

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

ASESOR EXTERNO

HUMBERTO ARBOLEDA GRANADOS. Md. Msc.
Director Instituto de Genética

ASESOR EXTERNO

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

ASESOR INTERNA

RUTH MELIDA SANCHEZ MORA. Msc. PhD



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA
UNICOLMAYOR

CONTENIDO

```
graph TD; A[CONTENIDO] --- B[Introducción]; A --- C[Antecedentes]; A --- D[Objetivos]; A --- E[Diseño metodológico]; A --- F[Resultados – Discusión]; A --- G[Conclusión];
```

● **Introducción**

● **Antecedentes**

● **Objetivos**

● **Diseño metodológico**

● **Resultados – Discusión**

● **Conclusión**

Distrofia muscular de Duchenne y Distrofia muscular de Becker

Enfermedades hereditarias

Neuromuscular progresiva



MINSALUD

Resolución 5562/18

Código CIE G710

1-3500 a 6000
RNVVM

Diagnostico

Tratamiento



Temprana
2-7 años



Intermedia 8-14 años



Tardía
15 años

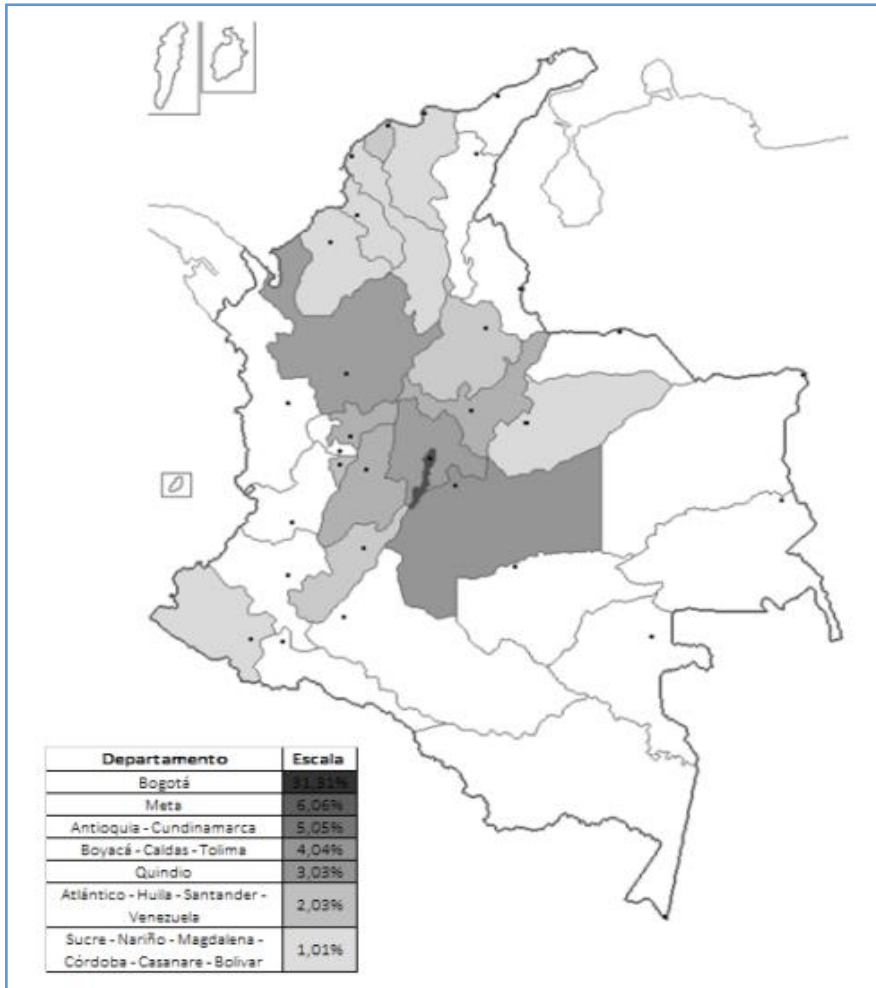


- Lentitud en la marcha
- Retardo en el lenguaje
- Retardo en el desarrollo general
- Leve retraso mental

- Dificultad para caminar
- Caídas frecuentes
- Marcha en las puntas de los pies
- Problemas de aprendizaje

- Debilidad de los miembros inf/sup.
- Contracturas articulares
- Insuficiencia cardiaca
- Pérdida de memoria

Epidemiología de distrofinopatías en Colombia



Departamento	Número	Porcentaje
Antioquia	5	5,05
Atlántico	2	2,02
Bogotá	31	31,31
Bolívar	1	1,01
Boyacá	4	4,04
Caldas	4	4,04
Casanare	1	1,01
Córdoba	1	1,01
Cundinamarca	5	5,05
Huila	2	2,02
Magdalena	1	1,01
Meta	6	6,06
Nariño	1	1,01
Quindío	3	3,03
Santander	2	2,02
Sucre	1	1,01
Tolima	4	4,04
Otro país	2	2,02
Sin dato	23	23,23
TOTAL	99	100,00

GEN DMD

Codifica la proteína **DISTROFINA**

Se localiza en la cara citoplasmática de la membrana de las fibras musculares

Aminoácidos: 3,685

4 dominios estructurales.

Tamaño: 427 kDa



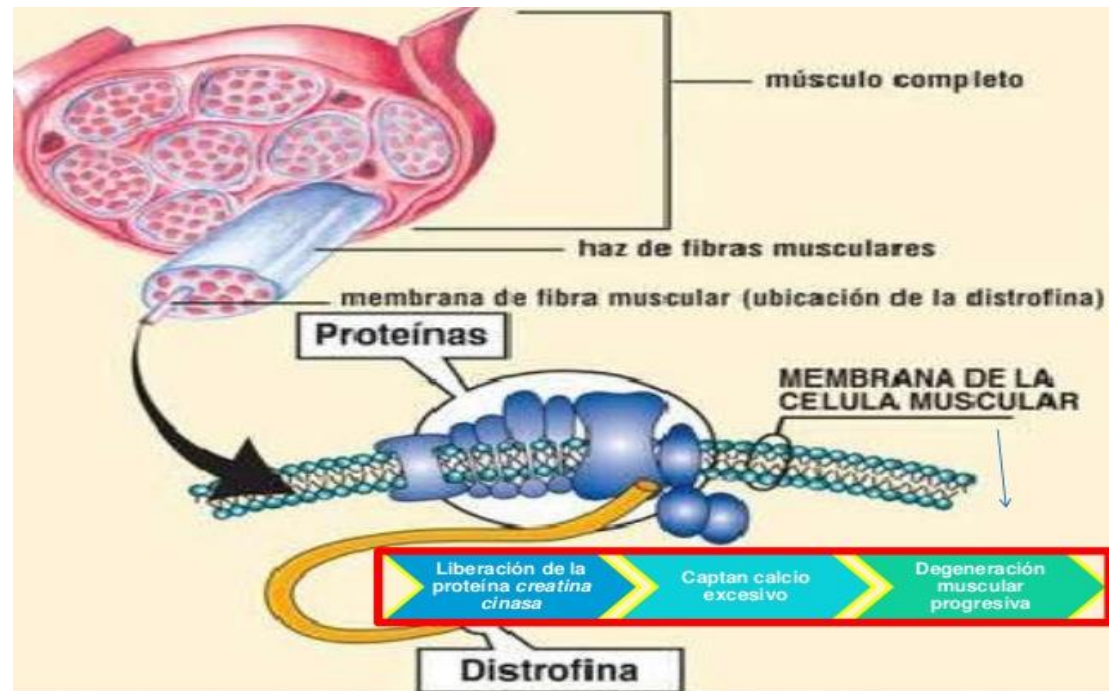
Ub: Xp21.2-p21

Mb: 2,4 de ADN

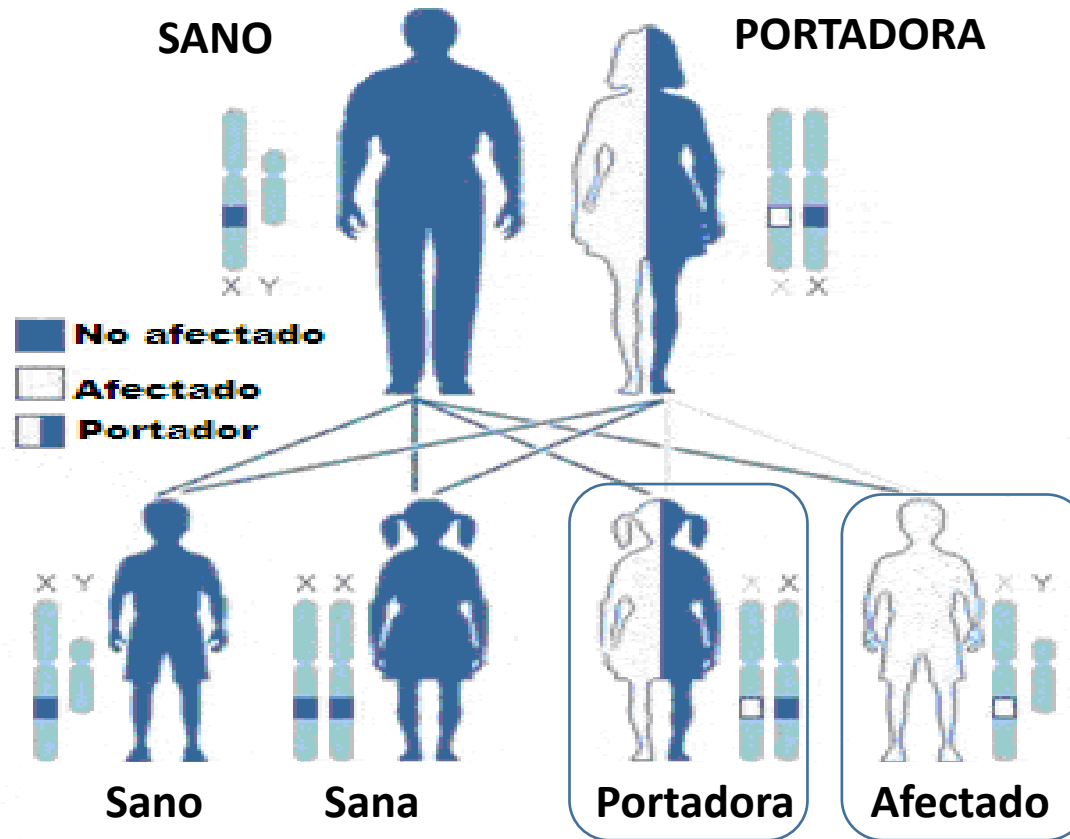
Pb: 31,119,219 a 33,339,609

79 exones.

Deleciones (68%)
 Duplicación (11%),
 Mut puntuales (11%)



Patrón de herencia DMD/DMB recesivo ligado al cromosoma X

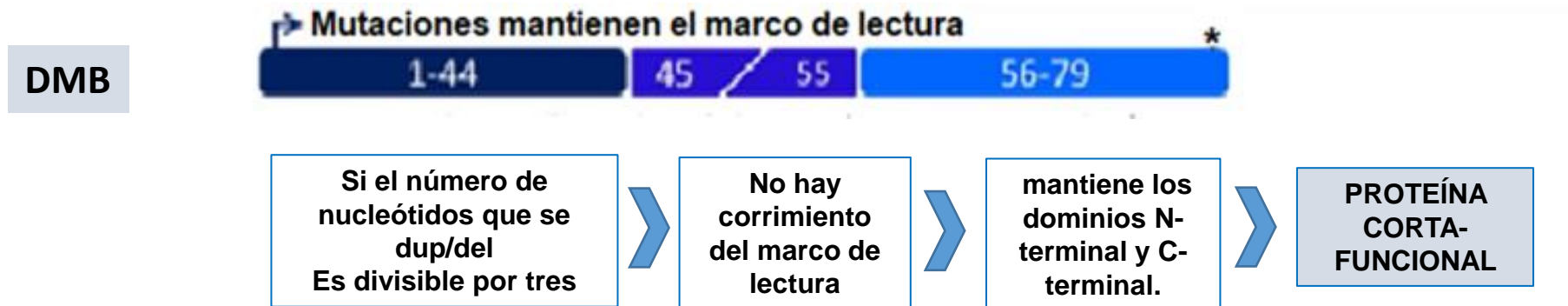


Una copia alterada del gen en cada célula es suficiente para causar la condición

una mutación tendría que ocurrir en ambas copias del gen para causar el trastorno

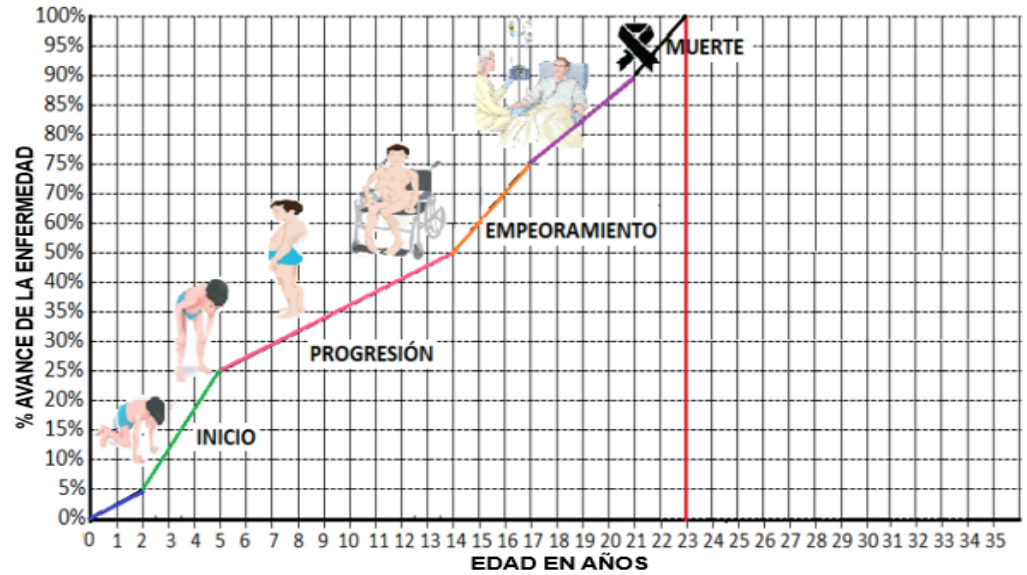


Regla del marco de lectura

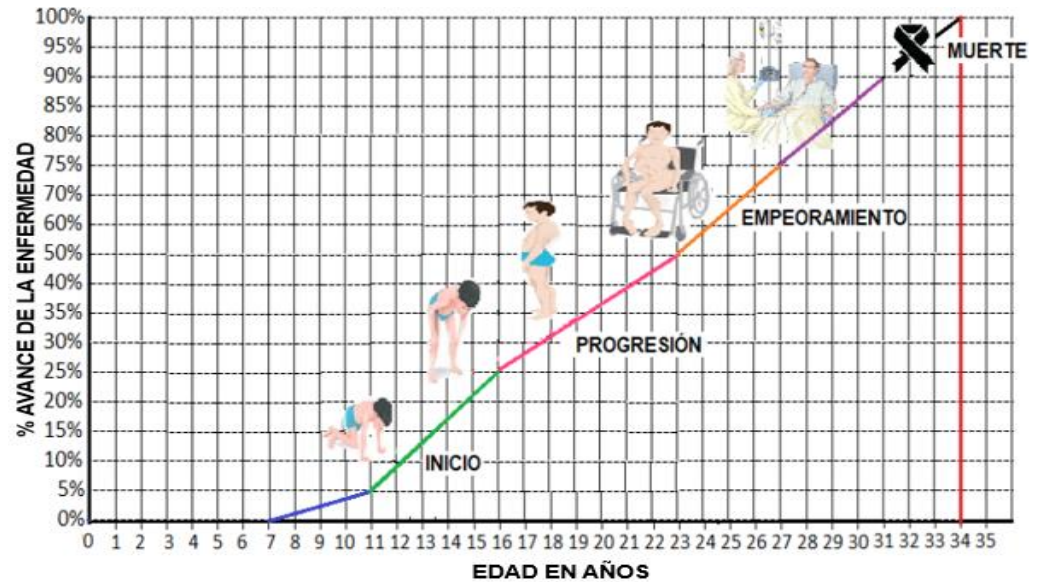


Comparación de la evolución clínica DMD Y DMB en el tiempo.

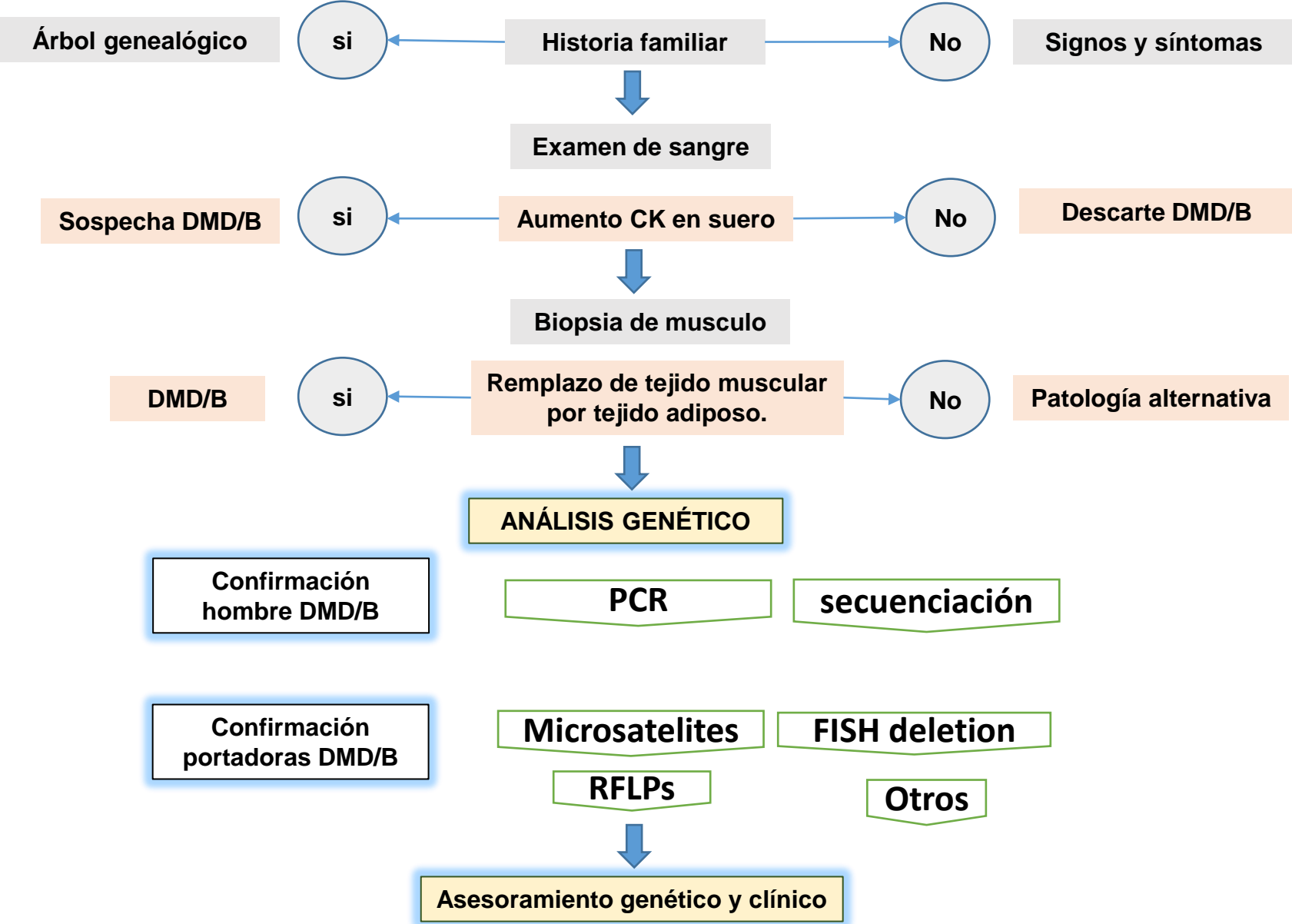
DMD



DMB



DIAGNÓSTICO



1930

Peter E. Becker
Medico

Describe la variante de DMD, Distrofia muscular de Becker

1858

Guillaume A. Duchenne
Cirujano y anatomista

Pionero en desarrollar el tratamiento óptimo para distrofias

1836

William J. Little
Medico cirujano

Primeras biopsias a pacientes DMD

1830

Charles Bell
cirujano y anatomista

Primeras descripciones de distrofias musculares

1995

Chamberlain JS.
Medico

realiza el diagnóstico de DMD/DMB con (PCR)

1987

Hoffman et al.
Medico

Identifica la proteína Distrofina

1986

Kunkel et al.
Medico

Aísla el gen DMD

1935

Gowers
Medico

Describe signo característico de la enfermedad "Maniobra de Gowers"

2016

FDA

Lanza Exodyn 51 como tratamiento paliativo de DMD/B Eteplirsén

2007

Fonseca D, et al.
Medico

Uso de STRs para identificación de portadoras

2003

Backer et al
Medico

Realiza estudio para diagnóstico de portadoras, con RFLPs

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

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.

Tabla 6: Cuantificación de las muestras de DNA de los participantes.

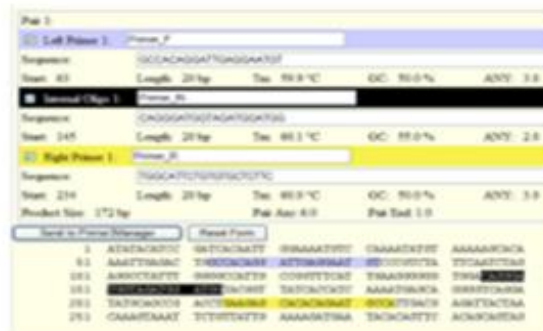
Nº	Simple ID	Date and Time	Nucleic Acid Conc	Unit	A260	A280	260 /280	260 /230	Sample Type
1	DMD 45 - 1	30/04/19	58.8	ng/µl	1.137	0.601	1.89	2.02	DNA
2	DMD 45 - 2	30/04/19	115.3	ng/µl	2.307	1.203	1.92	1.97	DNA
3	DMD 45 - 3	30/04/19	114.9	ng/µl	2.297	1.203	1.91	1.91	DNA
4	DMD 45 - 4	30/04/19	55.2	ng/µl	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

1



2

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence



3



Tabla 7. Características de los Primers diseñados para los exones previamente seleccionados.

GEN	EXON	LEFT PRIMER	% GC	Tm (c)	RIGHT PRIMER	% GC	Tm (c)	TAMANO (pb)
DMD	45	5'AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC3'	48.0	65.8	3'CATTCTATTAGATCTGTCGCCCTAC5'	46.15	66.3	547
DMD	51	5'GAAATTGGCTCTTTAGCTTGTGTTTC3'	38.46	63.2	3'GGAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC5'	40.74	65.3	388

Tabla 8: Condiciones y reactivos utilizados para la amplificación de los exones 45 y 51 del gen DMD

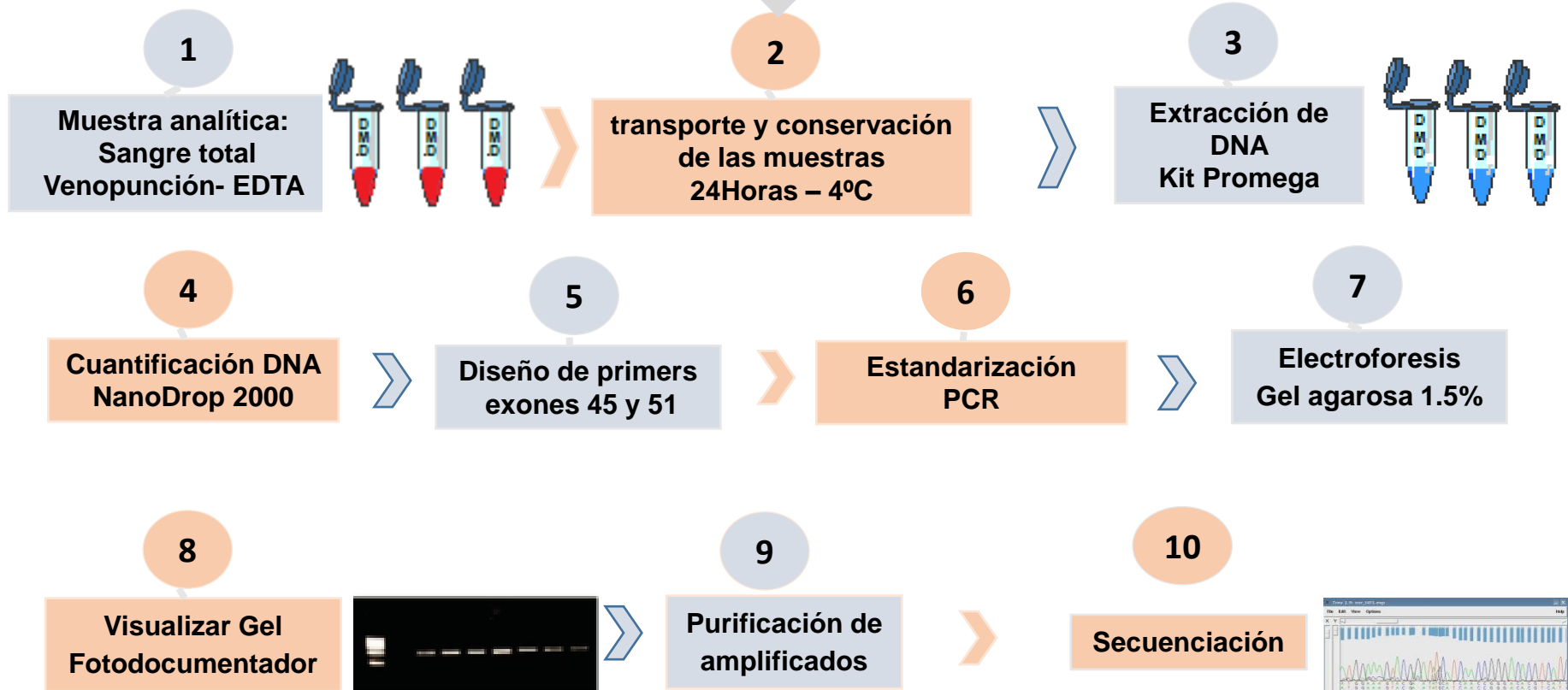
REACTIVOS	PRIMER EXON 45	X22	PRIMER EXON 51
Buffer	5 µl	110 µl	5 µl
Dntp`s	2 µl	44 µl	2 µl
Primer Left	1.5 µl	33 µl	1.5 µl
Primer Right	1.5 µl	33 µl	1.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl	33 µl	1.5 µl
H ₂ O	10.375 µl	228.25 µl	10.375 µl
GoTaq	0,125 µl	2.75 µl	0,125 µl
DNA	3 µl	3 µl	3 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl
T° Denaturación inicial	95 ° C durante 5 minutos		95 ° C durante 5 minutos
T° 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 ∞

Tipo de estudio:
Descriptivo

Población:
Familia colombiana que reside en el municipio de Córdoba Nariño.

Requisitos:
Aplicación de consentimiento informado, para su participación en el estudio.

Descripción del procedimiento. FASE I: identificación de la mutación (PCR)



1



2



3



Tabla 9. Primer's enzimas de restricción *TaqI* y *XmnI*

ENZIMA	LEFT PRIMER	% GC	Tm (c)	RIGHT PRIMER	% GC	Tm (c)	TAMANO (pb)
pERT87-8- (TaqI)	5'GTCAGTTGGTCAGTAAAAGCC3'	47.62	59.4	3'CCAATTAACACAGCAG5'	42.11	53.0	A1: 145pb A2: 71/72pb
pERT87-15B (XmnI)	5'GACTGGAGCAAGGGTCGCC3'	68.42	38.1	3'ACAATTTCCCTTCATCCAG5'	63.8	55.5	A1: 740pb A: 2520/220pb



Descripción del procedimiento: FASE II: IDENTIFICACION DE PORTADORAS (RFLPs)

Tabla 7. Condiciones y los reactivos utilizados para la amplificación

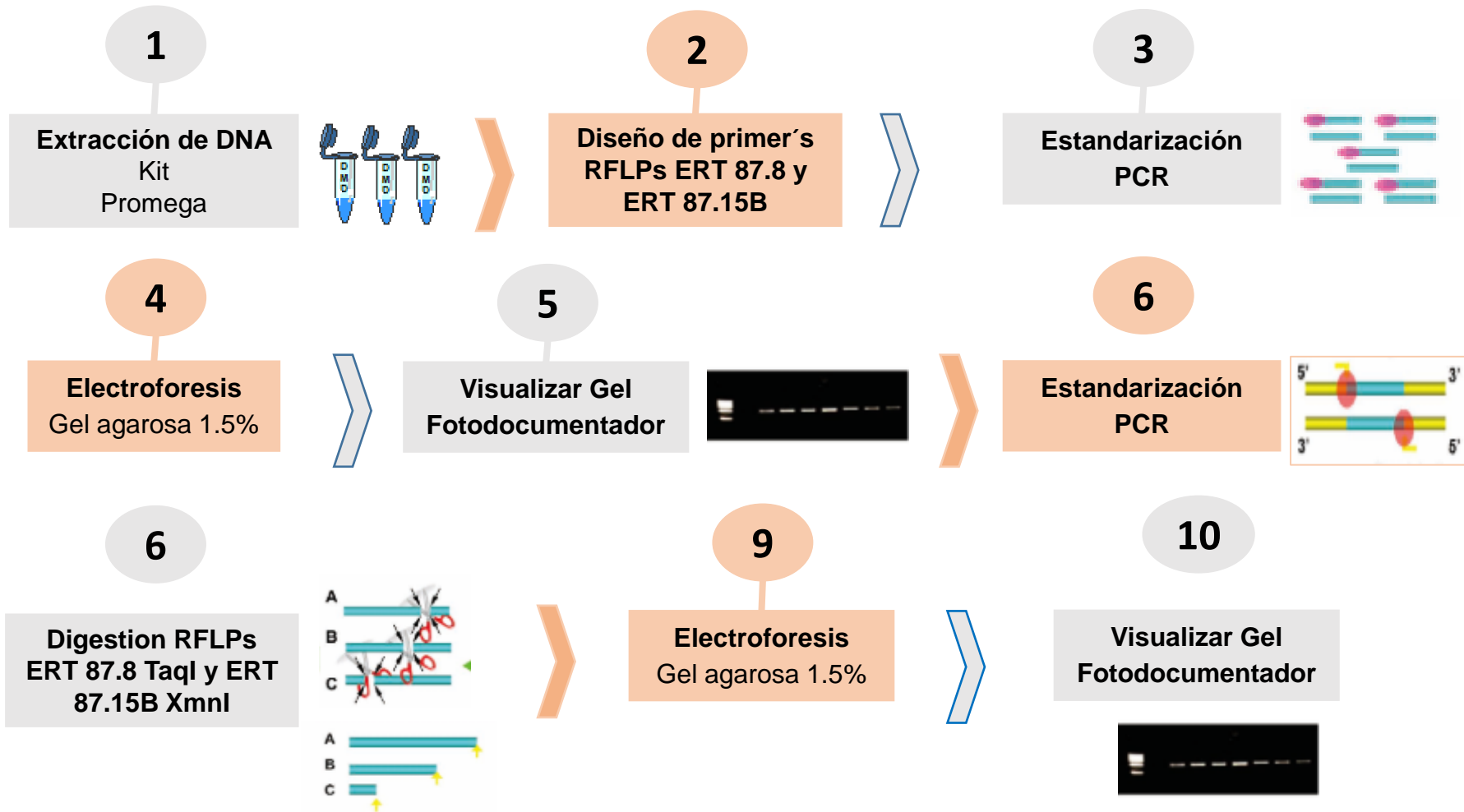
REACTIVOS	ERT87-8- (TaqI)	X22	ERT87-15B (Xmnl)
Primer Left	0.5 µl	11 µl	0.5 µl
Primer Right	0.5µl	11 µl	0.5µl
H ₂ O	8.5µl	187 µl	8.5µl
GoTaq	12.5µl	275 µl	12.5µl
DNA	3µl	3 µl	3µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl
T° Denaturación inicial	94 ° C durante 30 segundos		94 ° C durante 30 segundos
T° Denaturación	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 ∞

Descripción del procedimiento: FASE II: IDENTIFICACION DE PORTADORAS (RFLPs)

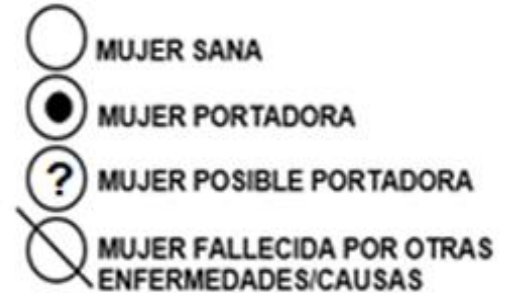
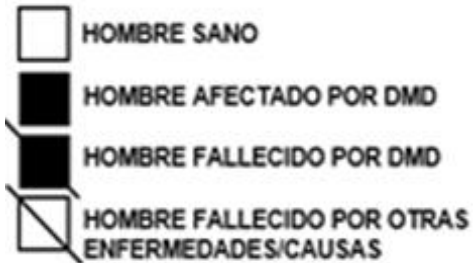
Tabla 11. Condiciones óptimas para digestión de enzimas

REACTIVOS	ERT87-8- (TaqI)	X22	ERT87-15B (Xmnl)
Buffer	0.5 µl	11 µl	0.5 µl
Enzima	2.5µl	55 µl	2.5µl
DNA	20 µl	440 µl	20 µl
H2O	2 µl	44 µl	2 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl
T° Digestión	64 °C durante 7 minutos		64 °C durante 7 minutos

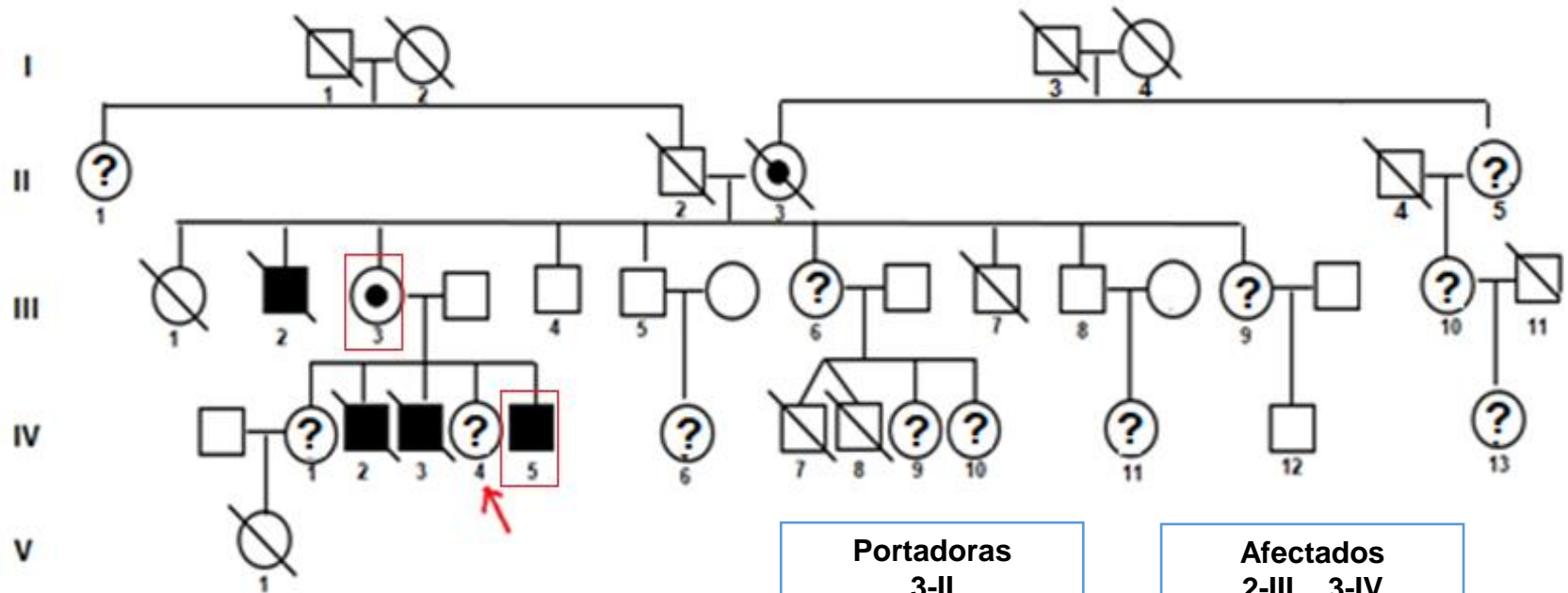
Descripción del procedimiento: FASE II: IDENTIFICACION DE PORTADORAS (RFLPs)



Árbol genealógico de la familia del estudio.



ÀRBOL GENEALÒGICO
 DISTROFIA MUSCULAR DE DICHENNE
 Familia Colombiana (Còrdoba-Nariño)

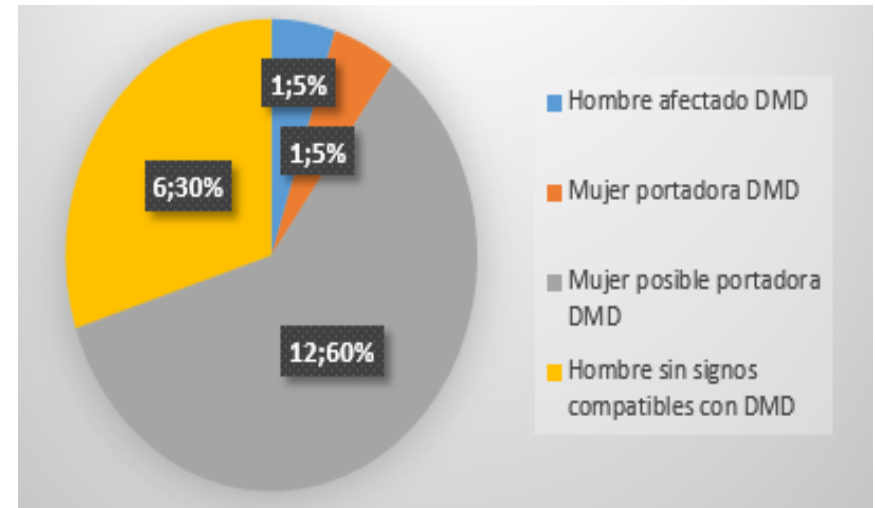


Clasificación participantes seleccionados para el estudio.

13 Mujeres, 7 hombres

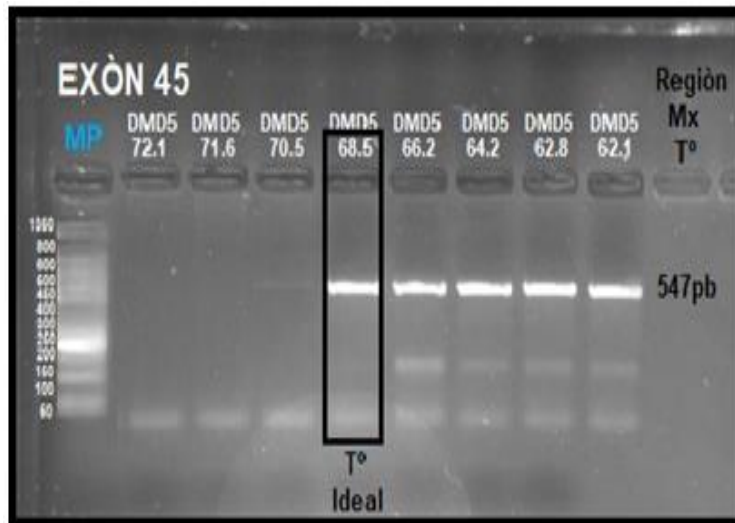
EDAD: 3-85

CÓDIGO		GÉNERO	EDAD	DIAGNÓSTICO
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
DMD 45 - 4	(IV-5)	M	7	Afectado DMD
DMD 45 - 5	(IV-4)	F	23	Sin DMD
DMD 45 - 6	(III-3)	M	50	Sin DMD
DMD 45 - 7	(III-6)	M	50	Sin DMD
DMD 45 - 8	(III-6)	F	49	Sin DMD
DMD 45 - 9	(IV-9)	F	22	Sin DMD
DMD 45 - 10	(IV-10)	F	21	Sin DMD
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
DMD 45 - 14	(III-9)	F	41	Sin DMD
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
DMD 45 - 18	(II-5)	F	75	Sin DMD
DMD 45 - 19	(III-10)	F	6	Sin DMD
DMD 45 - 20	(IV-13)	F	3	Sin DMD



Fase I: Identificación de deleción del exón 45 del gen DMD

Estandarización exón 45



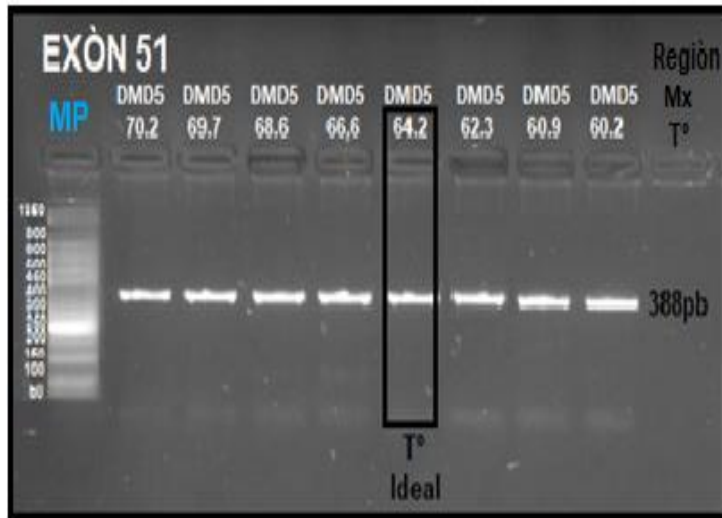
Amplificación del exón 45 en muestras de los participantes



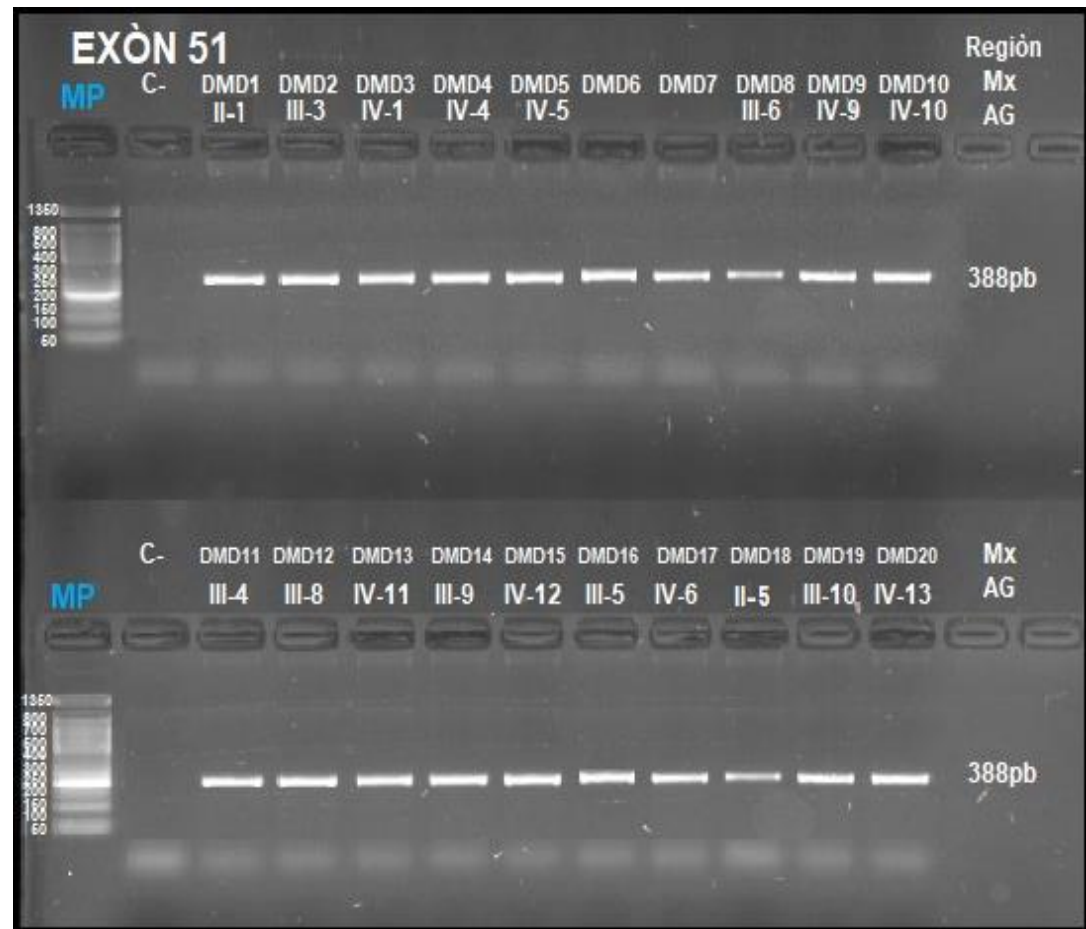
Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Fase I: Identificación de delección del exón 51 del gen DMD

Estandarización exón 51



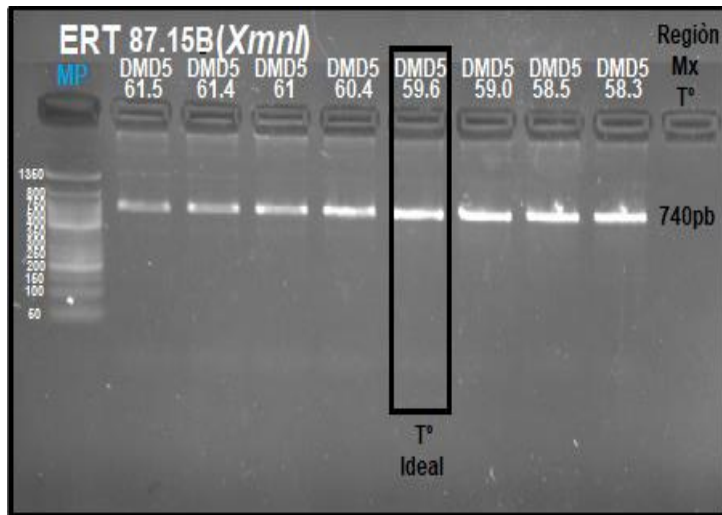
Amplificación del exón 51 en muestras de los participantes



Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

FASE II: Identificación de portadoras de la delección del exón 45 en el gen DMD por técnica RFLPs (ERT87.15B – *XmnI*)

Estandarización ERT 87.15B (*XmnI*)



Amplificación ERT 87.15B (*XmnI*)

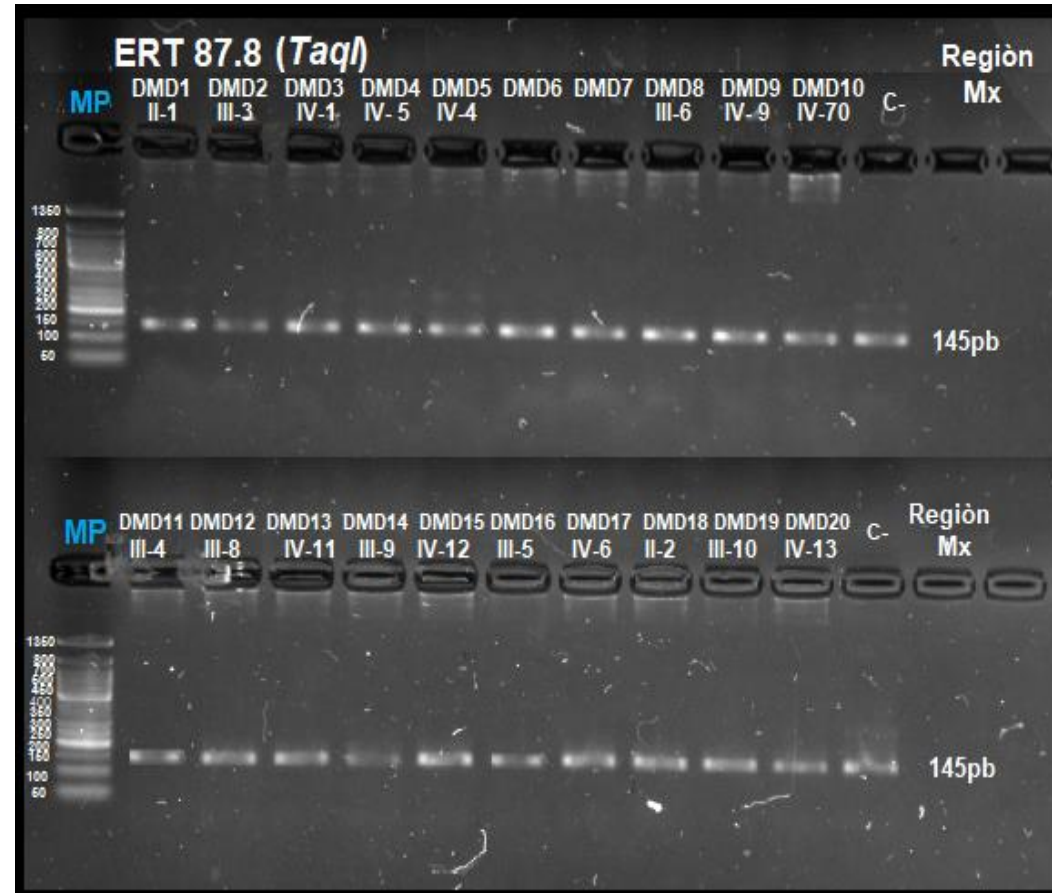
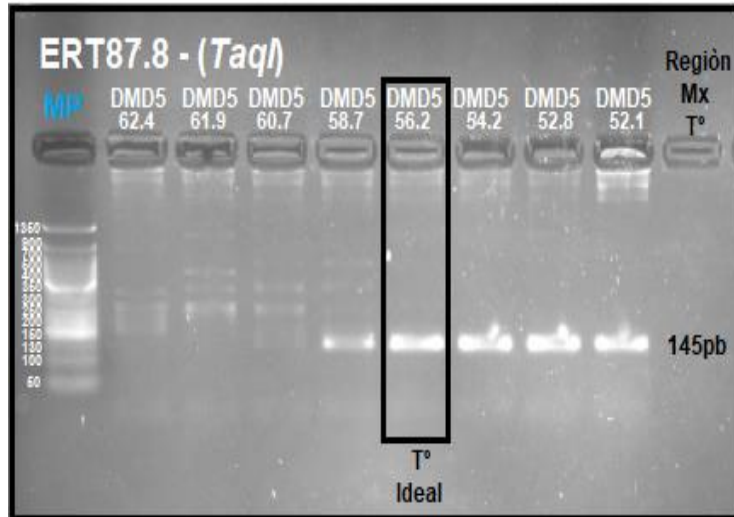


Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

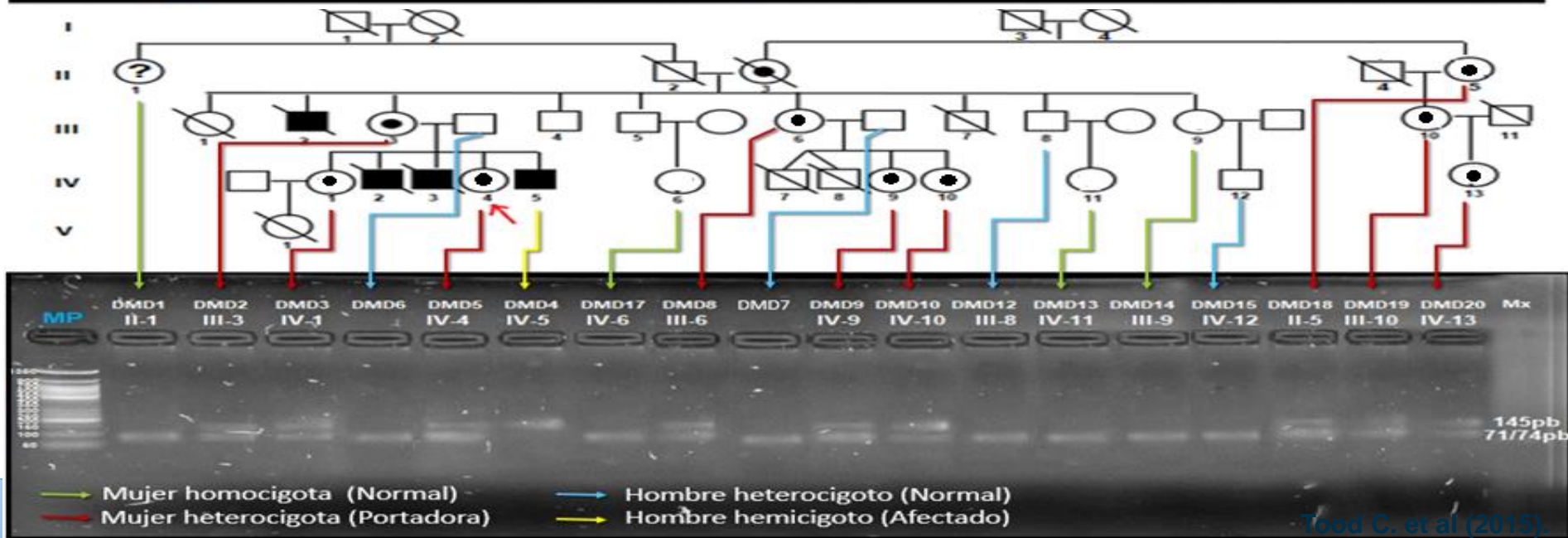
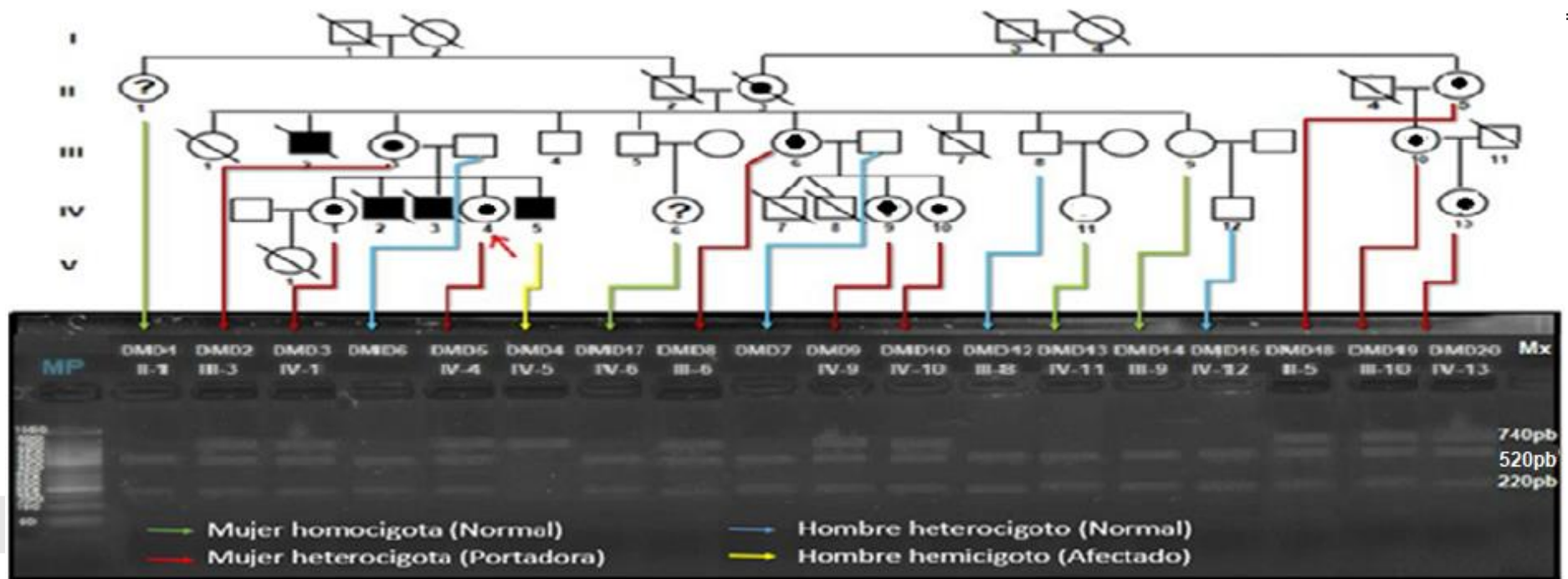
FASE II: Identificación de portadoras de la delección del exón 45 en el gen DMD por técnica RFLPs (ERT87.8 – *TaqI*)

Amplificación de ERT 87.8 (*TaqI*)

Estandarización ERT 87.8 (*TaqI*)

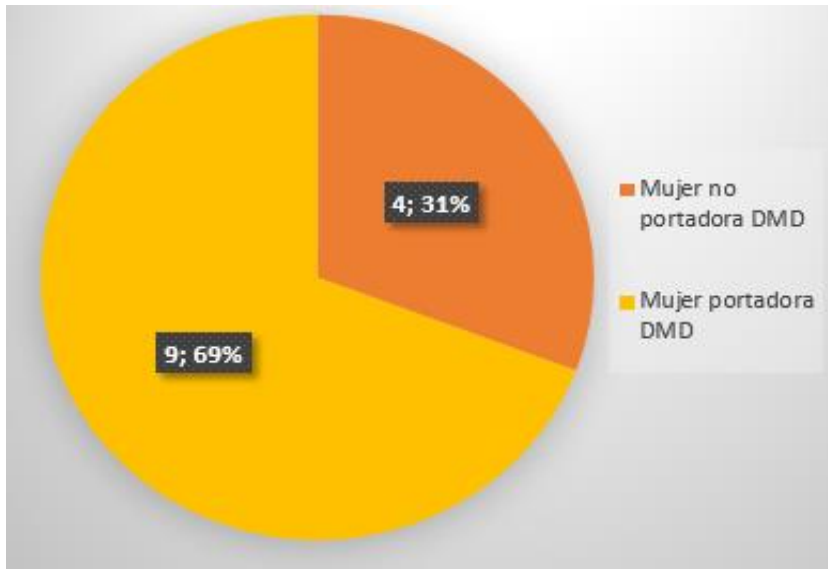


Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.



Asesoramiento genético

RESULTADOS-DISCUSION



Agenda de cita

Se realizó la revisión de **exámenes**, estudios previos e historial médico y familiar de algunos participantes

Se construyó la genealogía (5 generaciones)

Asesoramiento genético pre-test

Se explican opciones de estudios genéticos

Implicancias de los posibles resultados

Opciones de seguimiento y manejo médico

Asesoramiento genético pos-test

Entrega e interpretación de los resultados

recomendaciones de manejo médico

Asesoramiento y estudio genético a familiares en riesgo

RESULTADOS

BENEFICIOS

- Intervención Precoz
- Identificación de familiares de riesgo
- Prevenir embarazos de alto riesgo
- Se aplica un tratamiento pre gestación

RIESGOS

- Impacto psicosocial.
- Incertidumbre
- Discriminación
- Ansiedad y Frustración

1

Se evidencio 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 delección total del exón 45 (547pb) 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, usando la técnica indirecta RFLPs. Encontrando: **69 % (n=9)** el porcentaje correspondiente a las mujeres **heterocigotas (portadoras)** y el **18 % (n=4)** mujeres **homocigotas (No portadoras)**.

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.

1

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

2

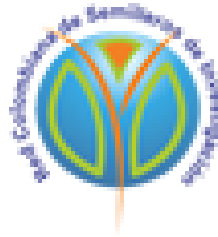
Teniendo los desarrollos en técnicas de secuenciación, particularmente estudios de microsatélites, seria deseable implementar estas tecnologías en futuros estudios





UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

INSTITUTO DE
GENÉTICA



Fundación
RedCOLSI

¡Gracias!

ANEXOS

Video 1