.15	DNA
17	DMD 45 - 17	30/04/19	35.5	ng/μl	0.711	0.365	1.95	0.39	DNA
18	DMD 45 - 18	30/04/19	40.0	ng/μl	0.801	0.425	1.89	2.09	DNA
19	DMD 45 - 19	30/04/19	100.8	ng/μl	2.017	1.049	1.92	2.16	DNA
20	DMD 45 - 20	30/04/19	45.3	ng/μl	0.907	0.482	1.88	1.90	DNA

6.3.1.3 Amplificación exones 45 y 51 del gen DMD

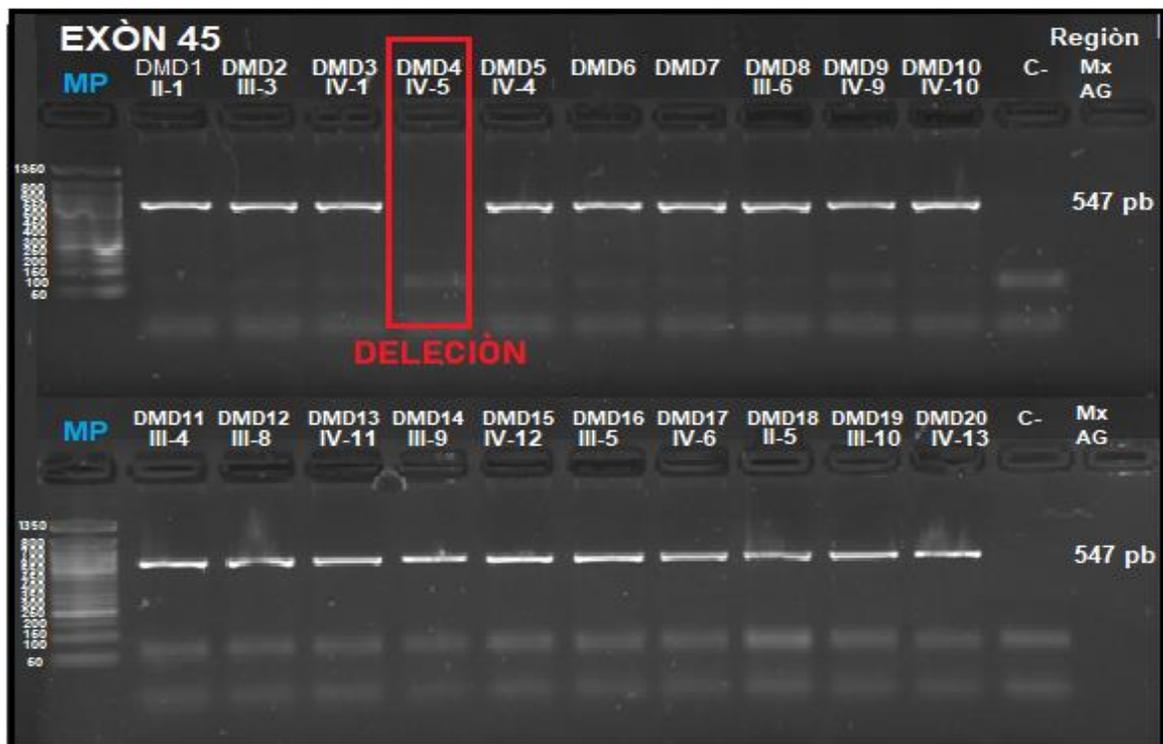
Los productos obtenidos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y fueron teñidos con SYBR® safe para su respectiva visualización bajo el documentador. Se observa el gradiente de temperatura realizado (72.1°C a 62.1°C) para el exón 45, donde se logró un amplificado de 547 pb, obteniéndose una banda de buena calidad a una temperatura de 68.5°C. (Fig. 17-A). En la figura 17- B se observa el amplificado para los 20 individuos analizados en el estudio, encontrando una delección en el paciente DMD4 (IV-5).

En la Fig. 17-C se observar el gradiente de temperatura (70.2°C a 60.1°C), realizado para el exón 51, donde se logró un amplificado de 388 pb, obteniéndose una banda de buena calidad a una temperatura de 64.2°C. En la figura 17- D se observa el amplificado para los 20 individuos analizados en el estudio, encontrando la banda de 388 pb en todos los individuos analizados.

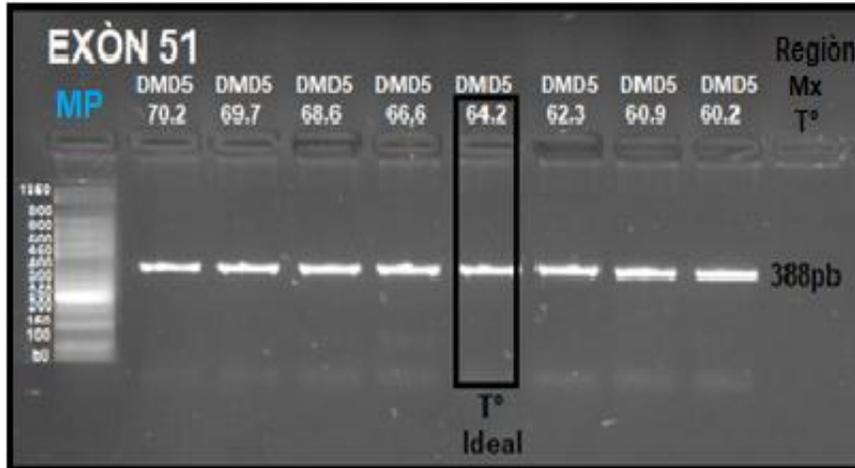
(A)



(B)



(C)



(D)



Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. **A)** Estandarización exón 45 en el carril 5 se evidencia la amplificación bajo condiciones de temperatura óptimas (547pb, Tm 66.1). **B)** Amplificación del exón 45 en muestras de los participantes, en el carril número 1 marcador de peso molecular DNA Ladder, Carril número 4 (DMD4) Identificación y confirmación de la delección en el exón 45 del Gen DMD en uno de los participantes de la familia (IV-5) (ausencia 547 pb), los demás carriles amplificación normal (547pb). **C)** Estandarización exón 51 en el carril 5 se evidencia la amplificación bajo condiciones de temperatura óptimas (388 pb, Tm 64.2). **D)** Amplificación del exón 51 en muestras de los participantes, en el carril número 1 marcador de peso molecular DNA Ladder, No existe mutación en exón 51, en ningún participante, carriles con amplificación normal (388 pb), sin mutación.

Con los resultados obtenidos se confirmó la mutación presente en el exón 45 del individuo que presenta DMD (IV-5) y se descarta una delación relacionada con exón 45 en todos los otros individuos analizados, para el exón 51 se descartó la delección en los 20 individuos analizados.

6.3.2 FASE II: Identificación de portadoras de la delección del exón 45 en el gen DMD por técnica RFLPs

Para la identificación de las portadoras se realizó la técnica de RFLPs utilizando las Enzimas de restricción pERT 87.8 *TaqI* y pERT87.15 *XmnI*.

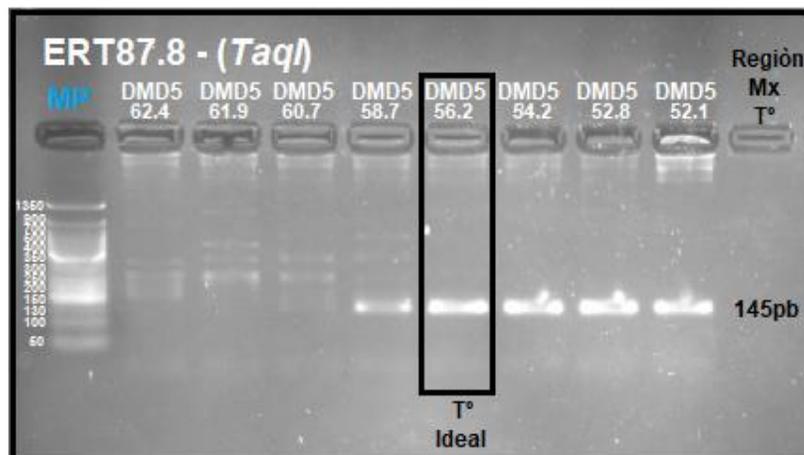
6.3.2.1 Amplificación de la región para pERT87.8 (*TaqI*) y pERT87-15B (*XmnI*)

Los productos obtenidos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y fueron teñidos con SYBR® safe para su respectiva visualización bajo el documentador.

Para la amplificación de ERT87-8- (*TaqI*), se realizó un gradiente de temperatura (62.4°C a 52.1°C), obteniendo una banda óptima de 145 pb a los 56.2°C (fig. 18-A). Al amplificar los 20 participantes se observó que todos presentaron la banda de 145 pb.

Para la amplificación de ERT87-15B (*XmnI*), también se realizó un gradiente de temperatura (61.5°C a 58.3°C) obteniendo una banda óptima de 740 pb a los 59.6 °C (fig. 18-C). Todos los participantes presentaron también la banda de amplificación de 740 pb (Fig 18-D).

A)



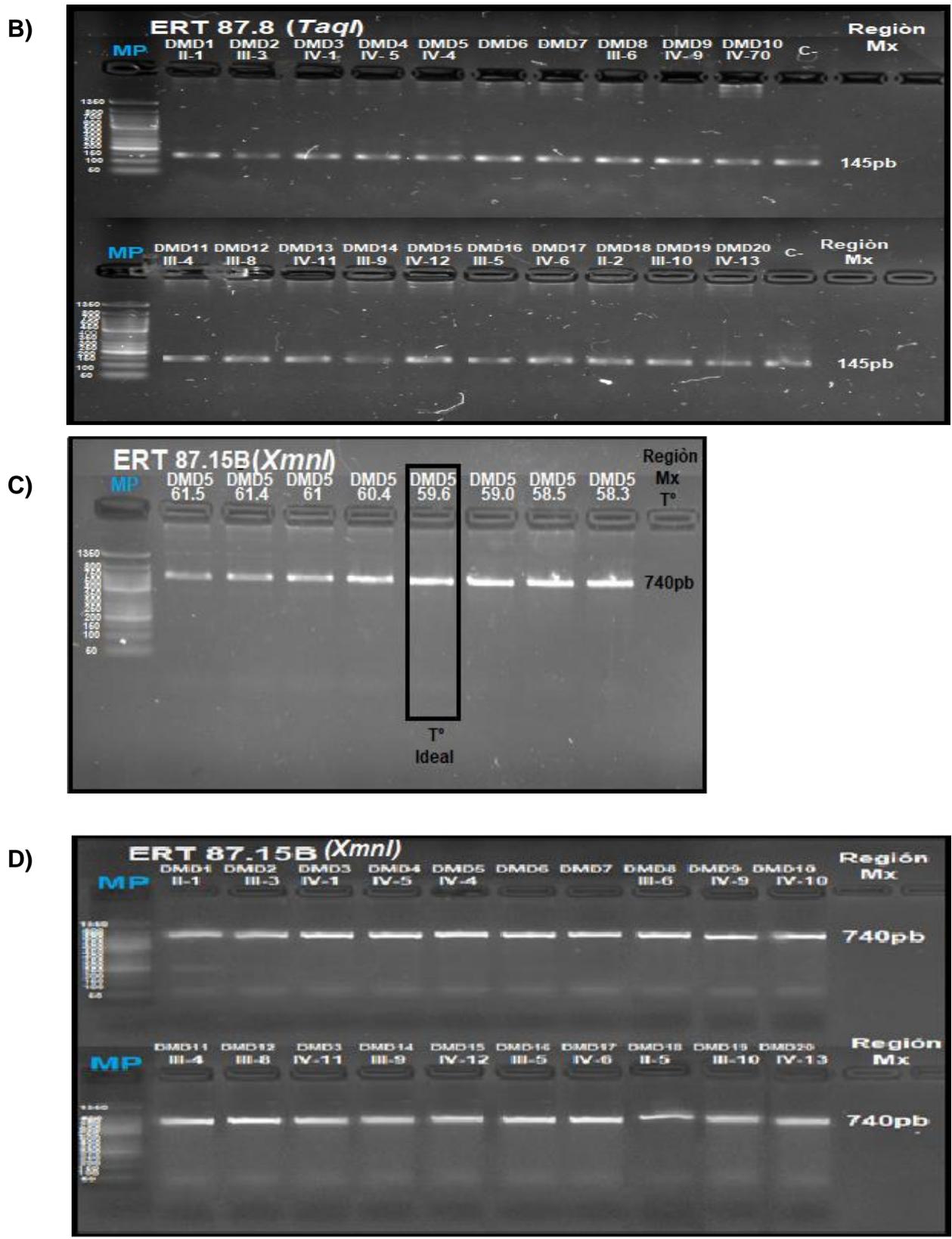


Figura 18. Estandarización y amplificación de la región para ERT87.8 (*TaqI*) y ERT87-15B (*XmnI*). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. A) Estandarización ERT 87.8 (*TaqI*), en el carril 5 se evidencia

la amplificación bajo condiciones de temperatura óptimas (145pb, Tm 56.2). B) Amplificación de ERT 87.8 (*TaqI*), en muestras de los participantes, en el carril número 1 marcador de peso molecular DNA Ladder, con amplificación normal (145pb) en los demás carriles. C) estandarización ERT 87.15B (*XmnI*) en el carril 5 se evidencia la amplificación bajo condiciones de temperatura óptimas (740pb, Tm 59.6). D) Amplificación ERT 87.15B (*XmnI*) en muestras de los participantes, en el carril número 1 marcador de peso molecular DNA Ladder, con amplificación normal (740pb) en los demás carriles.

6.3.2.2 Digestión DNA con enzimas de restricción

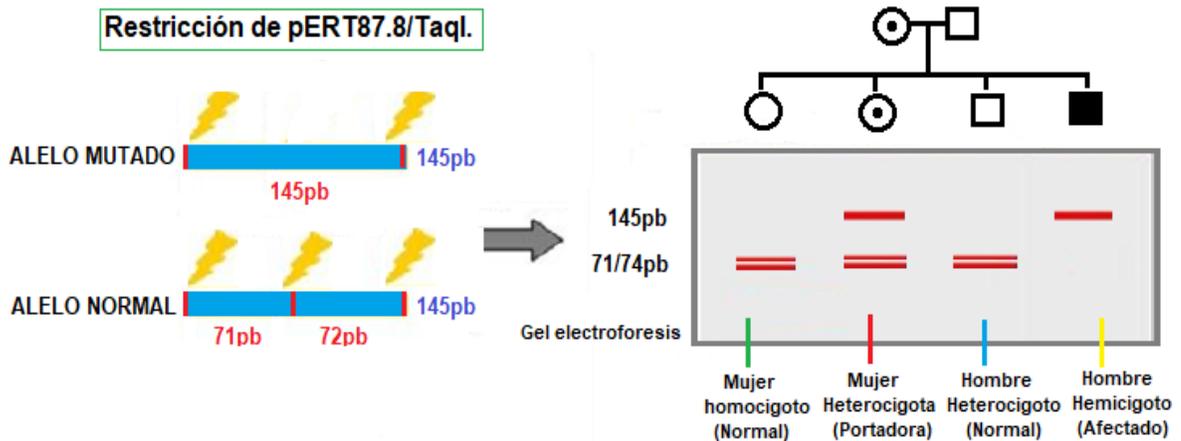
Los amplificados de 20 participantes de la familia, fueron sometidos a análisis de los dos marcadores polimórficos intragénicos del gen DMD: ERT 87.8 (*TaqI*) y ERT 87.15B (*XmnI*). El análisis se hizo por PCR con posterior restricción con la endonucleasas respectiva *TaqI* y *XmnI*.

Para la enzima de restricción *TaqI*, una persona normal presenta el sitio de restricción, por lo que se puede observar un corte que produce dos bandas de aproximadamente 71 y 74 pb, cuando existe una mutación se pierde este sitio de restricción y se observa una sola banda de 145 pb sin digerir, por lo cual el individuo está afectado y es homocigoto (individuo IV-5). Como se puede observar en el gel el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, los carril 2,8,14 y 15 corresponden a mujeres homocigotas que presentan una sola banda digerida de aproximadamente entre 71-74 pb (Normal), los carriles 3,4,6,9,11,12,17,18,19 a mujeres heterocigotas (que presentan las dos bandas, una de 145 pb y otra de 72 pb) portadoras. En el carril 7 se observa un hombre hemicigoto con una banda de 145 pb (Afectado) y los carriles 5,10,13,16 a hombres homocigotos con la presencia de una banda de aproximadamente 72 pb (Normales). En el anexo 6 se pueden observar los dos últimos pacientes normales (No III-4 y III-6) que presentan los cortes de la enzima *Taq I*.

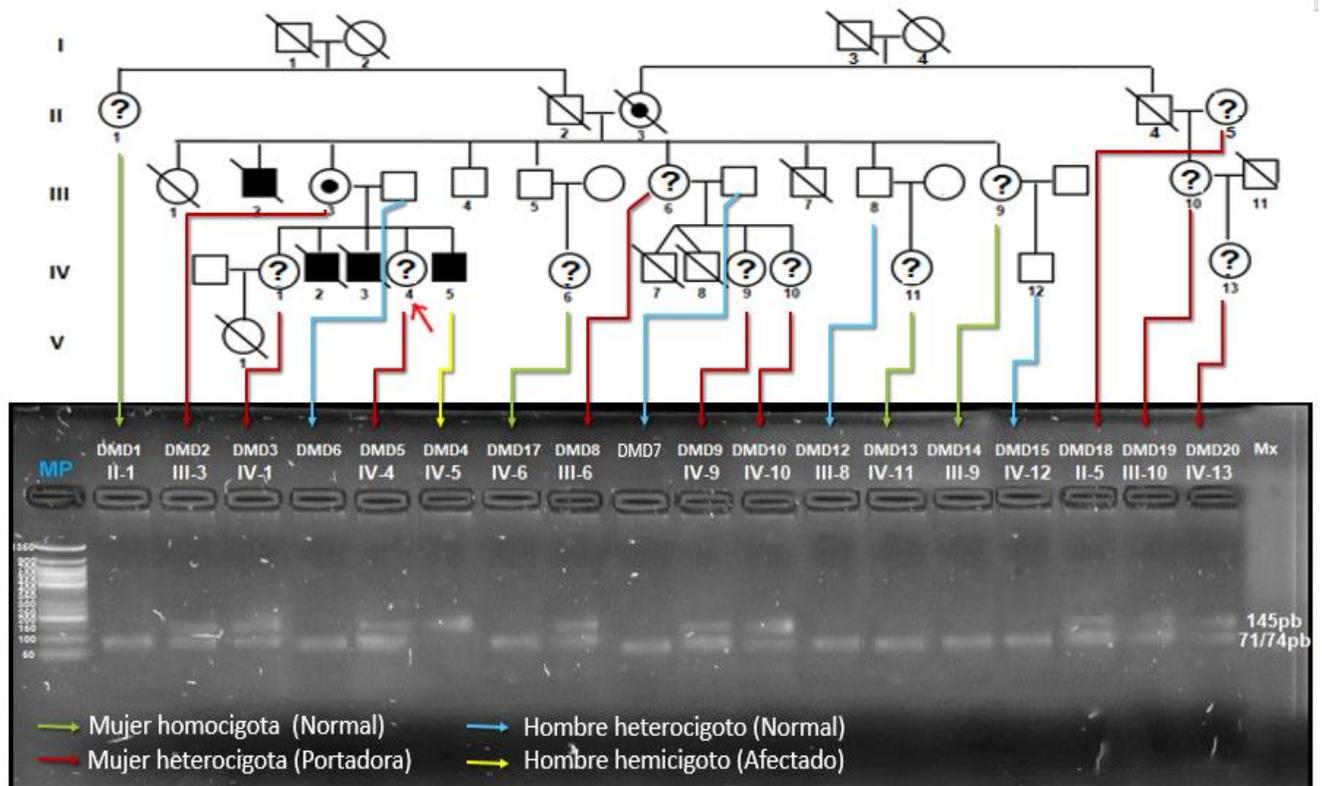
Para actividad de la enzima de restricción de pERT87.15B *XmnI*, las personas normales presentan el sitio de restricción, pudiéndose observar un corte que produce dos bandas una de 220 y otra de 550 pb, cuando existe una mutación se pierde este sitio de restricción y se observa sola banda de 740 pb sin digerir. Se puede observar en el carril 1 marcador de peso molecular, en los carriles 2,8,14,15 corresponden a mujeres homocigotas (Normal), los carriles 3, 4, 6, 9, 11, 12, 17,18,19 a mujeres heterocigotas

(portadoras), el carril 7 hombre hemicigoto (Afectado) y los carriles carril 5 ,10, 13 y 16 hombres heterocigotos (Normal). En el anexo 6 se pueden observar los dos últimos pacientes normales (No III-4 y III-6) que presentan los cortes de la enzima *XmnI*.

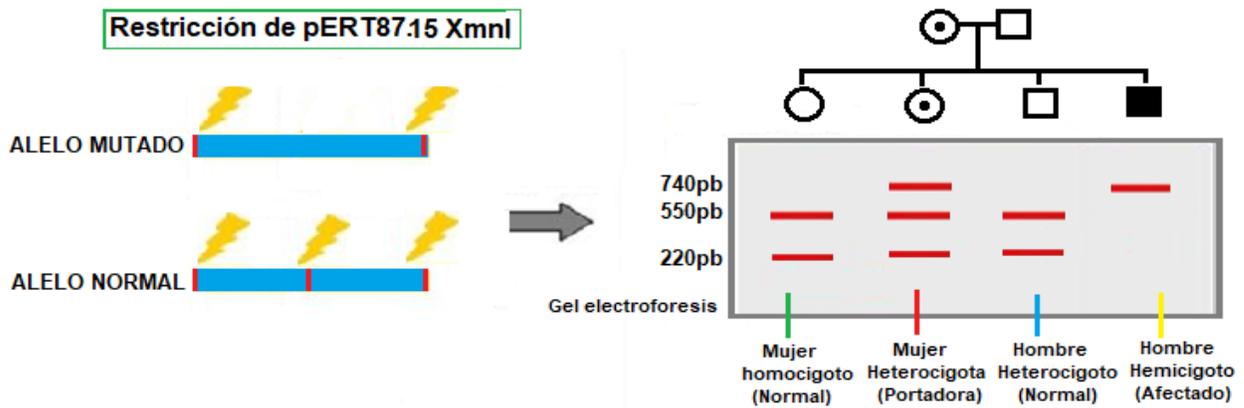
(A)



(B)



(C)



(D)

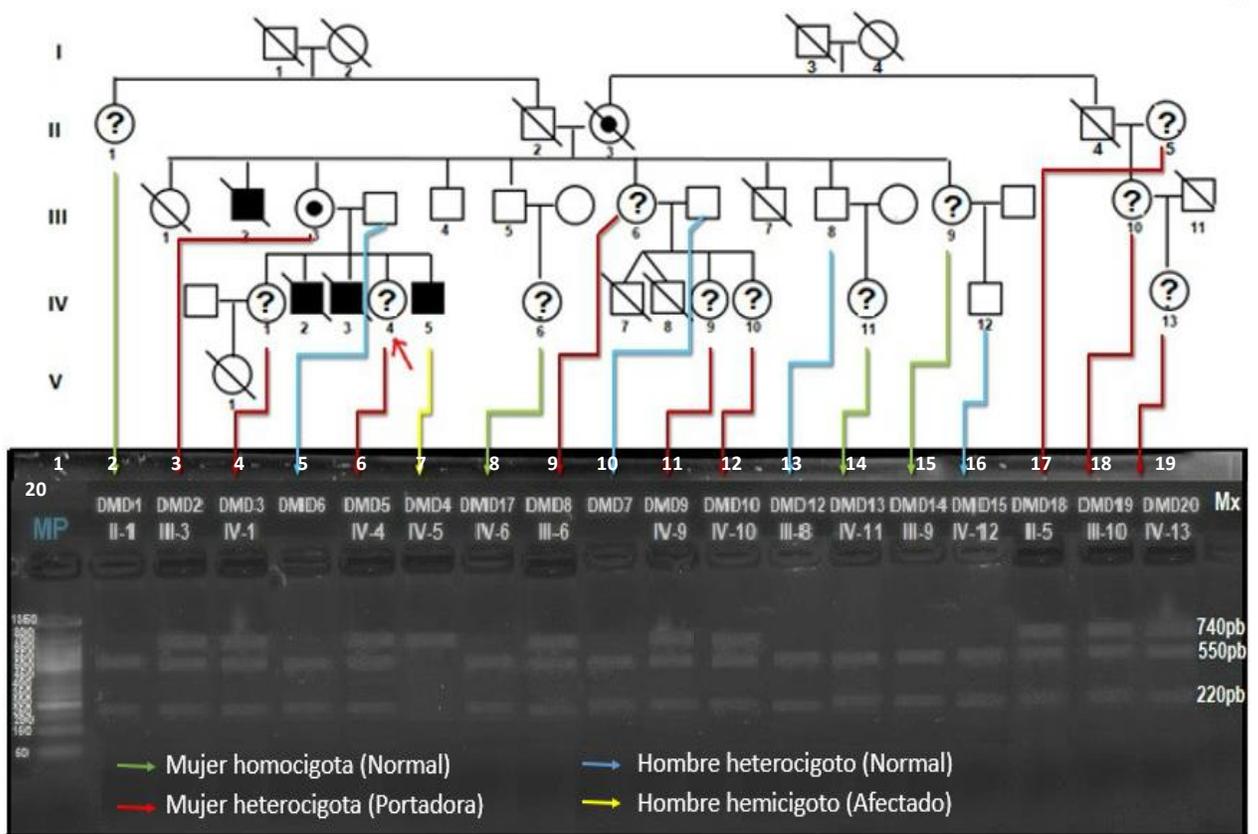


Figura 19: clasificación de la mutación presente en los participantes de la familia. **(A)** Actividad Restricción de pERT87.8/TaqI **(B)** Restricción de pERT87.8/TaqI en muestras de pacientes. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2,8, 14 y 15 mujeres homocigotas (Normal), carril 3,4,6,9,11,12,17,18,19 mujeres heterocigotas (portadoras), carril 7 hombre hemicigoto (Afectado) carril 4,9,12,15 hombres heterocigotos (Normal) . **(C)** Actividad Restricción de pERT87.15B XmnI. **(D)** Restricción de pERT87.8/TaqI en muestras de pacientes. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2,7,13 y 14 mujeres homocigotas (Normal), carril 3,4,6,9,11,12,17,18,19 mujeres heterocigotas (portadoras), carril 7 hombre hemicigoto (Afectado) carril 5,10,13,16 hombres heterocigotos (Normal)

Tabla 12. Clasificación portadora DMD de la familia

CÓDIGO		GÉNERO	EDAD	CLASIFICACION
DMD 45 – 2	(II-1)	F	85	No portadora
DMD 45 – 3	(III-3)	F	55	Portadora
DMD 45 – 4	(IV-1)	F	31	Portadora
DMD 45 - 6	(IV-4)	F	23	Portadora
DMD 45 - 9	(III-6)	F	49	Portadora
DMD 45 - 11	(IV-9)	F	22	Portadora
DMD 45 - 12	(IV-10)	F	21	Portadora
DMD 45 - 8	IV-11)	F	13	No portadora
DMD 45 - 14	(III-9)	F	41	No portadora
DMD 45 - 15	(IV-6)	F	33	No portadora
DMD 45 - 17	(II-5)	F	75	Portadora
DMD 45 - 18	(III-10)	F	6	Portadora
DMD 45 - 19	(IV-13)	F	3	Portadora

6.3.2.5 Índice de heterocigidad y homocigidad en participantes.

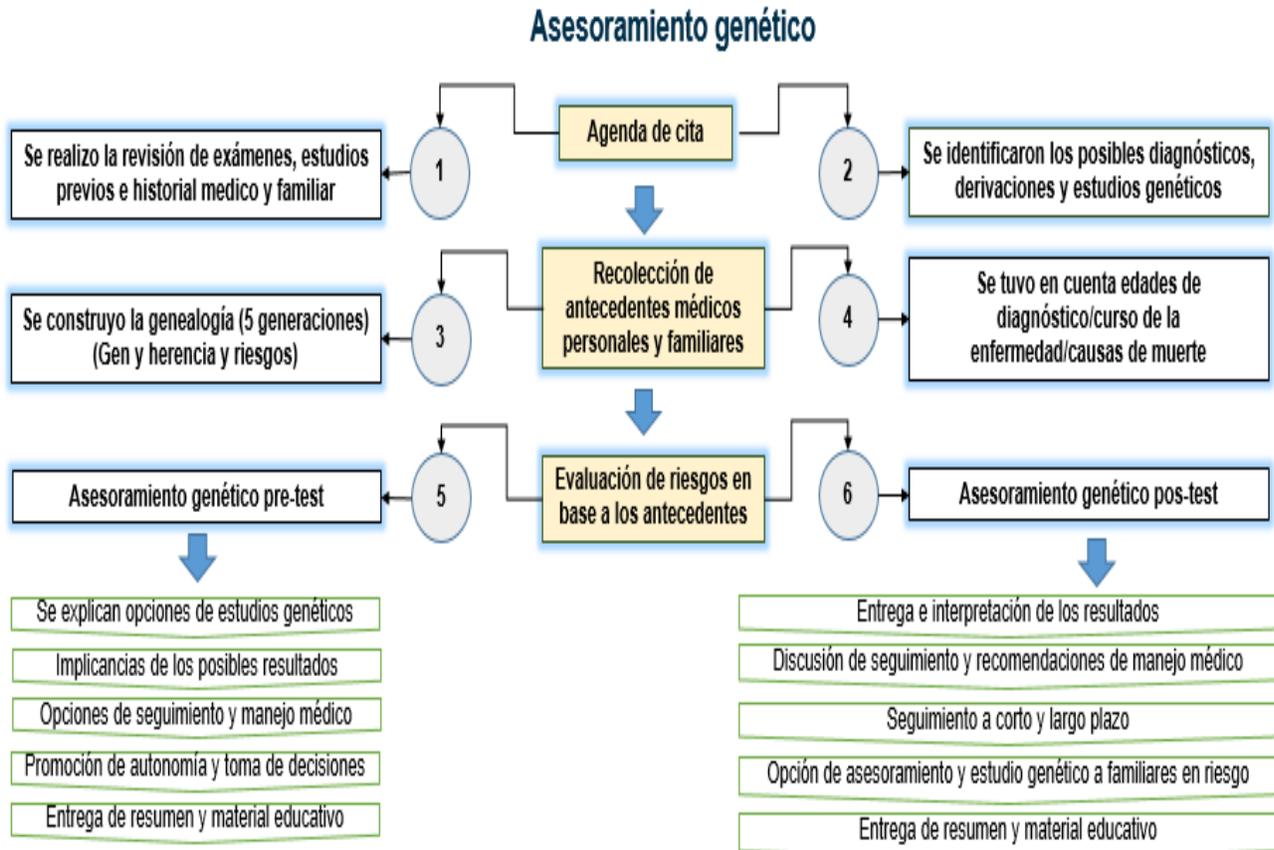
Para el marcador pERT87.8/TaqI y PERT87.15/XmnI en los 20 participantes, se encontró un índice del 5% (n=1) hombre hemicigoto (Afectado), el 45% (n=9) corresponde a las mujeres heterocigotas (portadoras) el 20% (n=4) mujeres homocigotas (Normales) y el 30% (n=6) hombres heterocigotos (Normales). Siendo estos marcadores los más informativos para detección de portadoras de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker.



Figura 20: Clasificación genotípica por RFLPs

6.4 DESARROLLO DE CONSEJERIA GENETICA

Las etapas de la consejería genética se pueden observar en el protocolo que se siguió con la familia estudiada. (Figura 20).



RESULTADOS

Una vez identificada la variante o mutación que desencadena Distrofia muscular de Duchenne en la familia de Córdoba-Nariño, se tendrá en cuenta

BENEFICIOS

- Intervención Precoz
- Identificación de familiares de riesgo
- Reduce la incertidumbre
- Prevenir embarazos de alto riesgo
- Clarificación por medio de investigaciones en el futuro
- Reforzar el comportamiento de participantes
- Se aplica directamente un tratamiento pre gestacion

RIESGOS

- Impacto psicosocial (Dinámica Familiar)
- Incertidumbre
- Discriminación
- Incertidumbre
- Falsa seguridad
- Mala adherencia a las medidas preventivas
- Ansiedad y Frustración

Figura 21: Algoritmo asesoramiento genético Fuente: Elaboración propia

7. DISCUSIÓN

Distrofia muscular de Duchenne y distrofia muscular de Becker, son enfermedades de tipo neuromuscular, catalogadas a nivel mundial como huérfanas, dado que la población afectada es mínima, presentándose con mayor frecuencia en varones, teniendo un patrón de herencia ligado al cromosoma X (16). Hasta el momento no tienen cura, pero si cuentan con posibles tratamientos que han dado resultados favorables en algunos pacientes (1). Con respecto a los métodos diagnósticos, tanto para hombres como para mujeres portadoras, han sido confiables, pero de muy alto costo, lo que ha llevado a que poblaciones vulnerables no tengan acceso a estos, no cuenten con asesoramiento genético y sigan transmitiendo la mutación a nuevas generaciones. Para poder identificarlas a tiempo, es primordial tener claro el fenotipo que incluye signos y síntomas característicos de la enfermedad para su posterior diagnóstico final.

Hasta el momento según Chamberlain Js, et al (14), la técnica PCR multiplex, es una de las pruebas analíticas sensibles y precisas para la detección de mutaciones, principalmente deleciones, siendo las más frecuentes, resulta ser fácil y confiable y el tiempo para obtener los resultados es mínimo, lo que facilita el diagnóstico prenatal o postnatal de DMD / DMB. Por otro lado, Gonzales N, *et al.* (28), confirmo que la técnica PCR multiplex es una herramienta que puede detectar cerca del 98% de las deleciones, de forma rápida y confiable, y además permite el asesoramiento apropiado a los pacientes, que, en conjunto con los estudios clínicos, bioquímicos y electromiográficos es suficiente para establecer un diagnóstico específico; sin embargo, es importante aclarar que esta técnica tiene ciertas limitaciones ya que no puede ser utilizada para la detección de portadoras de DMD/B, dado a que estas son heterocigotas y al momento de interpretar los resultados, así porten la mutación, el gen X normal será el identificado en los ensayos. Por esta razón es necesario realizar otro tipo de estudios y técnicas moleculares complementarias que ayuden a ofrecer un diagnóstico completo a las familias afectadas (28).

Con respecto a las técnicas alternativas para la identificación de portadoras Fonseca D, *et al.* (16), aclara que el estado de una portadora de deleciones se puede abordar por diferentes estrategias que tratan de obviar el problema metodológico que genera la presencia de una copia normal del gen de la distrofina, por este motivo otros autores afirman que la técnica Hibridación Fluorescente In situ (FISH), mediante sondas específicas que señalan la presencia o ausencia de uno o varios exones sobre el cromosoma X, ayuda al diagnóstico, pero sólo es útil cuando el paciente afectado presenta una deleción confirmada, de lo contrario los resultados serían falsos positivos, dado que es una técnica poco informativa y así mismo poco sensible y específica (44).

Además, cabe aclarar que, debido a los altos costos de las técnicas mencionadas, una buena opción de diagnóstico es realizar la identificación de mutación mediante RFLPs para identificación de portadora, siendo una técnica que por su complejidad es poco usada, pero sirve como principal opción en cuanto a valor económico.

En este trabajo se realizó el análisis de una mutación, en el exón 45 y 51 del gen DMD, en una familia colombiana proveniente de Córdoba Nariño, conformada por 42 integrantes de los cuales se escogió a 20 de estos, para posterior genotipificación. Con ayuda del árbol genealógico y teniendo en cuenta el fenotipo, se logró identificar a un integrante varón, de 7 años de la familia, quien actualmente presenta la enfermedad y así mismo se logra clasificar a las portadoras de la mutación en el gen, como diagnóstico parcial, estableciendo que Distrofia Muscular de Duchenne, en este caso, presenta un patrón de herencia Mendeliano; autosómico recesivo, ligado al cromosoma X, ya que con el tiempo se han ido presentando casos en las generaciones II, III, IV, siendo las mujeres portadoras y los hombres los afectados.

El gen DMD, es considerado como uno de los más grandes del genoma humano, ya que aproximadamente el 99% son intrones y el 1% restante corresponde a 79 exones, incluyendo siete promotores que codifican para siete isoformas de la proteína distrofina (9).

Teniendo en cuenta lo anterior, para el desarrollo de este estudio se decidió hacer el análisis de dos de los exones del gen, ya que, por su gran tamaño y complejidad, se dificultó estudiarlo completo. Para este caso se realizó el análisis del exón 51, siendo este el exón más reportado, involucrado en familias colombianas con fenotipo para DMD/B (9), además, está ubicado en un *hot spot* del gen, lo que lo hace susceptible a presentar deleciones principalmente. Por otra parte, se hizo el análisis del exón 45, porque ya se tenía información de análisis genético, en el cual los resultados informan una deleción completa en este exón en uno de los participantes afectado por DMD, cabe aclarar que este exón también hace parte de los puntos *hot spot* en el gen y se asocia con el desarrollo de la enfermedad en diferentes estudios (9,12,46,51)

El análisis para la identificación de la mutación en el exón 45 y 51, del gen DMD, observado en este estudio, se realizó mediante la amplificación por la técnica PCR convencional (*polymerase chain reaction*), en el cual se descartan mutaciones en el exón 51, ya que los productos en la electroforesis mostraron resultados normales equivalentes a 388 pb, contrario a la amplificación en el exón 45, aquí los productos en la electroforesis, muestran una deleción completa (547pb) en este exón, confirmada por secuenciación, en uno de la participantes. Como se había mencionado la técnica PCR, hasta el momento es muy sensible y útil para identificar mutaciones, que se producen en el gen DMD, pero para identificar el tipo de mutación se debe confirmar por secuenciación, como lo reportó Chamberlain JS *et al.*

Para este estudio se descarta la identificación de las portadoras por la técnica PCR, ya que al ser una deleción completa del exón y siendo estas heterocigotas, es decir un alelo presentará el exón 45 y el otro no, la secuencia mostrada siempre será la del alelo normal, ya que en su cariotipo presentan dos cromosomas X, que corresponden a cada alelo, contrario a los hombres que son hemicígotos afectados que, al presentar una mutación tan grande en este exón, en su cromosoma X, en los resultados de secuenciación se evidenciará ausencia total de ácidos nucleicos para esta región.

Dicho lo anterior, el análisis genético, para la identificación de las portadoras en este caso, se realizó RFLPs (*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*) técnica que usa enzimas de restricción, como ERT87.8 (*TaqI*) y ERT87.15B (*XmnI*). Aquí se logró establecer el estado de las portadoras de la familia, siendo el 69% (n=9) portadoras y el 31% (n=4) no portadoras, para un total de 13 mujeres analizadas. Como en estudios previos hechos en la población colombiana de enfermos con DMD, se determinó una baja proporción de deleciones, el análisis indirecto responde a la necesidad de identificar portadoras en familias, mediante alelos mutados con riesgo a la enfermedad, estos resultados son similares a los encontrados por Todd C, *et al.* en su trabajo de maestría titulado “Análisis de tres polimorfismos del Gen DMD/DMB en familias mexicanas” en el año 2004.

Esto permitió la asesoría acerca de los riesgos de tener hijos afectados o hijas portadoras e indicar estrategias reproductivas alternas, que constituyen la única forma de prevenir esta enfermedad altamente incapacitante y sin tratamiento conocido

8. CONCLUSIONES

1. Se logró evidenciar por medio de genealogía, la presencia de 3 casos para DMD (Fallecidos) y 1 caso actual de un participante de 7 años quien presenta fenotipo para Distrofia Muscular de Duchenne.
2. Se identificó la presencia de la deleción total del exón 45 (587pb) del gen DMD en uno de los participantes que desencadena el fenotipo de distrofia muscular de Duchenne en la familia colombiana del municipio de Córdoba-Nariño.
3. Se clasifico e identifico a las portadoras de la mutación en el exón 45, se hizo el análisis de las mujeres de la familia, para determinar por alelos la presencia o no de la mutación en sus 2 alelos, usando la técnica indirecta RFLPs (*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*) que permitió hacer la clasificación homocigota y heterocigota de las mujeres en la familia, siendo el 45% (n=9) el porcentaje

correspondiente a las mujeres heterocigotas (portadoras) el 20% (n=4) mujeres homocigotas (Normales).

4. Se ha iniciado el asesoramiento genético por parte de profesionales del Instituto de Genética de la universidad Nacional de Colombia, especializados en enfermedades genéticas y de alta complejidad como Distrofia muscular de Duchenne, entre otras.

9. RECOMENCACIONES

Es necesario ampliar la caracterización de la familia del estudio, buscando quienes son los portadores de la mutación, así mismo buscar relación con patologías alternas, que pueden ser producto de la enfermedad.

Teniendo los desarrollos en técnicas de secuenciación, particularmente estudios de microsatélites, sería deseable implementar estas tecnologías en futuros estudios

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pamela S, Fresia S. Duchenne muscular dystrophy: Incidence, prevalence, sociodemographic and clinical characteristics of patients admitted to Telethon Chile from 1993 to 2013 [Internet]. Rehabilitacionintegral.cl. 2015 [cited 14 January 2019]. Available from: https://www.rehabilitacionintegral.cl/wp-content/files_mf/4artoriginal24.pdf
2. Silva C, Fonseca D, Mateus H, Contreras N, Restrepo C. Duchenne and Becker's muscle dystrophy: A molecular vision [Internet]. Scielo.org.co. 2015 [cited 10 January 2019]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482005000300005
3. Marui F, Bianco H, Bombig M, Palmeira N, Thalenberg J, Povoá F et al. Behavior of Blood Pressure Variables in Children and Adolescents with Duchenne Muscular Dystrophy [Internet]. Scielo.org.co. 2018 [cited 24 January 2019]; 110(6):83-90 Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2018000600551&lng=en&tlng=en
4. Ferreira P, Dias A, Rocha L, Santos A, Oliveira M, Gaiad T. Low Intensity Training Provokes Adaptations on Muscle Fibrosis of a Muscular Dystrophy Model [Internet]. Scielo.org.co. 2018 [cited 24 January 2019]. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022018000200471&lng=en&tlng=en
5. Guerra M, Sumare F, García R, Ayala P. Distrofia Muscular de Duchenne/Becker [Internet]. Revistapediatria.emnuvens.com.br. 2018 [cited 23 January 2019]. Available from: <https://revistapediatria.emnuvens.com.br/rp/article/view/112/87>
6. Wein N, Alfano L, Flanigan K. Genetics and Emerging Treatments for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy [Internet]. Sciencedirect.com. 2015 [cited 25 January 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031395515000280?via%3Dihub>
7. Resolución número 005265 de 2018 [Internet]. Minsalud.gov.co. 2018 [cited 30 January 2019]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-5265-de-2018.pdf>
8. Emery A, Emery M. Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy [Internet]. Jmg.bmj.com. 1893 [cited 2 February 2019]. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/jmedgenet/30/6/506.full.pdf>
9. Eslava A. Registro de pacientes con distrofinopatías en Colombia [Maestría]. Universidad Del Rosario; 2016.
10. Fernández J, Aziz J, Camacho J. Guillaume Benjamín Amand Duchenne (1806-1871) "El padre de la electrofisiología" [Internet]. Medigraphic.com. 2006 [cited 6 February 2019]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/ortope/or-2006/or066l.pdf>
11. Herrera O, Ramírez C, Infante J, Lavastida H. Diagnóstico y tratamiento de las miotonías congénitas menos frecuentes [Internet]. Scielo.sld.cu. 2019 [cited 7 February 2019]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552012000200013
<https://medicina.ufm.edu/eponimo/distrofia-muscular-de-becker/>

12. Chaustre D, Chona W. Distrofia muscular de duchenne. Perspectivas desde la rehabilitación [Internet]. Scielo.org.co. 2011 [cited 7 February 2019]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v19n1/v19n1a05.pdf>
13. Chaustre D, Chona W. Duchenne muscular dystrophy: perspectives from the rehabilitation [Internet]. Scielo.org.co. 2011 [cited 7 February 2019]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-52562011000100005
14. Chamberlain J, Chamberlain J, Bech-Hansen N, Fenwick R, Ward P, Caskey C et al. Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multicenter study. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2003 [cited 6 January 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1573747>
15. España D. Historia de Duchenne - Duchenne Parent Project España [Internet]. Duchenne Parent Project España. 2011 [cited 8 February 2019]. Available from: <https://www.duchenne-spain.org/historia-de-duchenne/>
16. Fonseca D, Silva C, Mateus H, Restrepo C. Identificación de deleciones en portadoras de distrofia muscular de Duchenne [Internet]. Scielo.org.co. 2017 [cited 7 February 2019]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v33n2/v33n2a4.pdf>
17. Vieitez I, Gallano P, González L, Borrego S, Marcos I, Millán M et al. Espectro mutacional de la distrofia muscular de Duchenne en España: estudio de 284 casos [Internet]. Elsevier. 2017 [cited 9 February 2019]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-articulo-espectro-mutacional-distrofia-muscular-duchenne-S0213485316000219>
18. Almeida De Silva H, Hiray M, Vainzof M, Schmidt B, Souza A, Gómez J. Atypical reaction to anesthesia in Duchenne/Becker muscular dystrophy Reação atípica à anestesia em distrofia muscular de Duchenne/Becker [Internet]. Sciencedirect.com. 2018 [cited 8 February 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0104001417300611?via%3Dihub>
19. Fujishita S, Shibuya N, Niikawa N, Nagataki S. Gene-deletion and carrier detections, and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy by analysis of the dystrophin gene amplified by polymer... - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2012 [cited 9 February 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1811098>
20. Martínez P, Molano J. Genética molecular aplicada al diagnóstico de enfermedades hereditarias [Internet]. Seqc.es. 2014 [cited 8 February 2019]. Available from: <http://www.seqc.es/download/tema/5/2960/1324859678/2275155/cms/tema-8-distrofias-musculares.pdf/>
21. Rojas M. Distrofias musculares [Internet]. Sciencedirect.com. 2019 [cited 16 May 2019]. Available from: <https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541219300885>
22. Tipos de distrofia muscular [Internet]. El Instituto Nacional de la Salud Infantil y Desarrollo Humano Eunice Kennedy Shriver. 2017 [cited 9 February 2019]. Available from: <https://www1.nichd.nih.gov/espanol/salud/temas/musculardys/informacion/Pages/tipos.aspx>

23. Baumgartner M, Argüello D. Distrofia muscular de duchenne (Revisión Bibliográfica) [Internet]. Medigraphic.com. 2010 [cited 9 March 2019]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2008/rmc085b.pdf>
24. Martínez F, Cuesta A, Garcia J, Gonzales P, Pedrola L, Reyes A et al. Enfermedades neurológicas hereditarias: Genes, mutaciones, clínica y epidemiología genética [Internet]. Sid.usal.es. 2005 [cited 18 February 2019]. Available from: <http://sid.usal.es/idocs/F8/FDO9273/neurologicas.pdf>
25. Distrofia muscular - Síntomas y causas - Mayo Clinic [Internet]. Mayoclinic.org. 2019 [cited 21 February 2019]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/muscular-dystrophy/symptoms-causes/syc-20375388>
26. Rivas R. Distrofinopatías [Maestría]. Universidad Autónoma De México; 2015.
27. Praud J, Redding G. Duchenne Muscular Dystrophy - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. Sciencedirect.com. 2019 [cited 24 February 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/duchenne-muscular-dystrophy>
28. Gonzales N, Hernandez E, Arenas M, Escobar R, Miranda A, Leyva N. Identificación de deleciones en el gen DMD mediante PCR múltiple en pacientes mexicanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker [Internet]. Medigraphic.com. 2005 [cited 25 February 2019]. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2004/hg044d.pdf>
29. Zurita P, Fare R, Lia C, Perez R, Taberno C, Hernandez A. Pseudohipertrofia gemelar [Internet]. Reumatologiaclinica.org. 2017 [cited 25 April 2019]. Available from: <https://www.reumatologiaclinica.org/es-pseudohipertrofia-gemelar-articulo-S1699258X16000449>
30. Genetics Home Reference. Duchenne and Becker muscular dystrophy [Internet]. Genetics Home Reference. 2019 [cited 25 July 2019]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/duchenne-and-becker-muscular-dystrophy#inheritance>
31. Cómo se hereda la distrofia muscular de Duchenne o de Becker | Distrofia muscular (Muscular Dystrophy) | NCBDDD | CDC [Internet]. Cdc.gov. 2019 [cited 25 July 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/musculardystrophy/inheritance.html>
32. Garcia S. Identificación mediante MLPA de las deleciones y duplicaciones de la distrofia muscular de Duchenne en varones afectados y mujeres portadoras pertenecientes a la población andaluza [Doctorado]. Universidad De Granada; 2019.
33. Genetics Home Reference. DMD gene [Internet]. Genetics Home Reference. 2019 [cited 15 May 2019]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/DMD#normalfunction>
34. Rojas D, Narvaja M, Rivas L, Guevara-Fujita M, Castañeda C, Fujita R. Implementación de la Prueba del Multiplex PCR para el Gen DMD en Pacientes con sospecha de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker y la identificación de una deleción de los exones 48-51 [Internet]. Horizontemedicina.usmp.edu.pe. 2014 [cited 24 May 2019]. Available from: <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/125/123>
35. Aartsma A, Ginjaar I, Bushby K. La importancia del diagnóstico genético para la distrofia muscular de Duchenne [Internet]. ncbi.nlm.nih.gov. 2016 [cited 16 June 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789806/>

36. Rumeur E. La distrofina y las dos enfermedades genéticas relacionadas, las distrofias musculares de Duchenne y Becker [Internet]. .ncbi.nlm.nih.gov. 2015 [cited 29 May 2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594321/>
37. Coral R, Salamanca F. Biología molecular de la distrofia muscular de Duchenne [Internet]. Anmm.org.mx. 2014 [cited 25 March 2019]. Available from: http://anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1996-132-2-221-222.pdf
38. Distrofina [Internet]. 2019 [cited 25 April 2019]. Available from: <https://image.slidesharecdn.com/distrofiamusculardeduchenne-130704104242-phpapp02/95/distrofia-muscular-de-duchenne-9-638.jpg?cb=1372934943>
39. Deisch J. Dystrophin - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. Sciencedirect.com. 2017 [cited 16 July 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/dystrophin>
40. Zurita P, Fare R, Lia C, Perez R, Tabernero C, Hernandez A. Pseudohipertrofia gemelar. Reumatologia clinica [Internet]. 2017 [cited 15 June 2019];:175-175. Available from: <https://www.reumatologiaclinica.org/es-pseudohipertrofia-gemelar-articulo-S1699258X16000449>
41. Bati V. Polymerase Chain Reaction: Innovation that Revolutionized Molecular Biology [Internet]. Long Road to Innovation. 2018 [cited 15 September 2019]. Available from: <https://longroadtoinnovation.wordpress.com/2018/11/01/polymerase-chain-reaction-innovation-that-revolutionized-molecular-biology/>
42. Manual de toma, preparación, embalaje, transporte y remisión de muestras en laboratorio clínico. [Internet]. 2015 [cited 2 February 2019];(Versión 3):1-18. Available from: http://www.esemeta.gov.co/archivoscargados/F_2016-02-02_H_3_08_39_PM_U_1_mn-lab-01_toma-preparacion-embalajetransporte_y_remision_de_muestras_en_laboratorio.pdf
43. Las enzimas de restricción y el ADN ligasa [Internet]. Khan Academy. 2015 [cited 15 May 2019]. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>
44. 5. Bushby K, Finkel R, Birnkrant D, Case L, Clemens P, Cripe L et al. Diagnóstico y manejo de la distrofia muscular Duchenne, parte 1: diagnosis, y manejo farmacológico y psicosocial. Treat-nmd.eu. 2010
45. Peña J, Ramirez O, Barrera B. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas [Internet]. sciencedirect. 2013 [cited 19 August 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X13724686>
46. Bidinost C, Martinez H, Rosa A, Pagnoni S. nuevas herramientas de diagnóstico la biología molecular en enfermedades neuromusculares [Internet]. sciencedirect. 2018 [cited 14 August 2019]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864018301056>

47. Khaitan T, Sinha R, Sarkar S, Dutta S. Duchenne muscular dystrophy: Case report and review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2017;6(3):654. [cited 14 August 2019] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5787973/>
48. Ihawary N, Jiffri E, Jambi S, Mufti A, Dannoun A, Kordi H et al. Molecular characterization of exonic rearrangements and frame shifts in the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients in a Saudi community. *Human Genomics*. 2018;12(1). [cited 14 August 2019] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5891934/>
49. Vijai V; Steven P. Duchenne Muscular Dystrophy [Internet]. February 10, 2018. [[cited 30 August 2019]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482346/
50. M.Cantillo; A. Camacho; J.Vilchez et al. Consensus on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with Duchenne muscular dystrophy [Internet]. September 2019 [[cited 19 september 2019] Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S021348531830015X>
51. Todd C. Análisis de tres polimorfismos del Gen DMD/DMB en familias Mexicanas [Maestria]. Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: Identificación de la delección del exón 45 y exón 51 del gen DMD en una familia colombiana proveniente de Córdoba Nariño.

Fecha:

Nombres y apellidos:

Estimado paciente:

La universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y el Instituto de Genética de la universidad Nacional de Colombia, están realizando un estudio sobre los casos de distrofia muscular de duchenne que se encuentran presentes en esta familia. Los resultados obtenidos en el mismo permitirán evaluar las mutaciones del gen DMD que en los últimos años han llevado a cabo el desarrollo fenotípico de la enfermedad.

Si desea formar parte de este estudio lea atentamente la siguiente información:

1. Su aprobación para la toma de fotografías realizadas por la persona encargada del desarrollo del proyecto
3. Su aprobación para la toma de la muestra de sangre en los días y horas que la persona encargada del proyecto indique. Resaltando que esta muestra será tomada con todas las normas de bioseguridad con el fin de que usted no corra ningún riesgo.
4. La naturaleza de este estudio genético consiste en un análisis de material genético con el objetivo de detectar alteraciones que constituyan la base genética de una alteración hereditaria que produce Distrofia muscular de Duchenne.
5. Usted tiene derecho a ser informado de los datos genéticos que se obtengan del estudio
6. Usted tiene derecho a revocar este consentimiento en cualquier momento, previa petición por escrito. Este derecho no exime de las obligaciones económicas contraídas al solicitar estos servicios
7. Al participar en este estudio debe tener claro que No le generará ningún beneficio económico
8. Puede realizar las preguntas que crea convenientes en cualquier momento del estudio.

Firma del paciente _____

CC: _____

Móvil: _____

Nombre: _____

Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____

País: _____ Departamento: _____ Municipio: _____

Sexo: masculino _____ Femenino _____

Peso: _____

Estatura: _____

Presenta Maniobra de Gowers: signo clínico que consiste en que el paciente no logra levantarse de manera regular, sino que agachado sobre las rodillas debe ayudarse con las manos y los brazos. **Si** __ **NO**__

Si respondió, sí en la anterior pregunta diga la edad en la que se inició este signo:

Presenta debilidad muscular: **Si** __ **NO**__

Presenta dificultades para desplazarse de un lugar a otro: **Si** __ **NO**__

Presenta dificultades para respirar: **Si** __ **NO**__

Presenta dificultades cardiacas: **Si** __ **NO**__

Actualmente presenta otro tipo de enfermedad: **Si** __ **NO**__

Cual: _____

Alguna vez ha sido valorado por un médico respecto a esta sintomatología: **SI** __ **NO**__

Cuántas veces _____

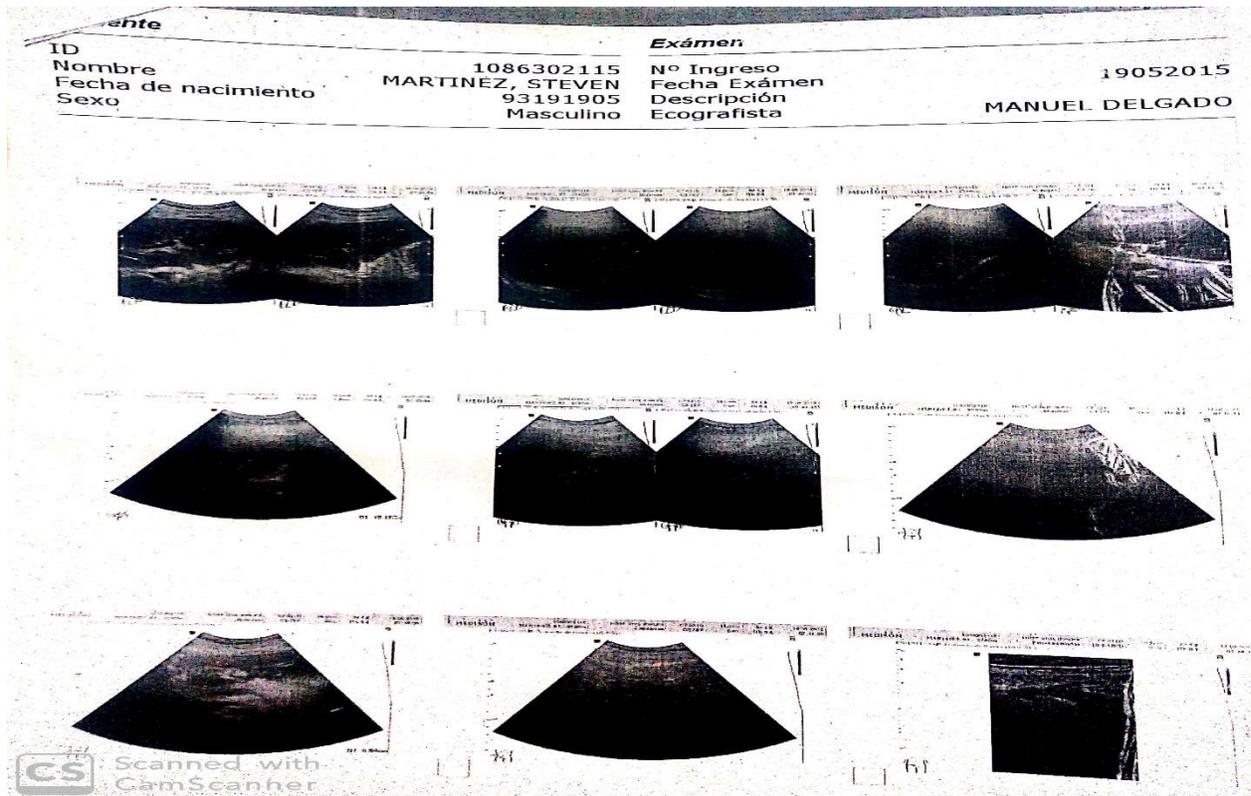
Podría mencionar el diagnóstico descrito en dicha ocasión

Firma del paciente _____

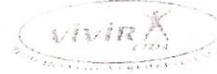
CC: _____

Móvil: _____

ANEXO 2: Radiografía Paciente DMD, con Edema pulmonar y electrodiagnosticos.



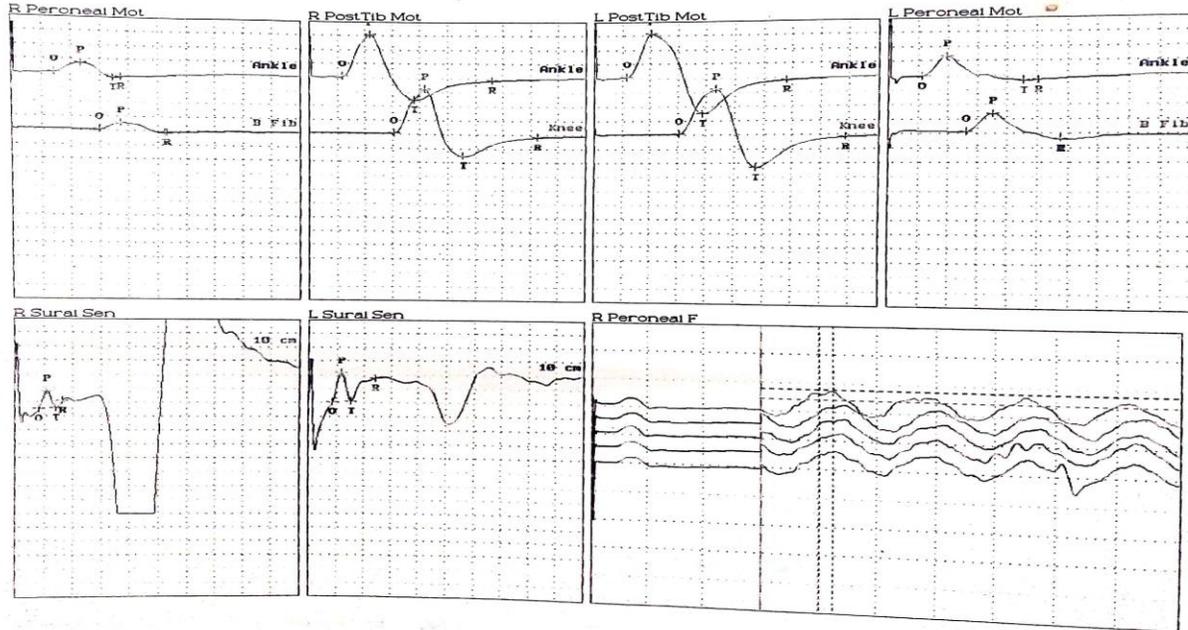
ESTUDIO DE ELECTRODIAGNOSTICO
 Dr. Hugo García V. Dr. Martín Moreno G.
 U. Nacional Hosp. Militar
 Cra 42 No 18A-56 Telefono: 7314474



Patient: Martínez, Steven
 Patient ID: 27167406 CCmadr
 Sex: Male

Age/DOB: 12 años.

Physician: Hugo García Valverde
 Ref Phys: SaludCoop



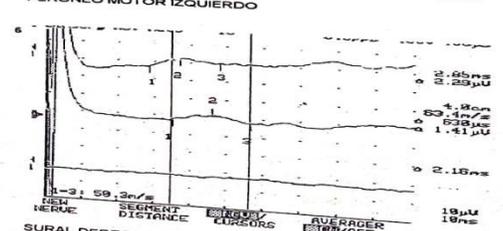
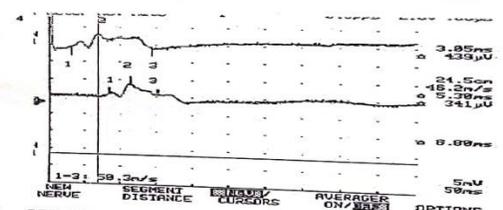
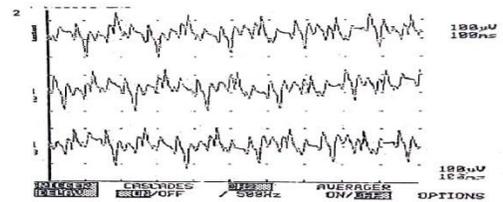
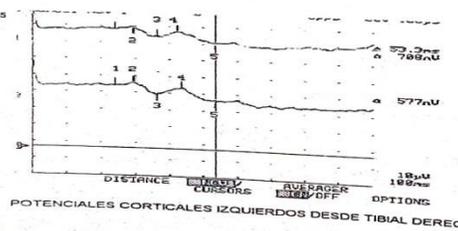
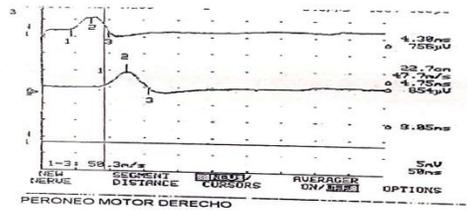
INFORME DE ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO PERIFÉRICO

Gastrocnemius	I Tibial	S1-S2	Aumen DRC (-)	Miopático	1.8	4.9	Disminuido 60 %
Tibialis anterior	D Peroneo profun	L4-S1	Aumen DRC (-)	Miopático	0.4	6.3	Disminuido 60 %
Tibialis anterior	I Peroneo profun	L4-S1	Aumen DRC (-)	Miopático	6.5	14.0	Disminuido 50 %

Gráficos relativos al examen

IT	20	1	34.9	2	29.3	3	35.3	4	42.93	5	53.3	S	AREA
IT	20	1	-1.686	2	2.72	3	-1.43	4	3.83	5	53.3	S	AREA
IT	20	1	23.9	2	29.3	3	35.3	4	42.93	5	53.3	S	AREA
IT	20	1	-1.924	2	3.29	3	-1.85	4	3.48	5	53.3	S	AREA

AREAS POR DEBAJO DE LA CURVA DE LOS POTENCIALES



ANEXO 3

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE DNA ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System – Promega

1. Mezcle bien la muestra de sangre durante al menos 10 minutos en un agitador de asador a temperatura ambiente. Si la sangre se ha congelado, descongele completamente antes de mezclar durante 10 minutos.
2. Dispense 20 µl de solución de proteinasa K (PK) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
3. Agregue 200 µl de sangre al tubo que contiene la Solución de Proteinasa K (PK) y mezcle brevemente.
4. Agregue 200 µl de tampón de lisis celular (CLD) al tubo. Tape y mezcle agitando en vórtex durante al menos 10 segundos.

Este paso de vórtice es esencial para obtener buenos rendimientos.

5. Incubar a 56 ° C durante 10 minutos.
6. Mientras la muestra de sangre se incuba, coloque una columna de unión ReliaPrep™ en un tubo de recolección vacío.
7. Retire el tubo del bloque calefactor. Agregue 250 µl de Binding Buffer (BBA), tape el tubo y mezcle agitando durante 10 segundos con un mezclador de vórtice. Nota: El lisado debe ser verde oscuro en este punto. Este paso de vórtice es esencial para obtener buenos rendimientos.
8. Agregue el contenido del tubo a la columna de unión ReliaPrep™, cúbralo y colóquelo en una microcentrífuga.
9. Centrifugar durante 1 minuto a la velocidad máxima. Verifique la columna de unión para asegurarse de que el lisado haya pasado completamente a través de la membrana. Si el lisado aún es visible en la parte superior de la membrana, centrifugue la columna durante otro minuto. Nota: La muestra se puede centrifugar a menor velocidad, si se desea. Aumente el tiempo de centrifugación en consecuencia para garantizar que el lisado haya pasado completamente a través de la membrana.
10. Retire el tubo de recolección que contiene el flujo y deseche el líquido como desecho peligroso.
11. Coloque la columna de encuadernación en un tubo de recolección nuevo. Agregue 500 µl de solución de lavado de columna (CWD) a la columna y centrifugue durante 3 minutos a la velocidad máxima. Deseche el flujo. Nota: Si queda algo de la solución de lavado en la membrana, centrifugue la columna durante otro minuto.
12. Repita el paso 11 dos veces para un total de tres lavados.
13. Coloque la columna en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml.
14. Agregue 50–200 µl de agua libre de nucleasa a la columna. Centrifugar durante 1 minuto a la velocidad máxima.

Nota: Eluir en 50 µl aumenta significativamente la concentración del ADN pero reduce el rendimiento en un 25-30%.

15. Deseche la columna de unión ReliaPrep™ y guarde el eluato. No reutilice las columnas de unión o los tubos de recolección.

ANEXO 4

SECUENCIA EXON 45

CATAAAAGGTGTCTTTCTGTCTTGTATCCTTTGGATATGGGCATGTCAGTTTCATAG
GGAAATTTTCACATGGAGCTTTTGTATTTCTTTCTTTGCCAGTACAACCTGCATGTGG
TAGCACACTGTTTAATCTTTTCTCAAATAAAAAGACATGGGGCTTCATTTTTGTTTTG
CCTTTTTG GTATCTTACAGGAACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTT
GTCAGAACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACA
GATGCCAGTATTCTACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAG
GTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAAAGAGGTAGGGCGACAGATCTAATAGG
AATGAAAACATTTTAGCAGACTTTTTAAGCTTTCTTTAGAAGAATATTTTCATGAGAGA
TTATAAGCAGGGTGAAAGGCACTAACATTAAGAACCTATCAACCATTAATCAACAG
CAGTAAAGAAATTTTTATTCTTTTTTTCATATACTAAAATA

SECUENCIA EXÓN 51 233PB

CTAAACAAAGTATCCACATTGTTAGAAAAAGATATATAATGTCATGAATAAGAGTTTG
GCTCAAATTGTTACTCTTCAATTAATTTGACTTATTGTTATTGAAATTGGCTCTTTAG
CTTGTGTTTCTAATTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTGCAAAAACCCAAAATATTT
TAGCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAAAC
TGCCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTG
GCAGATTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATC
AAGTTATAAAATCACAGAGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGA
TGATCATCAAGCAGAAGGTATGAGAAAAAATGATAAAAGTTGGCAGAAGTTTTTCT
TTAAAATGAAGATTTTCCACCAATCACTTTACTCTCCTAGACCATTTCCCACCGATTC
TTAGGCAACTGTTTCTCTCTCAGCAAACACATTACTCTCACTATTCAGCCTAAGTATA
ATCAAGGATATAAATTAATGCAAAT

ANEXO 5

PROTOCOLO DE PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR Y PREPARACION DE PURIFICADOS PARA SECUENCIAR.

IMPORTANTE: Todos los reactivos utilizados deben estar fríos, se recomienda mantenerlos en hielo

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL adicione 2.5 μ l de Acetato de Amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COOH}$) 5M a 25 μ l de producto de PCR
Nota: Si se cuenta con un volumen menor de producto hacer los cálculos correspondientes de acetato de amonio.
2. Adicionar 50 μ l de etanol al 100% frío
Nota: Si se cuenta con un volumen menor de producto hacer los cálculos correspondientes de acetato de etanol al 100%.
3. Centrifugue por 30 minutos a 15rpm en la centrifuga refrigerada a 4°C
4. Descarte el sobrenadante cuidadosamente.
5. Adicione 200 μ l de etanol al 75% frío
6. Centrifugue por 20 minutos a 1500 rpm en la cetrifuga refrigerada a 4°C
7. Descarte el sobrenadante cuidadosamente
8. Repita los pasos 5 al 7
9. Lleve las muestras al Speedvac por 5 minutos o deje los tubos abiertos hasta que el etanol se evapore por completo
10. Re suspenda en 15 μ l de agua y guarde las muestras a 4°C
11. Compruebe la purificación realizando un gel de agarosa al 1.5% sembrando 3 mL de purificado y observe que las inespecificidades y/o los dímeros de primer's hayan desaparecido.

Para enviar las muestras al servicio de secuenciación del instituto de genética (ssigMol)

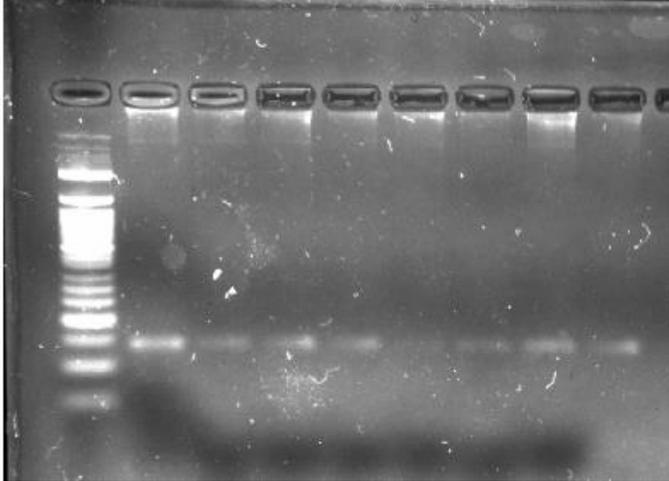
12. Ponga 4.5 μ l de producto de PCR purificado en un tubo eppendorf de 1.5ml
13. Añada 0.5 μ l de primer a una concentración de 10 μ M

Se recomienda secuenciar cada muestra con el primer Forward y el Reverse.

ANEXO 6

Geles estandarización de muestras DMD 45-11 y DMD 45 -16

(A)



(B)

