

Diagnóstico Prenatal Molecular de Distrofia Muscular Duchenne*

Drs. Alisandra Morales de Machín, Wilmer Delgado, Lisbeth Borjas, Karile Méndez, William Zabala, Ernesto Solís, José Chacín, Karelis Urdaneta, Enrique Machín.

RESUMEN

Objetivo: Realizar diagnóstico prenatal molecular directo de distrofia muscular Duchenne.

Métodos: La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Genéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia. Maracaibo. La detección de deleciones en los fetos, se realizó utilizando los estuches de reacción de PCR múltiple 9-plex: 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51 y 5-plex: Pm, 13, 43, 50, 52.

Resultados: El estudio molecular detectó tres fetos masculinos afectados con distrofia muscular Duchenne y cuatro fetos masculinos sanos.

Conclusión: El diagnóstico prenatal molecular de distrofia muscular Duchenne es un importante aporte para la medicina preventiva y el asesoramiento genético.

Palabras Clave: Diagnóstico prenatal, Distrofia muscular Duchenne, Reacción en cadena de la polimerasa, Delección.

SUMMARY

Objective: Perform direct molecular prenatal diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy

Methods: The research was conducted at the Genetic Research Institute of the Faculty of Medicine. University of Zulia. Maracaibo. Detection of deletions in the fetuses was carried out by multiplex PCR, 9-plex: 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51 y 5-plex: Pm, 13, 43, 50, 52.

Results: Molecular analysis detected three affected males fetuses with Duchenne muscular dystrophy and fourth healthy males fetuses.

Conclusion: Molecular prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy has become an important tool for preventive medicine and genetic counseling.

Key words: Prenatal diagnosis, Duchenne muscular dystrophy, Polymerase chain reaction, Deletion.

INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular Duchenne (DMD), es una enfermedad severa hereditaria, su mecanismo de transmisión es recesivo ligado al cromosoma X, afecta a 1 de cada 3500 varones nacidos vivos (1).

Los varones con DMD suelen empezar la sintomatología entre los 3 y los 5 años. Se caracteriza por degeneración de las fibras musculares esqueléticas, debilidad muscular

progresiva, pérdida de la deambulacion entre los 10 y 12 años; el deterioro posterior lleva a lordosis lumbar, contracturas articulares y muerte por insuficiencia respiratoria o cardiaca, generalmente antes de los 20 años de vida. La distrofia muscular Becker (BMD), es una forma alélica menos severa, la edad media de inicio es de 11 años, con pérdida de la deambulacion después de los 16 años y una frecuencia de 1:30 000 varones nacidos vivos (1 - 3).

El gen de la DMD se localiza en el brazo corto del cromosoma X, en la región Xp21, tiene 79 exones en una longitud de 2,5 megabases (4, 5). Codifica una proteína llamada distrofina, una proteína del citoesqueleto que, junto a las glicoproteínas asociadas

Instituto de Investigaciones Genéticas de La Universidad del Zulia (IIG-LUZ). * Trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC - 0395 - 02).

a la distrofina (DAG), une la membrana sarcolemal con la matriz extracelular. El papel de la distrofina en la membrana sarcolemal del músculo aún no está claro, su distribución en la superficie del sarcolema e interacción con las DAG puede actuar a manera de anclaje y protección del músculo durante la contracción y relajación del mismo (1, 6 - 8). Aproximadamente, 60 % de los afectados tienen una delección de uno o más exones y, aproximadamente, 6 % tiene duplicación de exones (1). La localización de las delecciones se distribuye principalmente en dos regiones llamadas: punto caliente menor que incluye los exones 2 a 20 y punto caliente mayor que incluye los exones 44 a 53 (9, 10).

Chamberlain y col. (11) y Beggs y col. (9), desarrollaron un método, mediante el uso de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar delecciones dentro del gen de la distrofina. Las frecuencias reportadas en diferentes poblaciones, utilizando PCR, varían en función del número de iniciadores utilizados y de la frecuencia poblacional de las distintas mutaciones dentro del gen, situándose entre 37 % y 98 % (9, 11 - 18). En Venezuela, se encontró 37,5 % de delecciones intragénicas y 77 % de ellas estuvo localizado en la región comprendida desde el exón 44 al 55 (19).

El diagnóstico prenatal de DMD a través del ácido desoxirribonucleico (ADN), consiste, en detectar, por demostración directa, las mutaciones más frecuentes del gen y, si no están presentes, realizar análisis indirecto del gen a través de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (20).

La demostración directa de las mutaciones del gen puede realizarse de biopsia de vellosidades coriales o de amniocitos, por PCR, basado en tamizaje de delecciones (20), y/o transferencia Southern, basado en el tamizaje de delección/duplicación (21).

El objetivo de este trabajo fue realizar diagnóstico prenatal molecular directo de DMD.

MÉTODOS

Se estudiaron los fetos, de gestantes pertenecientes

a familias con antecedente de DMD, referidas en el lapso de 1993 a 2002; dichas familias fueron estudiadas previamente en el Instituto de Investigaciones Genéticas de LUZ (IIG-LUZ), donde se les realizó historia clínica familiar, con su respectiva genealogía.

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 directo. En los familiares afectados, se identificó la mutación causante de la enfermedad.

A las gestantes y sus parejas se les realizó asesoría genética pre-diagnóstico prenatal, el cual incluyó condiciones de riesgo del embarazo, limitaciones de la técnica invasiva a utilizar para obtener muestra fetal para el análisis de ADN, ventajas y riesgos de complicaciones.

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

Se realizó amniocentesis, bajo monitorización ecográfica, entre las 15 y 17 semanas de gestación, se obtuvo entre 12 y 15 cc de líquido amniótico y se extrajo ADN directamente de amniocitos sin cultivar y de amniocitos cultivados, mediante la técnica descrita por Old (22).

Análisis molecular:

Previo al análisis de las delecciones del gen de la distrofina, a los fetos se les realizó la identificación de sexo mediante análisis de la presencia de secuencias exclusivas del cromosoma Y (23), confirmado posteriormente a través de cariotipo fetal según la técnica convencional.

El análisis molecular se realizó utilizando los estuches de reacción de PCR múltiple 9-plex y 5-plex, obtenidos del *Institute for Molecular Genetics*, del *Baylor College of Medicine*, Houston-Texas, USA. Estos estuches

contienen 9 y 5 pares de iniciadores respectivamente, para la amplificación de los exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51 y 13, 43, 50, 52 y la región promotora muscular (Pm), los cuales corresponden a los exones más frecuentemente delecionados, localizados a 500 y 1200 Kb a partir del extremo 5' (17, 19). Los productos amplificados se caracterizaron en gel de agarosa al 3 % que contenía 0,5 g/ml de bromuro de etidio y se procedió a la electroforesis a 3,7 V/cm, por 3 horas, en solución Tris Edta Borato (TBE) 1x. Terminada la electroforesis, se procedió al fotografiado y al análisis de los resultados (19).

Si alguna de las secuencias codificantes está delecionada en el gen del paciente, no se obtiene producto de amplificación. La ausencia de banda de amplificado se interpretó como evidencia de deleción del fragmento correspondiente.

RESULTADOS

Se realizó diagnóstico de diez fetos de ocho gestantes pertenecientes a cuatro familias con antecedente de DMD, gestantes con edades comprendidas entre 19 y 35 años de las cuales solo tres cumplían con criterios de ser portadoras obligadas y el resto portadoras a riesgo; cinco tenían un familiar afectado de primer grado, dos de primer y segundo grado y una de segundo y tercer

grado; en tres la mutación detectada en el familiar afectado fue: deleción de los exones 50,52; en dos deleción de los exones 4,8; en dos deleción del exón 51 y en una deleción de los exones 8, 12, 17, 19 (Tabla 1). A cada familia se le realizó genealogía. La figura 1 representa la genealogía de la familia con tres gestantes a quienes se realizó diagnóstico prenatal.

Se realizaron diez amniocentesis entre las 15 y 17 semanas de gestación, a dos gestantes se le realizó la amniocentesis en dos embarazos consecutivos. Se realizaron por análisis molecular diez diagnósticos de sexo fetal, confirmados también por citogenética, los diez fetos resultaron cromosómicamente normales. Se identificaron tres fetos femeninos y siete masculinos (Tabla 2).

El estudio molecular de la mutación reveló que tres fetos masculinos resultaron afectados; en su patrón molecular se evidenció la deleción de los exones 50 y 52 en uno, exones 4,8 en uno y deleción del exón 51 en uno (Tabla 2) y (Fig. 2).

Estos resultados fueron confirmados después del nacimiento, a través de análisis mutacional directo de los recién nacidos y a través de su evolución clínica y en el embarazo interrumpido se realizó análisis mutacional de muestra fetal.

Tabla 1
Características de las gestantes.

Familia	Gestante	Edad	Antecedente familiar	Deleción de exones	Portadora obligada
1	1	25	hermano, sobrino	50, 52	No
	2	20	hermano, hijo, sobrino	50, 52	Si
		23	hermano, hijo, sobrino	50, 52	Si
2	3	19	Tío, dos primos hermanos	50, 52	No
	4	35	Dos hijos	4,8	Si
	5	23	Dos hermanos	4,8	No
3	6	30	Hijo	51	No
	7	20	Hermano	51	No
4	8	23	Dos hijos	8,12,17,19	Si
		30	Dos hijos	8,12,17,19	Si

Datos en N (%) y X±DE. Chi cuadrado: *p=0,01.

DIAGNÓSTICO PRENATAL MOLECULAR DE DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE

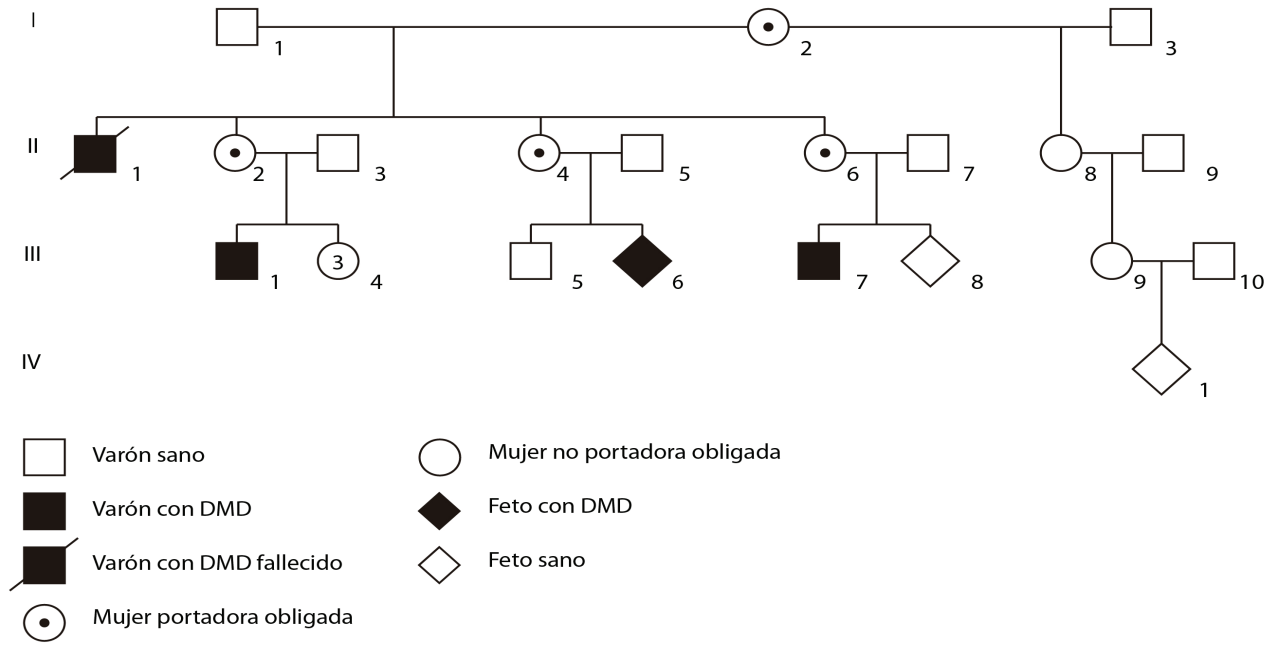
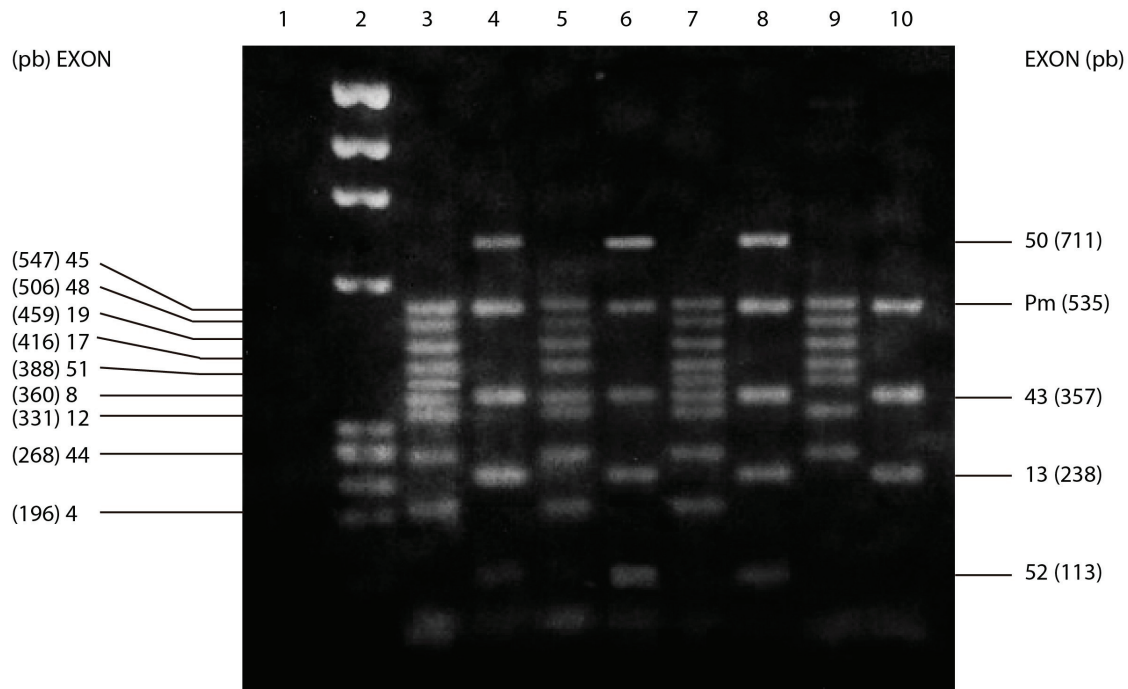


Figura 1
Genealogía de familia con antecedente de distrofia muscular de Duchenne.

Tabla 2
Amniocentesis. Sexo y Diagnóstico Molecular de los fetos.

Gestante	Amniocentesis Edad gestación	Sexo fetal Secuencia del Y		Cariotipo	Deleción de exones
		Masculino	Femenino		
1	17	X		46, XY	50, 52
2	17		X	46, XX	
	15	X		46, XY	
3	15	X		46, XY	
4	16	X		46, XY	4,8
5	15		X	46, XX	
6	17	X		46, XY	51
7	15	X		46, XY	
8	16		X	46, XX	
	15	X		46, XY	



1: control dle sistema (mezcla de reacción sin ADN)
 2: Marcador de peso molecular Ø174 x Hae III
 3,7: 9 plex sin deleción
 4,6,8: 5 plex sin deleción
 5: Deleción exon 51
 9: Deleción exones 4,8
 10: Deleciones exones 50,52

Figura 2.

Productos de amplificación con 5 plex y 9 plex del gen de la distrofina en fetos con DMD

DISCUSIÓN

La DMD, es una enfermedad producida por mutaciones recesivas del gen de la distrofina, ligada al cromosoma X. Una mutación recesiva ligada a X se expresa característicamente, de manera fenotípica, en todos los individuos de sexo masculino que la reciben, y solamente en los de sexo femenino que son homocigotos para la mutación. En consecuencia, los trastornos recesivos ligados a X generalmente afectan a los individuos de sexo masculino (24).

La DMD es una enfermedad grave discapacitante y en las etapas avanzadas de la enfermedad se presentan generalmente complicaciones ortopédicas y cardiorrespiratorias que son las causas principales

que ocasionan la muerte al paciente y los varones afectados terminan finalmente confinados en la cama y a menudo mueren al final de su pubertad o alrededor de los 20 años. Ya que los individuos afectados no sobreviven, generalmente, hasta la edad reproductiva, la enfermedad se transmite casi por completo por las portadoras femeninas sanas (24).

Se considera portadora obligada a la madre con dos o más hijos afectados, o un hijo afectado y antecedente familiar de la enfermedad o madre sin hijos afectados, pero con dos hijas portadoras obligadas. Portadora a riesgo (probable y posible) es la madre con CK normal, un hijo afectado e hijas con CK elevado, o hembras por línea materna con CK elevado o CK normal con afectados (25, 26).

En este trabajo se realizó diagnóstico prenatal en tres madres portadoras obligadas y en cinco portadoras a riesgo, posterior al diagnóstico de feto con DMD, dos de las portadoras de riesgo reunieron criterios para ser consideradas portadoras obligadas.

Las mujeres portadoras de DMD tienen un riesgo de 50 % de tener un hijo varón afectado y 50 % de tener una hija portadora en cada embarazo (24), por lo que la identificación de sexo fetal es el primer paso que se realiza antes de efectuar el diagnóstico prenatal de esta enfermedad. En este trabajo se diagnosticaron por análisis molecular siete fetos masculinos y tres fetos femeninos confirmados por análisis citogenético.

Las técnicas de diagnóstico molecular a través del análisis del ADN, identifican de manera directa o indirecta la mutación con una mayor precisión diagnóstica en comparación con otros métodos de laboratorio (25). Cualquier técnica utilizada para la evaluación directa de una mutación también se puede usar para diagnóstico prenatal (24).

El uso de PCR múltiple permite detectar deleciones de forma rápida y permite el asesoramiento genético a las familias de los pacientes afectados con DMD, proporcionando información que le permita comprender el diagnóstico médico y sus implicaciones en cuanto a pronóstico, mecanismo de transmisión hereditario, riesgo de desarrollarlo, transmitirlo, opciones existentes para afrontar los riesgos, posible tratamiento, la prevención, ya que no existe hasta el momento cura para esta enfermedad.

La aplicación exclusiva del método directo para el diagnóstico prenatal en aquellas familias con deleciones en el gen DMD presenta como ventaja fundamental, desde el punto de vista estratégico, que facilita la implantación de un programa, pues solo requiere de la caracterización previa de la deleción en un familiar enfermo.

Los resultados generales reportaron 70 % (7/10) 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 de los tres fetos de sexo masculino afectados con DMD, los ayudó a tomar una decisión informada, una pareja optó por la interrupción del embarazo y dos por prevenir complicaciones y mejorar la calidad de vida de estos niños, a través del manejo multidisciplinario para el reconocimiento de las manifestaciones multisistémicas primarias y las complicaciones secundarias de DMD, con el objetivo de retrasar la progresión de la enfermedad.

Este trabajo constituye el primer aporte en el Estado Zulia y a nivel nacional de diagnóstico prenatal molecular directo de DMD. Existe un reporte de descarte prenatal de la distrofia muscular 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) (27). También se ha reportado diagnóstico prenatal molecular indirecto de DMD (28)

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

A Enrique Alejandro Machín Morales, por su gran aporte

REFERENCIAS

1. Worton R, Brooke M. The X-linked muscular dystrophies. In: Scriver Ch, Blaudet A, Sly W, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7a edición. New York: Mac Graw-Hill, INC; 1997. p. 4195 - 4226.
2. Turnpenny P, Ellard S. Trastornos monogénicos. En: Emery. Elementos de genética médica. 13a edición. España. Editorial Elsevier; 2009. p. 284 - 305.
3. 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 (4): 498 - 506.
4. Davies K, Pearson P, Harper P, Murray J, O'Brien T. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne Muscular Dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acid Res.* 1983; 11 (8): 2303 - 2312.

5. Kingston H, Sarfarazi M, Thomas N, Harper P. Localization of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum Genet.* 1984; 67 (1): 6 - 17.
6. Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y, Noguchi S. Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 1711-1716.
7. Campbell K. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton – extracellular matrix linkage. *Cell.* 1995; 80 (5): 675 - 679.
8. Straub V, Campbell K. Muscular dystrophies and the dystrophin – glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol.* 1997; 10 (2): 166-175.
9. Beggs A, Koenig M, Boyce F, Kunkel L. Detection 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 1990; 86 (1): 45 - 48.
10. Blake D, Weir A, Newey S, Davies E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002; 82 (2): 291 - 329.
11. Chamberlain J, Gibbs R, Ranier J, Nguyen P, Caskey C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16 (23): 11141-11156.
12. Chamberlain J, Gibbs R, Ranier J, Caskey C. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, eds. *PCR protocols. A guide to methods and application.* San Diego: Academic Press Inc.; 1990. p. 272 - 281.
13. Shomrat R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker Muscular Dystrophy patients. *Am J Med Genet.* 1994; 49 (4): 369 - 373.
14. Sugino S, Fujishita S, Kamimura N, Matsumoto T, Wapenaar M, Deng H, et al. Molecular genetic study of Duchenne and Becker muscular dystrophies: deletion analysis of 45 Japanese patients and segregation analysis in their families with RFLPs based on the data from normal Japanese females. *Am J Med Genet.* 1989; 34 (4): 555-561.
15. Coral-Vázquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman S, Salamanca F, et al. Analysis of Dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res.* 1993; 24 (1): 1-6.
16. Kheradmand kia S, Forhud D, Zeinali S, Mowjoodi A, Najmabadi H, Pourfarzad F, et al. Molecular analysis of Iranian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Iranian J Publ Health.* 2003; 32 (3): 47 - 53.
17. Covone A, Caroli F, Romeo G. Screening Duchenne and Becker muscular Dystrophy patients for deletions in 30 exones of the dystrophin gene by three-multiplex PCR. *Am J Hum Genet.* 1992; 51 (3): 675 - 677.
18. Haider M, Bastaki L, Habid Y, Moosa A. Screening 25 dystrophin gene exons for deletions in Arab children with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Hered.* 1998; 48 (2): 61 - 66.
19. 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 (4): 195 - 207.
20. Abbs S. Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Prenat Diagn.* 1996; 16 (13): 1187 - 1198.
21. Lee K. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Thai J Obstet Gynecol.* 2001; 13 (2): 57 - 64.
22. Old J. Fetal DNA analysis. In: Davies KE, ed. *Human Genetics Diseases: A practical approach.* Oxford: IRL Press; 1986. p 1 - 17.
23. Kogan S, Gitschier J. Genetic prediction of hemofilia A. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White D, eds. *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press, Inc.; 1990. p 288 - 299.
24. Nussbaum R, McInnes R, Willard H, eds. *Thompson & Thompson. Genética en Medicina. 7a edición.* España: Editorial Elsevier Masson; 2008.
25. Canún S. Trastornos ligados al cromosoma X. En: J Guízar-Vázquez. *Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 3a edición.* México: Editorial El manual moderno; 2001. p. 225 - 250.
26. 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 (4): 239 - 254.
27. González G, Marín L, Martínez B, Julián B, Guevara F, Pulido A, et al. Descarte prenatal de la distrofia muscular de Duchenne. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 1996; 56 (2): 99 - 100.
28. Morales-Machín A, Delgado W, Borjas L, Hernández M, Zabala W, Solís E. Diagnóstico molecular in útero de Distrofia Muscular de Duchenne. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2008; 68 (4): 228 - 232.