

## Deleciones en el gen de la distrofina en 62 familias colombianas: correlación genotipo-fenotipo para la distrofia muscular de Duchenne y Becker

Claudia T. Silva, Biol., M.Sc.<sup>1</sup>, Dora Fonseca, Biol., M.Sc.<sup>2</sup>,  
Carlos Martín Restrepo, M.D., M.Sc.<sup>3</sup>, Nora C. Contreras, Biol.<sup>2</sup>, Heidi E. Mateus, M.D.<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** La correlación genotipo-fenotipo se estableció mediante el análisis de deleciones del gen de la distrofina en pacientes con distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/DMB).

**Objetivos:** Establecer la correlación entre el genotipo molecular y el fenotipo clínico de los pacientes.

**Materiales y métodos:** Se analizaron 62 afectados mediante amplificaciones por PCR múltiple de 18 exones ubicados en los dos puntos proclives dentro del gen.

**Resultados:** En la población analizada, 19 pacientes mostraron deleción en el gen de la distrofina con los 18 exones estudiados, esto corresponde a 31% de hombres afectados con deleción.

**Conclusiones:** Teniendo en cuenta la hipótesis del corrimiento del marco de lectura traduccional (CMLT) y la mutación observada en los afectados, se pudo determinar que las mutaciones out frame, resultan en pacientes con el fenotipo severo o distrofia muscular de Duchenne y las mutaciones in frame, resultan en pacientes con el fenotipo leve o distrofia muscular de Becker. Se pudo predecir un cuadro clínico de DMD o DMB en 79% de los casos, lo cual permite utilizar este sistema diagnóstico como una herramienta importante para ayudarle a los neurólogos en la valoración clínica de los pacientes en los cuales se encuentra deleciones.

Palabras clave: Distrofia muscular Duchenne y Becker (DMD, DMB); Reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR); Corrimiento del marco de lectura; Herencia ligada con la X recesiva.

Las distrofias musculares (DM) son entidades hereditarias que se caracterizan por debilidad muscular progresiva, pérdida de la masa muscular, hiporreflexia, fasciculaciones y discapacidad física variable. Son causadas por la mutación de uno de varios genes. De todas las DM, la distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la más común, afecta a uno de cada 3,500 niños del sexo masculino; se caracteriza por debilidad y adelgazamiento muscular progresivos en la infancia, pérdida de la capacidad de caminar al final de la

primera década de la vida y muerte a finales de la segunda década<sup>1-4</sup>.

La distrofia muscular de Becker (DMB), es menos frecuente y se caracteriza por una progresión más lenta y mayor sobrevida de 5 ó 6 décadas<sup>5-7</sup>; 60% de los casos se heredan de manera recesiva ligada al sexo y las madres, que son portadoras de una mutación para la enfermedad, transmiten el gen mutado a la mitad de sus hijos que serán afectados y la mitad de las hijas serán portadoras sanas y transmitirán la mutación a la siguiente generación<sup>8</sup>.

El gen mutado en los pacientes con DMD y DMB se localiza en el brazo corto del cromosoma X, en la banda Xp21<sup>9</sup> consta de 2,300 kb y 79 exones, se transcribe en un ARNm de aproximadamente 14 kb, que codifica para una proteína de 427 kD y 3,685 aminoácidos llamada distrofina.

La ausencia o la disfunción de la distrofina causaría DMD/DMB y se ha propuesto que las fibras musculares de los afectados carecen de la interacción normal entre el sarcolema y la matriz extracelular; la interrupción de esta unión podría incrementar la fragilidad osmótica de las fibras musculares o alterar los mecanismos reguladores de los niveles de calcio, aumentar el flujo de iones Ca<sup>2+</sup> en el músculo, hipótesis sustentada en los hallazgos histopatológicos. En ambos casos, habrá

1. Instructora Asociada, Profesora Distinguida, Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá. e-mail: ctsilva@urosario.edu.co
  2. Instructora Asistente, Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá. e-mail: dfonseca@urosario.edu.co ncontrer@urosario.edu.co hmateus@urosario.edu.co
  3. Profesor Distinguido, Jefe Unidad de Genética, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C. e-mail: cmrestrepo@cable.net.co
- Recibido para publicación mayo 2, 2004 Aprobado para publicación agosto 6, 2004

necrosis de las células musculares, lo que explicaría el cuadro clínico progresivo de la enfermedad<sup>10</sup>.

Se ha descrito heterogeneidad mutacional en el gen de la distrofina que incluye deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. La literatura mundial muestra que 66% de todas las mutaciones corresponden a deleciones o duplicaciones de uno o más exones en el gen<sup>11,12</sup>; las deleciones tienen una distribución no al azar a lo largo de la secuencia nucleotídica y se agrupan en dos regiones proclives o *hot spots*: 80% se concentran en la región de los exones 44 al 52 (cerca de la mitad afectan al exón 44)<sup>13</sup>; 20% restante comprenden los exones 1 al 19<sup>14-16</sup>. Debido al agrupamiento de las deleciones en dos puntos proclives, se ha establecido que el análisis de 18 de los 79 exones del gen de la distrofina, permite identificar 98% de todas las mutaciones del tipo deleción en el gen<sup>17-19</sup>; 33% de los casos, la mutación implica la alteración de un nucleótido único o de unos pocos nucleótidos<sup>16,20</sup>.

La correlación genotipo-fenotipo se ha establecido mediante ejercicios meramente hipotéticos que relacionan el efecto de la mutación con el fenotipo de los pacientes. La hipótesis del corrimiento del marco de lectura traduccional (CMLT) propone que una vez ha ocurrido deleción, el gen resultante será el fruto de la reunión de los segmentos proximal presentándose dos alternativas: se preserva el marco de lectura (*in frame*); en este caso se conservan los dominios aminoterminal de unión con la actina y carboxiterminal de unión con los sarcoglicanos y distroglicanos de la membrana<sup>21-26</sup> que permiten que se dé una proteína medianamente funcional con defectos en sus dominios internos, y causa una forma leve de la enfermedad o DMB, o contrariamente, la deleción crea un corrimiento del marco de lectura (*out frame*); en estos casos,

aunque se conserva la región amino-terminal, el corrimiento en el marco de lectura distorsiona la proteína a tal grado que se produce una cadena polipeptídica diferente y no funcional, que impide que la proteína ejerza su función en la membrana del sarcolema y origina DMD con el cuadro clínico severo de la enfermedad<sup>21,22</sup>.

Para evaluar los fenómenos *out frame* e *in frame* de las mutaciones que causan CMLT, se clasificaron los bordes de los exones como uno de tres tipos (1, 2 y 3), según la posición de los tripletes codificantes (Cuadro 1); una deleción que une dos exones con bordes del mismo tipo conserva el marco de lectura; por el contrario, una muta-

**Cuadro 1**  
**Estructura del gen de la distrofina humana. Bordes intron/exon**

Exon	Dominio	Extremo 5' borde	Extremo 3' borde	Exon	Dominio	Extremo 5' borde	Extremo 3' borde
1	UTR/N	-	1	41	R15	3	3
2	N	1	3	42	R16	3	3
3	N	2	3	43	R16	3	3
4	N	3	3	44	R17	2	3
5	N	3	3	45	R17	3	2
6	N	3	2	46	R18	2	3
7	N	2	1	47	R18	3	3
8	N/H1	1	3	48	R19	3	3
9	H1	3	3	49	R19	3	3
10	H1/R1	3	3	50	R19/H3	3	1
11	R1	3	2	51	H3/R20	1	3
12	R2	2	3	52	R20	3	1
13	R3	3	3	53	R20/R21	1	3
14	R2/R3	3	3	54	R21	3	2
15	R3	3	3	55	R22	2	3
16	R3	3	3	56	R22	3	2
17	H2	2	2	57	R23	2	2
18	R4	3	3	58	R23/R24	3	1
19	R4	1	1	59	R24	1	3
20	R4/R5	3	3	60	R24/H4	3	3
21	R5	1	1	61	H4	3	1
22	R6	3	3	62	H4	1	2
23	R6	3	3	63	H4	2	1
24	R7	3	3	64	H4	1	1
25	R7	3	3	65	CYS	1	2
26	R8	3	3	66	CYS	2	1
27	R8	3	3	67	CYS	1	3
28	R9	3	3	68	C	3	2
29	R9	3	3	69	C	2	3
30	R10	3	3	70	C	3	2
31	R10	3	3	71	C	2	2
32	R11	3	3	72	C	2	2
33	R11	3	3	73	C	2	2
34	R12	3	3	74	C	2	2
35	R12	3	3	75	C	2	3
36	R13	3	3	76	C	3	1
37	R13	3	3	77	C	1	1
38	R14	3	3	78	C	1	3
39	R14	3	3	79	C/UTR	3	-
40	R15	3	3				

N=dominio amino-terminal Cys=dominio rico en cisteína H1-H4= 4 regiones «hingue»  
C= dominio C-terminal R1-R24= dominio Rod  
Tomado de Roberts *et al.*, 1993<sup>45</sup>

ción que reúne dos exones con tipos de borde diferentes modifica el marco de lectura, conduciendo a la terminación temprana de la proteína o una proteína anormal, por una mutación del tipo *missense* o *nonsense*<sup>27</sup>. La mayoría de las mutaciones del tipo deleción, que afectan el marco de lectura traduccional, comprometen el dominio distal *rod* o remueven la región aminoterminal de la proteína; estas deleciones se han relacionado con el fenotipo severo de la enfermedad (DMD); en estos pacientes, por lo general, no se encuentra distrofina en la membrana del sarcolema<sup>28</sup>.

En el presente trabajo se estableció en una cohorte de afectados colombianos con DMD o DMB, una correlación hipotética entre el genotipo-fenotipo al comparar el cuadro clínico de los afectados con los hallazgos moleculares y el análisis según la hipótesis del corrimiento del marco de lectura (CMLT)<sup>21</sup>.

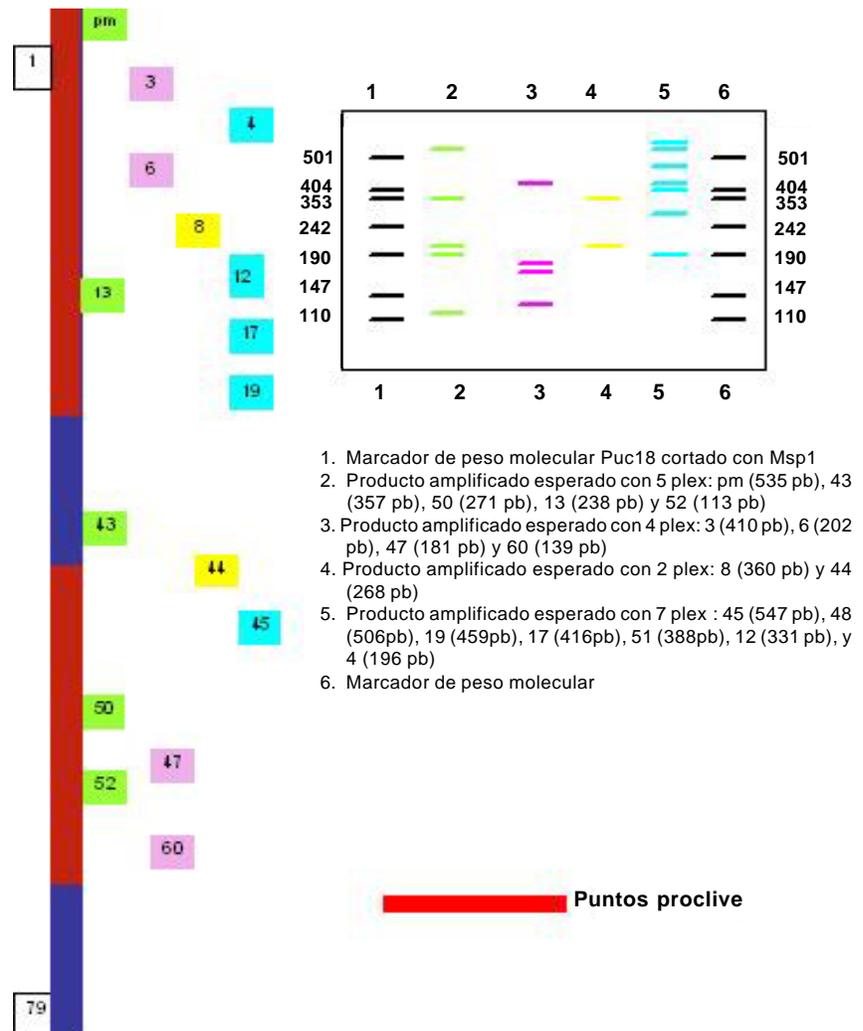
**MATERIALES Y MÉTODOS**

Se analizaron 62 casos índice con DMD/DMB, remitidos por el Instituto Franklin Delano Roosevelt y la Asociación Colombiana de Distrofia Muscular (ACDM) provenientes de diferentes regiones de Colombia. Se registraron los datos personales y familiares (genealogía), así como los resultados de estudios de laboratorio (CPK, biopsia muscular y electromiografía); de acuerdo con la evolución clínica y los estudios paraclínicos se estableció el diagnóstico clínico del paciente, fuera DMD o DMB.

Después de obtener el consentimiento informado de cada participante, se obtuvo por venopunción un tubo de 5 ml de sangre periférica total, de donde se extrajo el ADN genómico por el método de desalamiento<sup>23,29</sup>. Luego se hizo la amplificación por PCR múltiple para 18 exones, con los iniciadores o

*primers* diseñados por Chamberlain *et al.*<sup>30</sup> y Restrepo *et al.*<sup>31</sup> Las regiones amplificadas fueron el promotor (PM) y los exones 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52 y 60 (Gráfica 1). Los *primers* utilizados para la amplificación de los diferentes exones se sintetizaron en la casa comercial INVITROGEN en escala de síntesis de 100 nm, la solución de trabajo que se empleó correspondía a diluciones de 10 pm/ml. La mezcla de la reacción de PCR se llevó a un volumen final de 50 µl, mediante las siguientes concentra-

ciones finales: amortiguador *Taq* polimerasa 1X (con 200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl); 3.0 y 6.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (2.3 y 5.7 plex, respectivamente); 0.4 mM de cada dNTP (Promega); 5U de *Taq* ADN polimerasa (Promega) y 50 ng de ADN. Los cebadores correspondientes se mezclaron en sistemas de 7plex, 5plex, 3plex y 2plex en concentraciones de trabajo de 10 pml, la concentración final en la mezcla de reacción de PCR correspondió a 1.2 uM. Las muestras se corrieron en un termociclador PT100 MJ Research bajo



**Gráfica 1.** Izquierda: esquema del gen de la distrofina con la posición relativa de los exones amplificados, de azul 5-plex, fucsia 4 plex, amarillo 2 plex y verde 7 plex. Derecha: tamaño y posición relativa de los productos amplificados en el gel que se esperan obtener después de realizar la PCR

**Cuadro 2**  
**Programas de termociclador**

	5 y 4 plex		7 y 2 plex	
	Temperatura (°)	Tiempo	Temperatura (°)	Tiempo
Paso 1	94	30"	94	30"
Paso 2	54	30"	50	30"
Paso 3	65	4'	65	4'
Denaturación inicial	94	6'	94	6'
Elongación final	65	7'	65	7'
Nº ciclos	30		30	



**Gráfica 2. Gel page 8%. Resultado de la amplificación con el sistema 4 plex. Columna 1. Marcador de peso molecular Puc18 (fragmentos de 501, 489, 404, 353, 242, 190 y 110 pb). Columna 2. Blanco de amplificación (no se observan bandas). Columna 3. Control normal de amplificación con sistema 4 plex, se observan cuatro bandas correspondientes a los exones 3: 410 pb, exón 6: 202 pb, exón 47: 181 pb, exón 60: 139 pb. Columna 4. Paciente DM1: delección exón 47. Columna 5. Paciente DM8: completo. Columna 6. Paciente DM10: completo. Columna 7. Paciente DM12: delección exones 3. 6. Columna 8. Paciente DM14: completo. Columna 9. Paciente DM17: delección exones 3 y 6. Columna 10. Paciente DM29 con delección exón 3.**

las condiciones estandarizadas (Cuadro 2).

Los productos amplificados se verificaron en un gel de agarosa al 2% (SIGMA) y confirmados en geles de poliacrilamida al 8%, que se tiñeron con bromuro de etidio; las bandas de amplificación se compararon con el patrón de peso molecular (puc18) (Gráficas 2, 3, 4 y 5). Los resultados se analizaron sobre transiluminador SIGMA y se obtuvo impresión fotográfica directa con cámara instantánea y rollos Polaroid en blanco y negro.

## RESULTADOS

En 48 de las 62 familias analizadas el fenotipo del caso índice correspondió a DMD, mientras que el de los 14 (22.6%) restantes fue DMB. En los 48 casos de DMD se observaron delecciones

en 14 (29%), mientras que hubo delección en 5 (36%) de los 14 casos con diagnóstico DMB. Del total de 62 familias, 19 presentaron delección, por lo que se puede afirmar que 31% de la población colombiana estudiada con DMD/DMB presentan delecciones en el gen de la distrofina (Cuadro 3).

En la mayoría de los afectados hubo correlación entre el corrimiento (*out frame*) o no corrimiento (*in frame*) del marco de lectura traduccional y el cuadro clínico severo (DMD) y leve (DMB), respectivamente. Los afectados DM1, 2, 3, 12, 18, 24, 39, 43, 46 y 65 mostraron delecciones del tipo *out frame* con fenotipos DMD. Por otra parte, los afectados con delecciones *in frame*, como los casos DM7, 29, 57, 58 y 79 presentaron DMB. La correlación del global del genotipo con el fenotipo fue 79%, pues los casos DM 9, 17, 44 y 55

presentaron el fenotipo severo pero tuvieron mutaciones *in frame*.

En un informe preliminar de este estudio<sup>31</sup>, se presentaron los resultados analizados con dos sistemas múltiple uno de 9 exones y otro de 5 exones, donde se analizaron 17 de las 27 familias por biología molecular, encontrando un porcentaje de delecciones detectables en 50% de las familias analizadas.

## DISCUSIÓN

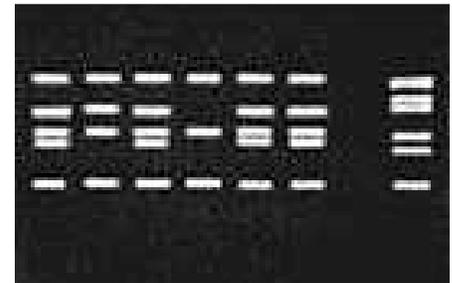
El hallazgo de una mutación en una secuencia específica de ADN, permite clasificar correctamente un diagnóstico genérico de DM en una de las distintas enfermedades específicas, p.e., DMD/DMB<sup>32</sup>. En el caso específico de DMD/DMB, además de confirmar el diagnóstico clínico, el hallazgo de mutaciones específicas del gen de la distrofina permite establecer en la mayoría de los casos, una correlación genotipo-fenotipo, ayuda a predecir el cuadro clínico del paciente, información que es esencial para el médico, el paciente y sus familiares<sup>21</sup>.

Como se ha descrito antes, hay dos regiones proclives a delecciones en el gen de la distrofina<sup>19</sup>. En la presente cohorte se observaron delecciones del gen de la distrofina en 19 de 62 casos índice (31%). Al igual que en la literatura, en este trabajo se observa que 90% de las delecciones se presentaron en las dos regiones proclives: en los exones 1 al 19 se observaron 32%, mientras que 58% presentaron delecciones en los exones 44 al 53. Dos (10%) afectados mostraban delecciones que comprometían ambas regiones proclives, pero no escaparon al diagnóstico con el grupo de cebadores que amplifican los 18 exones propuestos en la literatura<sup>18</sup>.

La frecuencia global de delecciones descritas en el presente trabajo es más baja que la media calculada (70%)<sup>33,34</sup> y la de varias poblaciones individuales

**Cuadro 3**  
**Resultados y correlación genotipo-fenotipo**

N° estudio	Resultados	Fenotipo observado	Tipo de mutación	Fenotipo esperado
DM 1	Del: 47-50	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 2 <sup>a</sup>	Del: 48-50	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 3	Del: 48-50	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 4	Completo	Duchenne		
DM 5	Completo	Becker		
DM 7	Del: 12-45	Becker	<i>In frame</i>	Becker
DM 8	Completo	Duchenne		
DM 9	Del: 8-19	Duchenne	<i>In frame</i>	Becker
DM 10	Completo	Becker		
DM 11	Completo	Duchenne		
DM 12	Del 3-17	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 14	Completo	Becker		
DM 15	Completo	Duchenne		
DM 16	Completo	Becker		
DM 17	Del: 3-19	Duchenne	<i>In frame</i>	Becker
DM 18	Del 52	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 19	Completo	Duchenne		
DM 20 <sup>b</sup>	Completo	Duchenne		
DM 22 <sup>a</sup>	Completo	Duchenne		
DM 23	Completo	Duchenne		
DM 24	Del:48-50	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 25	Completo	Duchenne		
DM 26	Completo	Duchenne		
DM 28	Completo	Becker		
DM 29	Del 3	Becker	<i>In frame</i>	Becker
DM 30	Completo	Duchenne		
DM 31	Completo	Duchenne		
DM 32	Completo	Duchenne		
DM 33	Completo	Duchenne		
DM 36	Completo	Duchenne		
DM 37	Completo	Duchenne		
DM 39	Del 8-51	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 40	Completo	Duchenne		
DM 43	Del 6	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 44	Del 48-51	Duchenne	<i>In frame</i>	Becker
DM 45	Completo	Duchenne		
DM 46	Del 51	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 47	Completo	Duchenne		
DM 48	Completo	Duchenne		
DM50 <sup>a</sup>	Completo	Becker		
DM 51	Completo	Duchenne		
DM 52	Completo	Duchenne		
DM 53	Completo	Becker		
DM 54	Completo	Duchenne		
DM 55	Del 8-19	Duchenne	<i>In frame</i>	Becker
DM 57 <sup>a</sup>	Del 48	Becker	<i>In frame</i>	Becker
DM58	Del 45-48	Becker	<i>In frame</i>	Becker
DM62	Completo	Duchenne		
DM 63	Completo	Duchenne		
DM 64	Completo	Duchenne		
DM 65	Del 50	Duchenne	<i>Out frame</i>	Duchenne
DM 67	Completo	Becker		
DM 68	Completo	Duchenne		
DM 69	Completo	Duchenne		
DM 70	Completo	Duchenne		
DM 73	Completo	Duchenne		
DM 74	Completo	Duchenne		
DM 75	Completo	Duchenne		
DM 76	Completo	Duchenne		
DM 77 <sup>a</sup>	Completo	Duchenne		
DM 78	Completo	Becker		
DM 79	Del 46-47	Becker	<i>In frame</i>	Becker



**Gráfica 3. Gel page 8%. Resultado de la amplificación con el sistema 5 plex. Columna 1. Marcador puc18. Columna 2: Blanco de amplificación (no se observa producto amplificado). Columna 3: Control normal de amplificación con el sistema 5 plex presenta cinco bandas correspondientes a los productos amplificados del PM: 535 pb y de los exones 43: 357 pb, 50: 271 pb, 13: 238 pb y 52: 113 pb, Columna 4: Paciente DM6: Patrón de amplificación completo. Columna 5: DM7 delección exones 13 y 43. Columna 6: Paciente DM8 completo. Columna 7: DM9 delección exón 13. Columna 8: DM10: Patrón de amplificación completo; el paciente no presenta delección en ninguno de los exones analizados.**

(Cuadro 4); sin embargo, es similar con los porcentajes informados en otros estudios de Latinoamérica que incluyen series publicadas en Argentina<sup>35</sup> y Venezuela<sup>36</sup>; esto obliga a pensar que para la población colombiana el porcentaje esperado de duplicaciones, mutaciones puntuales e inversiones, debe ser más alto que el promedio descrito a nivel mundial<sup>16,37</sup>.

En el Cuadro 3 se observa que los afectados con grandes delecciones que no interrumpen el marco de lectura, presentan la forma leve o DMB, de donde se concluye que la severidad de la enfermedad se determina más por el efecto intragénico que tiene la mutación sobre la proteína que por la extensión de la delección.

Del total de casos analizados se observó concordancia entre el genotipo y el fenotipo en 79% y al igual que en otras poblaciones, las mutaciones *out frame* correspondieron al fenotipo severo de la enfermedad<sup>29,35</sup> (Cuadro 5). La excepciones a estas correlaciones

a. Familias con dos afectados; b. familia con tres afectados. En 19 de los 62 casos se encontraron delecciones detectables; en 10 de ellos la mutación fue del tipo *out frame* es decir, una mutación con corrimiento del marco de lectura; mientras que los otros 9 tuvieron mutación *in frame*, en los cuales no hubo corrimiento del marco de lectura.

**Cuadro 4**  
**Comparación de deleciones en pacientes DMD/DMB de diferentes poblaciones<sup>a</sup>**

Población	Proporción de pacientes con deleciones (%)	Deleciones en la región proximal (exones 1-20) (%)	Deleciones en los exones centrales (44-53) (%)
Chinos	45.0	46.0	54.0
Alemanes	59.7	7.5	92.5
Japoneses	43.0	21.3	76.6
Rusos	41.0	26.7	73.5
Turcos	45.6	10.8	89.2
Israelitas	37.0	22.0	78.0
Griegos	54.4	26.5	73.5
Españoles	38.5	20.0	80.0
Hindúes (Norte)	72.7	15.9	81.8
Brasil	87.5 <sup>b</sup>	47.5	52.5
Argentina	32.0 <sup>c</sup>	34.0	64.0
Venezuela	37.0 <sup>d</sup>	23.0	77.0
<b>Colombia (presente estudio)</b>	<b>31.0<sup>e</sup></b>	<b>32.0</b>	<b>58.0</b>

a. Tomado de Singh V, *et al.*<sup>46</sup> b. Werneck LC, *et al.*<sup>12</sup> c. Baranzini SE *et al.*<sup>35</sup>  
 d. Delgado LW *et al.*<sup>36</sup> e. La sumatoria de los porcentajes en la población no es igual a 100, esto se debe a que dos pacientes (DM7 y DM39) quienes representan 10%, tuvieron una deleción que involucra los dos puntos calientes, por tanto no se incluyeron sus deleciones dentro de ninguno de los dos puntos proclives.

**Cuadro 5**  
**Correlación genotipo-fenotipo**

Frecuencia de correlación genotipo-fenotipo (%)	Población	Investigadores
75	India	Mittal A <i>et al.</i> <sup>44</sup>
80	India	Mittal B <i>et al.</i> <sup>47</sup>
92	Japón	Takehima Y, Matsuo M. <sup>42</sup>
92	Caucásicos americanos	Koenig M <i>et al.</i> <sup>27</sup>
90	Caucásicos americanos	Mónaco AP <i>et al.</i> <sup>48</sup>
<b>79</b>	<b>Colombia</b>	<b>Presente estudio</b>

pueden ser el resultado de alteraciones en los patrones de *splicing*, mutaciones *in frame* que generan codones prematuros de parada, restituciones del marco de lectura en mutaciones *out frame* en los exones del 3 al 7, entre otras<sup>38-41</sup>.

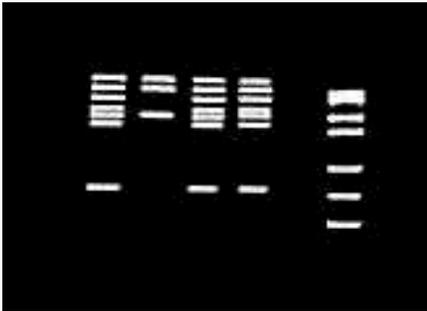
En la población colombiana las excepciones a la correlación genotipo-fenotipo se dieron en pacientes con mutaciones *in frame*, cuyo fenotipo fue DMD, 3 de ellos con deleción del exón 19. El fenotipo se puede explicar si se tiene en cuenta que al interior de las 88 pb que forman parte el exón 19, se encuentra una secuencia de control de 52 pb, que actúa como señal en *cis* para la regulación del *splicing* del ARN he-

terogéneo nuclear, conduciendo el buen ensamblaje del spliceosoma, para que se dé un correcto ARN mensajero, que codifica para la distrofina<sup>42</sup>. Los elementos que actúan en *cis*, interactúan con elementos *trans* (como ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares y otras proteínas auxiliares) y también dirigen el ensamblaje correcto del spliceosoma. El exón 19 además, tiene una región rica en purinas, que corresponde a una secuencia de reconocimiento de exones (ERS). Las ERS son necesarias para el *splicing* del exón inmediatamente anterior<sup>43</sup> y promueven la inclusión (del exón 18) dentro del ARNm maduro por medio de una selección correcta de los



**Gráfica 4. Amplificación 2 plex. 1. Puc 18 cortado con MSPI. 2: Blanco. 3: Control normal: exon 8 (360 pb) y exón 44 (268 pb). 4: DMD 2: completo. 5: DMD 8: Completo. 6: DMD 9: deleción exón 8. 7: DMD 10: Completo. 8: DMD 7: Deleción exón 44.**

sitios de corte. Esto sugiere que las deleciones que afectan los ERS, promueven una maduración errónea del ARNm, que a su vez conduce a un producto proteico alterado. Una isoforma conocida de la distrofina es la distrofina Kobbée producida por un gen que contiene una deleción de esa región de 52 pb dentro del exón 19, produciéndose un error en el *splicing*, aun cuando las secuencias 5' y 3' terminales del exón estén presentes<sup>43</sup>.



Gráfica 5. Amplificación 7 plex. 1. Puc 18 cortado con MSPI. 2. Blanco de amplificación. 3. Control normal 7 plex: Exón 45 (547 pb), Exón 48 (506 pb), Exón 19 (459 pb), Exón 17 (416 pb), Exón 51 (388 pb), Exón 12 (331 pb), Exón 4 (196 pb). 4. DMD 15: completo; 5. DMD 17: Delección exones 17, 19, 12 y 4. Carril 6: DMD 52: Completo.

El otro paciente (DMD)<sup>44</sup> tuvo una delección *in frame* que afectó los exones 48 al 51; sin embargo, el fenotipo de este paciente es severo (DMD), esto se puede atribuir a la generación de un codón de parada prematuro como consecuencia de la delección, lo cual se puede corroborar mediante el análisis de la expresión del ARNm<sup>12,44</sup>.

En conclusión, y porque este es el trabajo con mayor número de pacientes informados en Colombia, se puede afirmar que los afectados colombianos con DMD/DMB presentan un menor número de mutaciones por delecciones que la media universal y que inversamente, los casos debidos a otro tipo de mutaciones son más frecuentes aunque aún no se han estudiado en el país. Las delecciones se localizan en los dos puntos proclives en el gen de la distrofina, como se ha descrito en otros estudios y el juego de 18 *primers* propuesto en la literatura es adecuado para la identificación de delecciones en Colombia. Por último, la correlación entre el genotipo y el fenotipo fue posible en la mayor parte de los pacientes, bajo la hipótesis del CMLT y se puede utilizar como herramienta para establecer el diagnóstico y pronóstico de los afectados.

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Alvaro Izquierdo y al Instituto Franklin Delano Roosevelt por el envío de pacientes y su confianza en los autores; a la Asociación Colombiana de Distrofia Muscular por su respaldo, confianza y colaboración; al Instituto de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina, Universidad del Rosario por el respaldo, tiempo y financiación para el desarrollo de este trabajo.

## SUMMARY

**Introduction:** A genotype-phenotype correlation was established by dystrophin gene deletion analysis in Duchenne and Becker muscular dystrophies patients (DMD/BMD).

**Objectives:** To establish a correlation between molecular genotype and clinical phenotype in a Colombian population.

**Materials and methods:** A PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of 18 exons (included in the two hot spots regions) was performed in 62 affected families.

**Results:** Nineteen patients showed deletions in several exons of the dystrophin gene. This corresponds to 31% of analyzed males in the present population.

**Conclusions:** For each DMD/DMB affected male with deletion in the dystrophin gene, a correlation between disease severity and extent of deletion was established. The data showed that most out-frame deletions cause DMD phenotype, while the in-frame deletions results in BMD phenotype. This correlation was described by Koenig in his "open reading frame hypothesis". In the present study it was possible to establish a direct correlation between mutation state and clinical severity in 79% of patients. This may help clinical

evaluation of DMD/DMB patients.

**Key words:** Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD/DMB); Multiplex polymerase chain reaction (PCR); Open reading frame hypothesis; X-linked diseases.

## REFERENCIAS

1. Emery AEH, Emery MLH. *The history of a genetic disease: Duchenne muscular dystrophy or Meryon disease*. London: Royal Society of Medicine; 1995.
2. Kenneth LT. Origins and early description of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2003; 28: 402-422.
3. Darras BT. Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Pediatr* 1990; 117: 1-15.
4. Lai PS, Takeshima Y, Adachi K, et al. Comparative studies on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J Hum Genet* 2002; 47: 552-555.
5. Becker PE, Kiener F. Eine neue x-chromosomale Muskeldystrophie. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten Berlin* 1955; 193: 427-448.
6. Becker PE. Neue Ergebnisse der Genetik der Muskeldystrophien. *Acta Gen Statist Med* 1957; 7: 303-310.
7. Emery AEH. Oxford monographs on medical genetics. Vol. 24. *In Duchenne muscular dystrophy*. Oxford: Oxford University Press; 1993. p. 539-563.
8. Thompson M, McInnes R, Willard H. *Genetics in medicine*. Chapter 18. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991. p. 395-401.
9. Verellen-Dumolin C, Freund M, DeMeyer R, et al. Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. *Hum Genet* 1984; 67: 115-119.
10. Ibraghimov-Beskrovnyaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, et al. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; 355: 696-702.
11. Den Dunnen JT, Grootsholten E, Blondin H, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 116 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 835-847.
12. Werneck LC, Scola RH, Maegawa GH, et al. Comparative analysis of PCR-deletion detection and immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 2001; 103: 115-120.

13. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormality in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989; 2: 1019-1029.
14. Shomrat R, Gluck E, Legum C, et al. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 1994; 49: 369-373.
15. Lai PS, Takeshima Y, Adachi K, et al. Comparative study on deletions of the dystrophin gene in three Asian populations. *J Hum Genet* 2002; 47: 552-555.
16. Chaturvedi LS, Mukherjee M, Srivastava S, et al. Point mutation in Duchenne/Becker muscular dystrophy (D/BMD) patients. *Exp Mol Med* 2001; 33: 251-256.
17. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11141-11157.
18. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al. Detection of 98-percent DMD/DMB gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86: 45-48.
19. Beggs AH, Kunkel LM. A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1931.
20. Yau SC, Roberts RG, Borrow M, Mathew CG. Direct diagnosis of carriers of point mutations in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 1993; 34: 273-275.
21. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. In the molecular basis for Duchenne vs. Becker muscular dystrophy: correlations of severity with type deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506.
22. Matsumura K, Campbell K. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 1994; 17: 2-15.
23. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991; 18: 298-300, 302.
24. Chamberlain J. The dynamics of dystroglycan. *Nat Genet* 1999; 23: 256-258.
25. Sweeney HL, Barton ER. The dystrophin-associated glycoprotein complex: what parts can you do without? *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13464-13466.
26. Sciandra F, Bozzi M, Bianchi M, et al. Dystroglycan and muscular dystrophies related to dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita* 2003; 39: 173-181.
27. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. In the molecular basis for Duchenne vs. Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506.
28. Beggs AH, Koenig M, Boyce B, Kunkel LM. Detection of 98-percent DMD/DMB gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86: 45-48.
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 280.
30. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11141-11156.
31. Restrepo CM, Correal MC, Gonzáles A, et al. Mutaciones en el gen de la distrofina en la distrofia muscular ligada al sexo en una población colombiana. Correlación clínico molecular. *Cron Cien* 1997; 19-56.
32. Espinosa de los Monteros LE. Polymerase chain reaction (PCR) in clinical diagnosis. Review of the use of the technique. *Rev Latinoam Microbiol* 1993; 35: 225-230.
33. Al-jumah M, Majumdar R, Al-rajeh S, et al. Deletion mutations in dystrophin gene of Saudi patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Saudi Med J* 2002; 23: 1478-1482.
34. Flanigan KM, Niederhausern A, Dunn DM, et al. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 931-939.
35. Baranzini SE, Giliberto F, Herrera M, et al. Deletion patterns in Argentine patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol Res* 1998; 20: 409-414.
36. Delgado LW, Pineda-Del VL, Borjas L, et al. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Venezuela patients with the polymerase chain reaction. *Clin Invest* 1994; 35: 195-207.
37. Eranslan S, Kayaserili H, Apak MY, Kirdar B. Identification of point mutations in Turkish DMD/DMB families using multiplex-single stranded conformation analysis (SSCA). *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 765-770.
38. Takeshima Y, Nishio H, Sakamoto H, et al. Modulation of *in vitro* splicing of the ppstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from de dystrophin ene in dystrophin Kobe. *J Clin Invest* 1995; 95: 515-520.
39. Deutekom V, Bremmer-Bout M, Janson A, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patients derived muscle cells. *Hum Mol Gen* 2001; 10: 1547-1554.
40. Winnard AV, Klein CJ, Coovert DD, et al. Characterization of translational frame exception patients in DMD/DMB. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 737-744.
41. Restrepo CM, Correal CC, Gonzáles A, et al. Análisis de las deleciones del gen de la distrofina en 28 pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Becker (DMB). Memorias III Congreso Colombiano de Genética, Sociedad Colombiana de Genética. Medellín noviembre de 1998.
42. Takeshima Y, Matsuo M. Molecular genetics and problems found in genetic diagnosis of Duchenne Becker muscular dystrophy. *Nippon Rinsho* 1997; 55: 3120-3125.
43. Tanaka K, Watakabe A, Shimura Y. Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1347-1354.
44. Mital A, Kumari D, Gupta M, Goyle S. Molecular characterisation of Duchenne muscular dystrophy and phenotypic correlation. *J Neurol Sci* 1998; 157: 179-186.
45. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, et al. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993; 16: 536-538.
46. Singh V, Sinha S, Mishra S, et al. Proportion and pattern of dystrophin gene deletions in north Indian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Genet* 1997; 99: 206-208.
47. Mittal B, Singh V, Mishra S, et al. Genotype-phenotype correlation in Duchenne/Becker muscular dystrophy patients seen at Lucknow. *Indian J Med Res* 1997; 105: 32-38.
48. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2: 90-95.