

# Diagnóstico molecular in útero de distrofia muscular de Duchenne

Drs. Alisandra Morales de Machín\*, Wilmer Delgado\*, Lisbeth Borjas de Fajardo\*,  
María Luisa Hernández\*\*, William Zabala\*, Ernesto Solís\*

## RESUMEN

**Objetivo:** Identificar el estado de portadora de mujeres gestantes con historia familiar de distrofia muscular tipo Duchenne mediante análisis molecular indirecto y diagnosticar si sus fetos varones estaban afectados o no con esta enfermedad

**Métodos:** Se analizaron 9 muestras de DNA correspondientes a 3 gestantes, 2 fetos, 2 cónyuges, 1 varón afectado y 1 varón sano. A través de la reacción en cadena de la polimerasa, se amplificaron secuencias de los polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (STRs) de los intrones 44, 45, 49, 50, y 3'DYS del gen de la distrofina;

**Ambiente:** Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia (UGM-LUZ).

**Resultados:** se pudieron elaborar los haplotipos respectivos en las personas clave de la familia afectada, que permitieron identificar en las 3 gestantes al cromosoma X portador de la mutación responsable de esta enfermedad, logrando diagnosticar 1 feto varón afectado con distrofia muscular tipo Duchenne y 1 feto femenino no portadora.

**Conclusion:** Las nuevas técnicas diagnósticas a nivel molecular en gestantes con enfermedades hereditarias permiten el diagnóstico in útero de enfermedades genéticas.

**Palabras clave:** Diagnóstico prenatal. Distrofia muscular Duchenne. Reacción en cadena de la polimerasa. Mutaciones. Polimorfismos.

## SUMMARY

**Objective:** To perform the molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy carrier status in pregnant women and male fetuses affected or not.

**Methods:** Molecular analysis for Duchenne muscular dystrophy was performed in 9 DNA samples from 3 pregnant women, 2 fetuses, 2 spouse, 1 affected and 1 healthy male. Using the polymerase chain reaction. Was amplified fragments STRs (short tandem repeat) of introns 44, 45, 49, 50 y 3'DYS of the dystrophin gene; so, we were able to build the haplotypes for each one of the key members in the familie affected.

**Setting:** Medical Genetic Unit of the University of Zulia (UGM-LUZ).

**Results:** The study allowed us to identify, in the 3 pregnant women, the mutant X chromosome responsible of Duchenne muscular dystrophy, thus, prenatal diagnosis was possible with the following results: 1 affected male fetuse with Duchenne muscular dystrophy y 1 not carrier female fetuse.

**Conclusion:** The new molecular diagnostic techniques at molecular level in pregnant patients with hereditary diseases permit the diagnostic of genetic diseases.

**Key words:** Prenatal diagnosis. Duchenne muscular dystrophy. Polymerase Chain Reaction. Mutation. Polymorphism.

## INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular tipo Duchenne (DMD), es una enfermedad severa hereditaria, su mecanismo de transmisión es recesivo ligado al cromosoma X, afecta

a 1 de cada 3 500 varones nacidos vivos (1,2).

Se caracteriza por degeneración de las fibras musculares esqueléticas, debilidad muscular

\* Unidad de Genética Médica de La Universidad del Zulia (UGM-LUZ).

\*\* Cátedra de Histología y Embriología LUZ.

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC – 0395 – 02).

progresiva, compromiso cardíaco, lo que conduce a invalidez dentro de los primeros 10 años de vida y muerte por insuficiencia respiratoria o cardíaca en la segunda década de la vida (3).

El gen de la DMD se localiza en el brazo corto del cromosoma X en la región Xp21, tiene una longitud de 2,5 megabases (Mb). Codifica una proteína del citoesqueleto llamada distrofina (1). Aproximadamente 50 % a 60 % de los afectados tienen una delección de uno o más exones y aproximadamente el 6 % tiene duplicación de exones (4-6).

El diagnóstico a través del análisis del ácido desoxirribonucleico (DNA), consiste en detectar las mutaciones más frecuentes y si no están presentes realizar análisis indirecto, se ha desarrollado una estrategia, basada en el estudio de la segregación familiar de polimorfismos presentes en el DNA, independientes de la naturaleza de la mutación responsable de la enfermedad, lo que ha hecho posible identificar al cromosoma X portador del gen defectuoso. De esta manera, es posible establecer el diagnóstico indirecto molecular tanto de portadoras como del estado de afectación de nuevos casos familiares de DMD incluido el diagnóstico prenatal (7-9).

El objetivo de este trabajo fue identificar el estado de portadora de mujeres gestantes con historia familiar de DMD mediante análisis molecular indirecto y diagnosticar si sus fetos varones estaban afectados o no con esta enfermedad.

## MÉTODOS

Se estudiaron a 3 gestantes: 2 hermanas y 1 prima hermana, referidas a la consulta de diagnóstico prenatal de la Unidad de Genética Médica de LUZ (UGM-LUZ), pertenecientes a una familia con antecedente de DMD, estudiada previamente en la UGM-LUZ,

### Descripción de los casos

Primer paciente: gestante de 33 años de edad, natural de Ciudad Ojeda, Estado Zulia, Venezuela; I gesta, con embarazo de 15 semanas; antecedente de 3 primos hermanos y un sobrino con DMD. Su pareja tiene 35 años de edad.

Segundo paciente: gestante de 21 años de edad, natural de Ciudad Ojeda, Estado Zulia, Venezuela; II gesta, para I, con embarazo de 12 semanas; antecedente de 1 hijo y 3 primos hermanos con DMD. Su pareja tiene 24 años de edad.

Tercer paciente: gestante de 22 años de edad,

natural de Cabimas, Estado Zulia, Venezuela; II gesta, para I, con embarazo de 17 semanas; antecedente de 2 hermanos, 1 primo hermano y 1 primo segundo con DMD. Su pareja tiene 21 años de edad.

El diagnóstico de DMD en los familiares afectados fue realizado previamente, de acuerdo a las manifestaciones clínicas, examen físico, niveles plasmáticos de creatinquinasa (CK), electromiografía, estudio anatomopatológico de músculo y análisis molecular mutacional directo, primero con estuche de PCR 9 plex: 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51 y después con 5 plex: Pmf + 1, 13, 43, 50, 52 (10) e indirecto del gen de la distrofina.

A 2 gestantes se les realizó amniocentesis bajo monitorización ecográfica entre las 15 y 17 semanas de gestación, sin complicaciones, se obtuvieron entre 12 y 15 cm<sup>3</sup> de líquido amniótico y se extrajo DNA directamente de amniocitos sin cultivar y amniocitos cultivados, mediante la técnica descrita por Old (11). A la otra gestante no se le realizó porque resultó no portadora.

Se obtuvo DNA de 7 muestras, a partir de 200 µL de sangre periférica anticoagulada con EDTA 500 mM según técnica CTAB/DTAB (12). Dichas muestras incluían a las 3 gestantes, a 2 conyugues, un familiar varón afectado y un familiar varón sano.

Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de las gestantes estudiadas y la aprobación del Comité de Bioética de la UGM-LUZ.

### Análisis molecular

Previo al análisis mutacional indirecto del gen de la distrofina, a los 2 fetos se les realizó la identificación de género mediante análisis de la presencia de secuencias exclusivas del cromosoma Y (13), confirmado posteriormente a través de cariotipo fetal según técnica convencional.

Para el análisis de polimorfismos STRs en los intrones 44, 45, 49, 50 Y extremo 3' (3DYS) en el gen de la distrofina, se realizó PCR, (8), se utilizaron los iniciadores: 44/A: 5'-TCC-AAC-ATT-GGA-AAT-CAC-ATT-TCA-A-3', 44/B: 5'-TCA-TCA-CAA-ATA-GAT-GTT-CAG-3', 45/A: 5'-GAG-GCT-ATA-ATT-CTT-TAA-CTT-TGG-C-3', 45/B: 5'-CTC-TTT-CCC-TCT-TTA-TTC-ATG-TTA-C-3', 49/A: 5'-CGT-TTA-CCA-GCT-CAA-AAT-CTC-AAC-3', 49/B: 5'-CAT-ATG-ATA-CGA-TTC-GTG-TTT-TGC-3', 50/A: 5'-AAG-GTT-CCT-CCA-GTA-ACA-GAT-TTG-G-3', 50/B: 5'-TAT-GCT-ACA-TAG-TAT-GTC-CTC-AGA-C-3', 3DYS/A: 5'-GAA-AAG-ATT-GTA-AAC-TAA-AGT-GTG-CTT-TA-3',

3DYS/B: 5'-GGA-TGC-AAA-ACA-ATG-CGC-TTG-CCT-CTC-A-3'. Los productos amplificados se caracterizaron en geles de poliacrilamida al 5%. Para la visualización de las bandas del producto amplificado se utilizó un método de tinción con nitrato de plata.

Con el análisis molecular de la familia, se realizó la construcción de los haplotipos de cada uno de sus integrantes.

**RESULTADOS**

Se estudiaron 9 individuos: 3 gestantes en edades comprendidas entre 21 y 33 años de las cuales sólo 1 cumplía con criterios de ser portadora obligada y el resto no lo eran, 2 fetos, 1 familiar varón sano, 1 familiar varón afectado y 2 cónyuges.

Con el análisis molecular de la familia, se realizó la construcción de los haplotipos de cada uno de sus integrantes en primer grado o segundo grado según sea el caso; las diferencias detectadas por los polimorfismos entre dos regiones homólogas de un mismo par cromosómico permitieron seguir en un

árbol genealógico la herencia de cada uno de los miembros de dicho par, e identificar el cromosoma X portador de la mutación, al compararlo con su correspondiente familiar afectado (II 9) o familiar sano (II 8) (Figura 1). Se logró diagnosticar 1 gestante no portadora (II 2) y las 2 gestantes restantes (II 4) y (II 10) resultaron portadoras (Figura 1).

Se realizaron por análisis molecular 2 diagnósticos de género fetal, confirmados también por citogenética. Se identificó 1 feto varón afectado (III 3) y un feto femenino no portadora (III 5) al comparar el correspondiente haplotipo con el haplotipo del familiar afectado (II 9) y el del familiar sano (II 8) (Figura 1). Estos resultados fueron confirmados después del nacimiento, analizando muestras sanguíneas de los recién nacidos y a través de su evolución clínica.

**DISCUSIÓN**

Los avances en nuevas técnicas diagnósticas a nivel molecular en gestantes con enfermedades hereditarias han permitido satisfactoriamente el diagnóstico in útero de múltiples enfermedades genéticas.

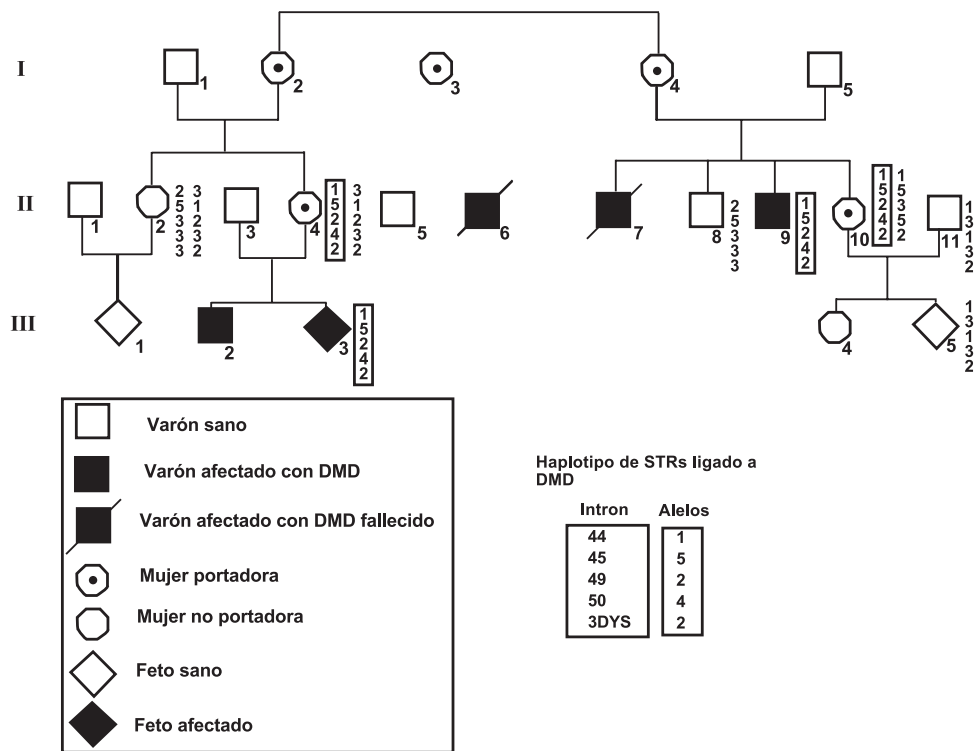


Figura 1. Genealogía mostrando haplotipo de polimorfismo de STRs ligados al gen de la distrofina en la familia estudiada con antecedente de distrofia muscular tipo Duchenne.

La adopción de una estrategia para realizar diagnóstico prenatal y de portadoras depende principalmente de la tecnología conocida y la disponibilidad de recursos del laboratorio particular y es un aspecto importante del asesoramiento genético y establecer el diagnóstico, complicaciones, evolución, pronóstico, riesgo de recurrencia en base al tipo de herencia, posible tratamiento, rehabilitación y manejo de afectados con DMD, son fundamentales para un correcto asesoramiento genético.

La detección de mujeres portadoras de DMD es de gran importancia, debido a que en estas enfermedades el mecanismo de transmisión hereditario es recesivo ligado al cromosoma X, y generalmente sólo se manifiestan en varones, transmitiéndose a través de mujeres portadoras asintomáticas y ellas tienen un riesgo de 50 % de tener un hijo varón afectado y 50 % de tener una hija portadora en cada embarazo (15), por lo que la identificación de género fetal es el primer paso que se realiza antes de efectuar el diagnóstico in útero de estas enfermedades. En este trabajo se diagnosticaron por análisis molecular 1 feto masculino y otro femenino confirmados por análisis citogenético.

Dentro del gen de la distrofina se han localizado diversos bloques repetitivos de STRs con diferentes niveles de información, por lo que pueden ser utilizados en el estudio de genes de enfermedades hereditarias y desarrollo del mapa genético humano (8). El análisis de los polimorfismos STRs localizados en los intrones 44, 45, 49, 50 y 3'DYS del gen de la distrofina y a través de la elaboración de los haplotipos respectivos en los familiares clave, se pudo demostrar el estado de portadoras en 2 gestantes y el de no portadora en 1 gestante, resultando las 3 heterocigotas informativas para al menos 2 ó 3 de los polimorfismos analizados, lo cual permitió realizar el diagnóstico de feto afectado con DMD en 1 caso y de feto femenino no portadora en el otro caso. El uso combinado de estos polimorfismos en las gestantes estudiadas generó resultados de 100% de heterocigotas (3/3).

Los resultados generales dieron un 66,66 % (2/3) de fetos sanos, lo que generó una reducción importante de los niveles de ansiedad en las parejas por el resto del tiempo de gestación, impidió además la realización de abortos ante el diagnóstico de feto sano, y con respecto a los padres del feto de sexo masculino afectado con DMD, los ayudó a tomar una decisión informada.

Este trabajo constituye el primer aporte en el Estado Zulia y a nivel nacional de diagnóstico prenatal de DMD a través del análisis molecular

de polimorfismos intragénicos ligados a este gen. Existe un reporte de descarte prenatal de la distrofia muscular de Duchenne, a través de estudio del tejido muscular fetal por microscopía de luz y electrónica, así como determinación histoquímica enzimática (deshidrogenasa láctica y succínica) e inmunohistoquímica (distrofina 1, distrofina 2 y espectrina) (16).

#### Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC – 0395 – 02).

#### REFERENCIAS

1. Abbs S. Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Diagnosis prenatal*. 1996;16:1187-1198.
2. Bakker E, Hofker MH, Goor N, Mandel, JL, Wrogemann K, Davies KE. Diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet*. 1985;1:655-658.
3. Scriver Ch, Blaudet A, Sly W, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7ª edición. Nueva York: Mac Graw Hill, INC; 1997;173.
4. Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Burghes AHM, Thompson MW, et al. Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am J Hum Genet*. 1989;45:507-520.
5. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989;45:498-506.
6. Upadhyaya M, Smith RA, Thomas NST, Norman AM, Harper PS. Intragenic deletions in 164 boys with Duchenne muscular dystrophy (DMD) studied with dystrophin cDNA. *Clin Genet*. 1990;37:456-462.
7. Ward P, Fielding J, Witkowski J, Baumbach L, Gunnell S, Speer J, et al. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: Prospective linkage analysis and retrospective dystrophin cDNA analysis. *Am J Hum Genet*. 1989;44:270-281.
8. Delgado-Luengo W, Borjas L, Zabala W, Fernández E, Solís-Añez E, Chávez C, et al. Detección de portadoras de distrofia muscular Duchenne/Becker a través del análisis de loci STRs ligados al gen de la distrofina en familias venezolanas. *Invest Clín*. 2002;43:239-254.
9. Rodríguez M, Ferreira R, Gayol L, Quintana J, Rendón R, Méndez D. Diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne mediante análisis del ácido desoxinucleotido y su aplicación en la prevención.

- Rev Cubana de Pediatría. 1996;68:1-9.
10. Delgado-Luengo W, Pineda-Del Villar L, Borjas L, Pons H, Morales-Machín A, Martínez-Basalo MC, et al. Diagnóstico molecular en pacientes venezolanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Invest Clín. 1994;35:195-207.
  11. Old J. Fetal DNA analysis. En: Davies KE, editor. A practical approach. Human Genetics Diseases; 1986.p.17.
  12. Gustincich S, Carminci P, Del Sal G, Mamfiolli G, Schneider C. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. Biotechniques; 1991;11:300-302.
  13. Kogan SC, Gitschier J. Genetic prediction of hemofilia A. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White D, editores. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc.; 1990.p.288-299.
  14. Alcántara M, García-Cavazos R, Hernández E, González-del Angel A, Carnevale A, Orozco L. Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. Ann Génétique. 2001;44:149-153.
  15. Peyvandi F, Jayandharan G, Candí M, Srivastava A, Nakaya S, Jonson M, et al. Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. Haemophilia. 2006;12:82-89.
  16. González G, Marín L, Martínez B, Julian B, Guevara F, Pulido A, et al. Descarte prenatal de la distrofia muscular de Duchenne. Rev Obstet Ginecol Venez. 1996;56:99-100.



## FUNDASOG DE VENEZUELA

### Brazo educativo e informativo de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela

Informa a los Miembros Afiliados de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela, que las próximas pruebas de conocimiento de la especialidad para optar a la categoría de Miembro Titular, se realizarán en el marco de los eventos de la Sociedad:

- **XXV Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología**, que se llevará a cabo del 10 al 13 de marzo de 2009, en el Hotel Crown Plaza Maruma, Maracaibo, Estado Zulia.

Características del examen:

1. Prueba escrita.
2. Un total de 100 preguntas de selección simple, 50 de Obstetricia y 50 de Ginecología.
3. Puntuación mínima para aprobación: 15/20 puntos.

#### Información:

Sede de la SOGV y FUNDASOG de Venezuela, Maternidad Concepción Palacios, Avenida San Martín, Caracas.  
Teléfono: +58-212-461.64.42 Fax: +58-212-451.08.95