



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PACIENTES PERUANOS
CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DISTROFINOPATÍA Y
VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA MLPA COMO PRUEBA
MOLECULAR DIAGNÓSTICA CONFIRMATORIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR 2014-2016**

**PRESENTADO POR
FRANCIA DEL PILAR HUAMAN DIANDERAS**

**ASESORA
MARÍA LUISA GUEVARA GIL**

**TESIS
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN
INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

**LIMA – PERÚ
2018**



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND

La autora sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PACIENTES PERUANOS CON
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DISTROFINOPATÍA Y VALIDACIÓN
DE LA TÉCNICA MLPA COMO PRUEBA MOLECULAR
DIAGNÓSTICA CONFIRMATORIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR 2014-2016**

TESIS

PARA OPTAR

**EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INVESTIGACIÓN
CLÍNICA**

PRESENTADA POR

FRANCIA DEL PILAR HUAMAN DIANDERAS

ASESORA

DRA. MARÍA LUISA GUEVARA GIL

LIMA, PERÚ

2018

JURADO

Presidente: Enrique Ruiz Mori, doctor en Gestión de Salud

Miembro 1: José Luis Pacheco de la Cruz, doctor en Derecho

Miembro 2: Paul Rubén Alfaro Fernández, doctor en Medicina

A mi bebé, Fabio Alejandro Buleje Huaman

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, por apoyarme en todo momento, primero como compañero de trabajo y amigo solidario que siempre estuvo para escucharme y aconsejarme, luego como dedicado y comprensivo novio. Y, finalmente, mi compañero de vida, testarudo, pero comprensivo, que reniega constantemente, pero sabe amar profundamente.

A mis padres, que siempre me inculcaron el interés por la ciencia, por apoyarme durante toda mi formación; en especial, a mi madre, por su amor incondicional que me acompaña siempre, el mejor ejemplo de vivir.

A la doctora María Luisa Guevara Gil, asesora de la tesis, por su gran apoyo, enseñanza y confianza, brindándome la posibilidad de trabajar a su lado y aprender de ella, una segunda madre.

Al doctor Ricardo Fujita Alarcón, director del Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular, por brindarme la oportunidad para desarrollarme como profesional junto a un grupo tan selecto de profesionales.

Al Instituto de investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres, por abrirme sus puertas, permitirme desarrollar esta investigación, y crecer como profesional.

Al Servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas y al Servicio de Genética del Departamento de Especialidades Médicas del Hospital Edgardo Rebagliati Martins – EsSalud, por su colaboración.

ÍNDICE

Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Resumen	vi
Abstract	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1 Antecedentes	
1.2 Bases teóricas	11
1.3 Definición de términos básicos	30
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	32
2.1 Tipo y diseño	
2.2 Procedimientos de recolección de datos	34
2.3 Procesamiento y análisis de los datos	39
2.4 Aspectos éticos	
CAPÍTULO III: RESULTADOS	41
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	65
FUENTES DE INFORMACIÓN	66

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue validar la utilidad diagnóstica de la prueba MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para diagnóstico de pacientes con una distrofinopatía (tipo Duchenne-DMD, o Becker-DMB), caracterizándose primero a los pacientes. Se utilizó la información clínica de 46 pacientes que fueron referidos al CIGBM entre los años 2014-2016 para descarte de DMD/DMB. Se determinó el genotipo de las muestras, primero mediante la técnica MLPA (grandes deleciones y duplicaciones) y en los casos negativos, se usó NGS-target (pequeñas mutaciones). Finalmente se usó STATA 12.0 para análisis descriptivo y EPIDAT 3.1 para análisis de precisión diagnóstica. Se resolvieron el 56.5% de los casos por MLPA y el resto por NGS-target más secuenciación Sanger. De las 42 mutaciones diferentes encontradas, 11 no han sido reportadas antes. Se establece la distribución mutacional del gen *DMD*: grandes deleciones (45.65%), grandes duplicaciones (8.70%) y pequeñas mutaciones (45.65%), que es significativamente diferente en esta población versus lo reportado por la *Universal Mutation Database-Translational Research in Europe for the Assessment and Treatment-Neuromuscular Disorders*. Se demuestra que la técnica MLPA tiene una sensibilidad y especificidad del 100% para detectar mutaciones de tipo deleción/duplicación, causantes de DMD/DMB. Se recomienda realizar el diagnóstico de la DMD/DMB en dos partes. Primero por MLPA, considerando verificar por PCR más secuenciación Sanger en caso de tratarse de deleción de un solo exón. Y posteriormente, en MLPA negativos, realizar NGS y verificar los resultados también por secuenciación Sanger.

Palabras clave: Distrofinopatías, diagnóstico genético, MLPA, NGS.

ABSTRACT

The main objective of this work was, validate the diagnostic utility of the MLPA test (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) for the diagnosis of patients with dystrophinopathy (type Duchenne-DMD, or Becker-DMB), characterizing patients first. We obtained clinical information from 46 patients which were referred to CIGBM between 2014- 2016 to discard DMD/DMB. The samples were genotyped, first by MLPA (gross deletions and duplications) and then, the negative cases were analysed by NGS (short mutations). Finally, we used STATA 12.0 for descriptive analysis and EPIDAT 3.2 to analyse diagnosis accuracy. We confirmed the DMD/DMB diagnosis by MLPA in 56.5% of cases and the remaining 43.5% by target-NGS confirmed by Sanger sequencing. We found 11 new mutations from 42 different mutations reported. Mutations distribution in DMD gene is as follows: 45.65% gross deletions; 8.70% gross duplications and 46.65% point mutations which have statistically significant differences in our population versus data reported in *Universal Mutation Database-Translational Research in Europe for the Assessment and Treatment-Neuromuscular Disorders*. We demonstrated that MLPA technique has a high sensitivity and specificity (100%) to detect deletion/duplication related to DMD/DMB. We recommended to make DMD/DMB diagnosis in two step process, first by MLPA plus Sanger sequencing if the deletion includes a single exon, and later, in MLPA negatives cases, perform NGS and verify the results by Sanger sequencing.

Keywords: Dystrophinopathies, genetic diagnosis, MLPA, NGS.

INTRODUCCIÓN

Un ejemplo de enfermedad rara es la distrofia muscular por carencia o alteración de la proteína distrofina. Existen dos tipos de distrofinopatías, la más común y severa es la distrofia muscular del Duchenne - DMD (OMIM # 310200). Esta enfermedad neuromuscular aparece a temprana edad y se caracteriza por la debilidad muscular progresiva y degenerativa. Cuando alcanza ciertos músculos como el diafragma, provoca una insuficiencia respiratoria, y finalmente al verse afectado el músculo cardíaco el desenlace es un infarto al corazón, que provoca una muerte temprana (adultos jóvenes). Una forma más leve y de menor incidencia es la distrofia muscular de Becker - DMB (OMIM # 300376), enfermedad que tiene mejor pronóstico.¹⁻³ Ambas enfermedades están ligadas al sexo porque el gen responsable (gen *DMD*) se encuentra en el cromosoma X, por lo que los afectados son casi al cien por ciento varones (46, XY), mientras que las mujeres al poseer dos cromosomas sexuales X, pueden ser portadoras de la enfermedad, asintomáticas, o muy levemente afectadas.

Actualmente, el diagnóstico clínico considera la detección de signos característicos de la enfermedad (niño de año y medio que no camine, de tres años que no corra o suba escaleras, signo de Gowers, pantorrillas hercúleas, escoliosis, y en un 30% retraso mental).^{4,5} A estos signos se le suman algunos exámenes complementarios como la prueba de nivel de creatininfosfoquinasa, electromiografía y en algunos casos inmunohistoquímica o Western blot para detectar presencia/ausencia de la proteína, aunque para ellos se necesita una muestra de biopsia muscular (prueba invasiva) y finalmente se encuentran las pruebas moleculares.⁵

En los centros hospitalarios del Perú, actualmente, se emplea como método

molecular de diagnóstico los test de Chamberlain y de Beggs (PCR *multiplex*, que evalúa hasta 10 exones a la vez).^{6,7} Otra técnica aún no implementada en nuestro país pero que se viene usando en otros países desde el 2002, es la *Multiplex Ligation-depend Probe Amplification* (MLPA) que a diferencia de la PCR *multiplex* puede evaluar hasta 50 regiones en una sola reacción, por lo que surge como un buen método en el reconocimiento de variaciones en el gen *DMD*.⁸

Si bien es cierto la MLPA puede detectar variaciones de todos los exones, solo puede evaluar presencia/ausencia de cada exón por separado, más no puede evaluar pequeñas mutaciones de uno o de más nucleótidos. Para ello, se puede utilizar otra técnica, la *Next Generation Sequencing* (NGS) que sí es capaz de detectar estos tipos de mutaciones.⁹

Un problema en países como el nuestro, es que más del 95% de las enfermedades quedan sin determinarse por dificultades tecnológicas. Ello impide un tratamiento adecuado y oportuno por desconocer la naturaleza de la enfermedad en casi todas las familias. Además, hay que adicionar, que muy pocas pueden costear estudios moleculares en el extranjero.

En general, las distrofinopatías están recibiendo más atención debido al mejor conocimiento de los médicos, mayor acceso de la población a los servicios de salud y mayor preocupación de la sociedad por los casos de discapacidad. Por ello, es crítico diagnosticar la condición, pues en base a ello, se puede establecer el manejo y pronóstico de vida de los afectados.⁵

El presente estudio, tiene como objetivo principal, validar la técnica MLPA, como una prueba diagnóstica molecular para corroborar la sospecha clínica de una distrofinopatía (DMD/DMB). Además, caracterizar genóticamente a la población

de participantes con un diagnóstico clínico de DMD/DMB, comparar la distribución de los tipos de mutaciones causales de DMD/DMB de esta población, con lo reportado en diferentes partes del mundo; y armar una base de datos que contenga los datos clínicos de los pacientes y sus correspondientes mutaciones, para que dicha información sirva a futuro para determinar frecuencias de los tipos de mutaciones a nivel mundial, acceso a nuevos tratamientos o terapias y para consejería genética a los familiares.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Chamberlain *et al.*, en 1988, utilizan una base de datos de pacientes del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), para indicar cuales son las regiones del gen *DMD* con mayor probabilidad de perderse durante la replicación del ADN (posteriormente conocidas como *hot spots*). Además, proponen la técnica PCR *multiplex*, como prueba diagnóstica pre y postnatal, gracias a la cual pueden amplificarse simultáneamente hasta 10 regiones del gen *DMD*, y por ende detectar una delección en un individuo hemicigota. En 1990, Chamberlain *et al.*, publican en el libro *PCR protocols: a guide to methods and applications*, un capítulo donde detallan el protocolo para realizar la PCR *multiplex* de nueve exones, conocido posteriormente como el test de Chamberlain, utilizado aun en varios centros médicos.^{6,10}

Beggs & Kunkel, en 1990, realizaron una revisión de las técnicas hasta el momento propuestas para el diagnóstico de distrofinopatías, sea Duchenne (DMD) o Becker (DMB). Proponen un diagrama de flujo para el diagnóstico de la enfermedad, cuando el clínico sospecha de DMD/DMB y el paciente presenta niveles de CPK elevados. Primero se debe realizar un análisis de inmunohistoquímica o *Western blot* para distrofina. De observarse una distrofina normal, se deben descartar otras enfermedades neurológicas, de observarse una distrofina alterada puede tratarse de DMB y de no observarse distrofina lo más seguro es que corresponda a un DMD. Para comprobar este resultado se debe realizar un *Southern blot* en búsqueda de delecciones o duplicaciones, finalmente, de no encontrarse nada pueden realizarse estudios de ligación por medio de PCR-RFLP. Además, sugieren que las familiares

también deben ser analizados para saber si son portadoras o no, y así poder brindar la consejería genética necesaria.⁴

Beggs *et al.*, en 1990, propusieron un segundo conjunto de *primers* para PCR *multiplex*, para amplificar siete exones y un promotor, exones que también se encuentran en regiones *hot spots* del gen *DMD* (previamente descritas por Koenig *et al.*, en 1987). Se propone que utilizando este mix (posteriormente conocido como el test de Beggs) y el de Chamberlain se pueden detectar el 98% de las deleciones en pacientes con DMD/DMB. Esto ha sido probado también como diagnóstico prenatal.⁷

Schwartz & Duno, en 2004, reportaron por primera vez el uso de la técnica MLPA para detectar variaciones en el número de copias de cada uno de los 79 exones del gen *DMD* en solo dos reacciones. Se confirmaron en todos los casos las mutaciones encontradas antes mediante PCR *multiplex* o *Southern blot*, además, se hallaron nuevas mutaciones y no solo en pacientes sino también en portadoras. Concluyeron que es un método reproducible, fácil de manejar y más sensible.¹¹

Lalic *et al.*, en 2005, validaron el ensayo mediante MLPA vs. PCR *multiplex* en 123 pacientes. La prueba MLPA confirmó todas las deleciones encontradas con la PCR *multiplex* y en algunos casos se especificó el verdadero tamaño de la deleción. Además se reportaron deleciones y duplicaciones que no pudieron ser detectadas por PCR *multiplex*, confirmando que la MLPA es superior a los test de Chamberlain y Beggs.¹²

Gatta *et al.*, en 2005, analizaron 12 familias con un varón afectado por DMD/DMB, para comprobar la eficacia en detectar mujeres portadoras de mutaciones de tipo deleción y duplicación. Encontraron en 10 familias, madres y hermanas portadoras

de la mutación del afectado, lo que representa una información muy útil al momento de dar un asesoramiento genético a la familia.¹³

Jansenn *et al.*, en 2005, utilizan la técnica MLPA para realizar análisis retrospectivos y prospectivos de un total de 193 individuos. Como resultado, se confirmaron resultados de pacientes con deleciones antes detectadas por PCR *multiplex* o por FISH. Además, se reportaron nuevas deleciones, duplicaciones y una mutación de tipo *nonsense*. Por lo tanto, también concluyen que la técnica MLPA es más sensible y rápida que la PCR *multiplex*. Y, además, recomiendan verificar por secuenciación Sanger en el caso de encontrar deleción de un solo exón por MLPA.¹⁴

Lai *et al.*, en 2006, evaluaron la sensibilidad y especificidad de la técnica MLPA en comparación con la PCR *multiplex*, de un total de 63 sujetos identificados clínicamente con DMD/DMB. En todos los casos la MLPA fue capaz de detectar las deleciones o duplicaciones causantes de la enfermedad. Se comprueba que la MLPA es superior a la PCR *multiplex* ya que se pueden detectar deleciones de cualquier exón, además de duplicaciones y también portadoras de las mutaciones.¹⁵

Aartsman-Rus *et al.*, en 2006, informaron por primera vez sobre el uso la base de datos LOVD³ (*Leiden Open Variation Database*), creada en 1997 por la *Leiden University Medical Center*. De un total de 4 700 pacientes del gen *DMD*, las frecuencias de los tipos de mutaciones reportadas hasta el 2005 fueron: deleciones de uno o más exones abarcaban más del 72%, las duplicaciones de uno o más exones eran el 7% y el 20% restante se trataba de pequeñas mutaciones. Además, la región *hotspot* para las deleciones se encuentra entre los exones 45-53 y para

las duplicaciones entre los exones 2-20. Esta base de datos (www.databases.lovd.nl) se encuentra en constante actualización, hasta la última en marzo del 2018, de un total de 13 569 pacientes, se reportan un 66% de deleciones de uno o más exones, 12% de duplicaciones de uno o más exones y 22% de pequeñas mutaciones.¹⁶

Nicolas *et al.*, en 2012, desarrollaron la base de datos eDystrophin, donde se describen las mutaciones causantes de DMD/DMB y las modificaciones estructurales y funcionales de la distrofina. De un total de 1 026 pacientes franceses; 64.3% presentan deleciones de uno o más exones; 21.7% duplicaciones de uno o más exones y 14% pequeñas mutaciones. Esta información proporciona una idea de correlación genotipo-fenotipo de DMD/DMB y es útil para las posibles estrategias de terapia genética.¹⁷

Yang *et al.*, en 2013, realizaron por primera vez un estudio de caracterización de la población china en referencia al gen *DMD*. Analizaron 1 053 pacientes y 400 madres por MLPA y secuenciación. Se determinó que el 59.4% eran grandes deleciones, el 11.2% grandes duplicaciones y el 29.4% pequeñas mutaciones. También indicaron que en un 51.7% de los casos la mutación fue heredada de la madre. En cuanto a las deleciones la región hotspot se encontró entre los exones 45-54 y 3-22, y en cuanto a las duplicaciones estas regiones estuvieron entre los exones 3-11 y 21-37. Se logró aumentar la comprensión de DMD/DMB en la población china.¹⁸

Wei *et al.*, en 2014, presentaron un nuevo método de análisis genético para DMD/DMB, la NGS-*target*. Se utilizaron 89 pacientes con mutaciones conocidas, 18 mujeres portadoras y 245 individuos control. En comparación con métodos

tradicionales, este tiene una especificidad del 99.99% y una sensibilidad del 98.96% para la detección de variaciones del número de copias y una precisión del 100% para la identificación de mutaciones SNP. Se reportaron nueve mutaciones nuevas. Los resultados demostraron que el nuevo método es adecuado para la práctica clínica de rutina con tiempos de respuesta más cortos y mayor precisión de la información genética.¹⁹

Guo *et al.*, en 2015, combinan las técnicas MLPA y secuenciación Sanger para analizar genéticamente 613 individuos (chinos). El 69.8% se resolvió por MLPA mientras que el 23.3% por secuenciación Sanger. La región más variable se encuentra entre los exones 44-55. Este trabajo contribuyó a un mejor entendimiento de la población china en relación al gen en estudio.²⁰

Bladen *et al.*, en 2015, Describieron el desarrollo y análisis de la base de la UMD-TREAT-NMD DMD mutations *database*, con el objetivo de desarrollar una herramienta para el diagnóstico, la investigación, la planificación de ensayos y una mejor atención clínica. Se analizaron 7 149 pacientes, se encontró que el 68% corresponde a grandes deleciones, el 11% a grandes duplicaciones y el 20% a pequeñas mutaciones (7% *frameshift*, 10% *nonsense*, 3% *splice site*, 0.4% *missense*) y 0.3% mutaciones intrónicas. Indican además que la región *hotspot* para las grandes deleciones se encuentra entre los exones 45-55 y para las grandes duplicaciones en el exón 2.²¹

Li *et al.*, en 2016, analizaron 81 pacientes con DMD/DMB primero mediante MLPA y en casos negativos, por NGS confirmando por secuenciación Sanger. Sesenta y siete casos se resolvieron por MLPA, el resto por NGS más Sanger, de las cuales seis fueron mutaciones nuevas. Se concluyen que la combinación de MLPA, NGS

y Sanger mejora enormemente la sensibilidad y especificidad de las pruebas para diagnóstico de DMD/DMB.²²

Bai *et al.*, en 2016, recolectaron 433 familias con DMD/DMB en cuatro años para genotipar mediante MLPA, NGS más secuenciación Sanger. En 316 familias se detectaron deleciones o duplicaciones por MLPA, de 57 casos de deleción de un solo exón, dos resultaron ser mutaciones *nonsense* y una del tipo *frameshift*. Por NGS se detectaron 92 pequeñas mutaciones, de las cuales 46 son nuevas. En conclusión, el diagnóstico genético de DMD/DMB por MLPA más NGS y secuenciación Sanger es efectivo.²³

Okubo *et al.*, en 2016, utilizan la NGS en pacientes negativos para MLPA que cumplen con la clínica de la DMD/DMB. Lograron identificar mediante esta técnica 67 mutaciones (92% de los casos), 37 mutaciones del tipo *frameshift* y 30 del tipo *nonsense*. Estos resultados fueron validados mediante secuenciación Sanger e indican entonces, que este método es adecuado para un diagnóstico de rutina.²⁴

Zhong *et al.*, en 2017, emplearon la combinación de MLPA mas NGS-*target* en 92 pacientes sospechosos de DMD/DMB. Mediante MLPA se solucionaron el 70.65% de los casos, agrupándose la mayoría de deleciones entre los exones 45-55 y 2-19. De las 21 mutaciones pequeñas detectadas por NGS-*target*, seis fueron nuevas. En dos casos se descartó DMD/DMB, y, posteriormente, analizando los resultados adicionales del panel utilizado, se resolvieron como distrofias musculares de cintura. En conclusión, la MLPA más NGS-*target* fue eficaz en la detección de mutaciones causantes de DMD/DMB.²⁵

Wanq *et al.*, en 2017, desarrollaron una base de datos con pacientes registrados con DMD en el sur de China analizando sus características clínicas y mutacionales.

La caracterización genotípica se realizó mediante la técnica MLPA. Esta población presenta un 57.8% de grandes deleciones, 30.5% de pequeñas mutaciones (14.1% *frameshift*, 13.3 *nonsense*, 3.1 *splice site*) y 10.9% de grandes duplicaciones. De todos ellos, el 13.3% son elegibles para terapia por *exon skipping*. En conclusión, esta base de datos proporcionó información valiosa sobre el estado actual de la DMD en el sur de China y la posibilidad de participación de estos pacientes en futuras terapias moleculares.²⁶

1.2 Bases teóricas

Distrofia muscular

Comprenden un gran grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas principalmente por la presencia de debilidad y pérdida del tejido muscular, en forma progresiva. Se pueden presentar en la niñez (formas más graves) o en la edad adulta (formas más leves).^{1,26,27}

Los síntomas varían entre los diferentes tipos de distrofia muscular, pudiendo resultar afectados algunos o todos los músculos. Entre los síntomas más resaltantes tenemos, retraso en el desarrollo de funciones musculares motoras, dificultad para utilizar uno o más grupos de músculos, babeo, párpado caído, caídas frecuentes, pérdida de la fuerza en un músculo o grupo de músculos como adulto, pérdida en el tamaño de los músculos, problemas para caminar (demora para caminar), y también la discapacidad intelectual se presenta en algunos tipos de distrofia muscular.^{1,26,27}

Distrofinopatías

Comprenden un grupo de distrofias musculares, con un tipo de herencia ligada al sexo, y por ende se presentan casi exclusivamente en varones. Son producidas por mutaciones en el gen *DMD*, que conducen a la no expresión de la proteína o la expresión de una proteína alterada.^{1,26,27}

Existen tres tipos de distrofinopatías reconocidos, los dos más importantes son la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia muscular de Becker, en las que se ve afectado principalmente el tejido muscular esquelético; el tercer tipo es la miocardiopatía dilatada ligada al X, en ella solo se ve afectado el tejido muscular

cardiaco, presentándose entre los 20 y 40 años como una insuficiencia cardiaca congestiva de rápida progresión.^{1,26,27}

Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

OMIM #310200, es el tipo de distrofia muscular más frecuente y severo, con una incidencia de 1 por cada 3 500 niños nacidos vivos. La DMD es producida por diferentes tipos de mutaciones en el gen *DMD*, que se traducen en una distrofina muy reducida, no funcional o en la ausencia total de la proteína. En teoría, las mutaciones causantes de esta condición son las que se transcriben fuera del marco de lectura (*out of frame*). Al presentarse una severa pérdida de la proteína distrofina, esta enfermedad se evidencia a edades muy tempranas, la mayoría de las veces entre los tres a cinco años.^{4,26}

La DMD se caracteriza por la presencia de hipotonía e hiporreflexia; pérdida progresiva de la fuerza muscular que afecta primero a las extremidades inferiores y luego a las superiores. Hay dificultad para correr o subir escaleras; aumento gradual de los músculos afectados por el incremento del tejido fibroso, provocando una hipertrofia de gemelos; aparición del signo de Gowers, causado por la debilidad de los extensores de la rodilla y la cadera. En algunos casos hay algún grado de retraso mental; conforme pasan los años pierden la capacidad de caminar (entre los 7 y 12 años); presentan escoliosis o lordosis; insuficiencia respiratoria y cardiaca. Al ser una enfermedad degenerativa que se desarrolla rápidamente, la expectativa de vida es de aproximadamente 20 años.^{4,26}

Distrofia Muscular de Becker (DMB)

OMIM #300376, es el otro tipo de distrofinopatía más raro y menos severo, con una

incidencia de 1 por cada 30 000 niños nacidos vivos, producido también por mutaciones en el gen *DMD*, pero de las que se transcriben dentro del marco de lectura (*in frame*), que, finalmente, se traducen en una proteína alterada pero funcional.^{4,26}

Los signos de esta enfermedad son similares a los de la anterior, se evidencian también a edades muy tempranas, con hipotonía y signo de Gowers. Conforme pasan los años, pierden la capacidad de caminar a una edad promedio de 12 años y pueden presentar escoliosis o lordosis y cardiomiopatías. Sin embargo, al no ser tan severa, la expectativa de vida de estos pacientes es mucho mayor.^{4,26}

El Gen *DMD*

OMIM 300377, es uno de los más grandes del genoma (2.4Mb), está ubicado en la región Xp21.1, y posee 79 exones y siete promotores (ver figura 1). Este gen se traduce en la proteína distrofina y el empalme alternativo, origina diferentes isoformas de la proteína. Dependiendo del tipo de tejido, la transcripción de la distrofina completa está controlada por tres promotores que se encuentran en una región antes del primer exón; promotor muscular (dp427m), predominantemente en músculo esquelético y cardíaco, promotor cerebral (dp427c), principalmente en neuronas corticales y del hipocampo y el promotor de Purkinje (dp427), que se expresa en las células de Purkinje y en músculo esquelético.^{28,29}

Los cuatro promotores restantes se encuentran dentro de algunos intrones y han sido nombrados según el peso molecular de la proteína traducida. El promotor dp260 localizado en el intrón 29, se expresa exclusivamente en la retina. El dp140 ubicado en el intrón 44, se expresa en cerebro, retina y riñón. El dp116 que se encuentra en el intrón 55, se transcribe únicamente en las células de Schwann, y

el dp71 ubicado en el intrón 62, se expresa en la mayoría de tejidos no esqueléticos como cerebro, riñón, hígado, pulmón y corazón.^{28,29}

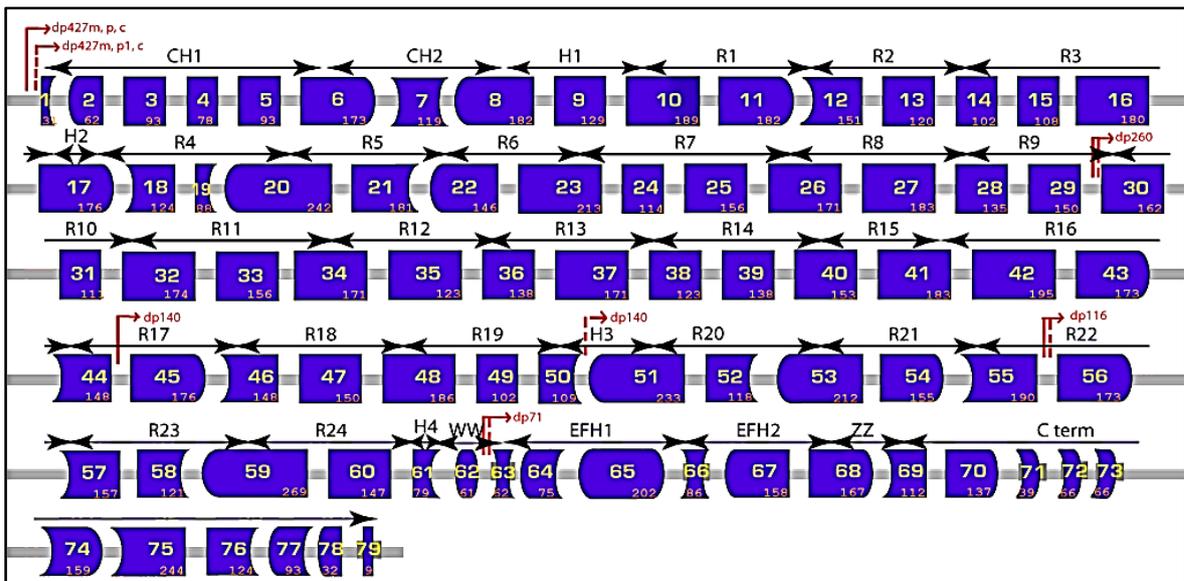


Figura 1. Representación esquemática del gen *DMD*, las figuras azules representan los exones, las flechas rojas la posición de los promotores y las flechas negras indican la codificación de los dominios estructurales. Obtenido de la base de datos online eDystrophin. (www.edystrophin.genouest.org)

Proteína distrofina

La distrofina de longitud completa es una proteína esquelética, compuesta por 3 685 aminoácidos con un peso molecular de 427 kDa. Pertenece a la familia espectrina/ α -actina. En las células del músculo esquelético, se localiza en la cara citoplasmática del sarcolema. La distrofina en individuos sanos está presente desde la vida fetal en músculo esquelético, corazón, músculo liso y algunos tipos de células nerviosas.^{28,30,31}

Esta proteína forma parte del complejo proteico asociado a distrofina (DAP), formado por sarcoglicanos, distroglicanos, distrobrevinas, sintrofinas, sarcospano, caveolina y la enzima óxido nítrico sintasa. La distrofina se une al citoesqueleto intracelular al asociarse con los filamentos de actina por su extremo N, e interactúa

con los miembros del DAP por su extremo C. ^{28,30,31}

En general, esta proteína posee cuatro dominios principales, un dominio de unión a la actina (ABD), un dominio de barra central (formado por las cadenas de espectrina), un dominio rico en cisteína y un dominio carboxi terminal (ver figura 2).

Dentro del primer dominio, de unión a actina (ABD1) se encuentra el de unión a la queratina (K19). El segundo dominio, de barra central, contiene dos de unión a lípidos (LBD1 y LBD2), uno de unión a PAR-1b (quinasa), otro de unión a sinemina (proteína de los filamentos intermedios), un dominio de unión a nNOS (asociación al sarcolema) y otro de unión a actina (ABD2). El tercer dominio, rico en cisteína, presenta uno de unión a plectina (proteína de conexión en el citoesqueleto), uno dominio de unión al β -dystroglicano (glicoproteína de membrana), un segundo dominio de unión a sinemina, otro de unión a anquirina (proteína que promueve la conexión citoesqueleto-membrana), y un dominio de unión a miosprina (inhibidor de la calcineurina). Y el cuarto dominio, carboxi terminal, contiene uno de unión a sintrofina y distrobrevina (proteínas estructurales del sarcolema).^{28,30,31}

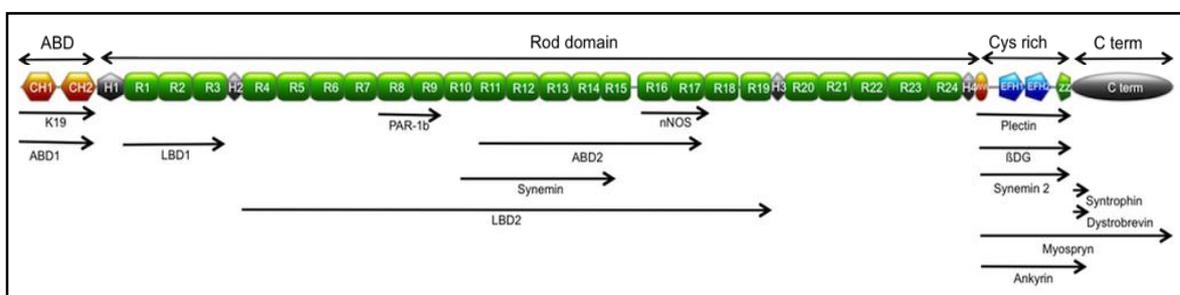


Figura 2. Representación esquemática de la distrofina y sus dominios, arriba los cuatro dominios principales y abajo los subdominios. Obtenido de la base de datos online eDystrophin. (www.edystrophin.genouest.org)

La principal función de la distrofina parece ser estabilizar el sarcolema y proteger a las fibras musculares del daño y la necrosis por la contracción a largo plazo.

También han sido descritas funciones no estructurales, ya que la distrofina presenta sitios de reconocimiento para diferentes moléculas de señalización, aunque estas vías de señalización siguen siendo desconocidas.^{28,30,31}

Diagnóstico clínico

Se basa en el hallazgo de algunas características físicas, como la dificultad para caminar a partir de los tres años de edad, debilidad progresiva de los músculos (hipotonía), pérdida de masa muscular (atrofia), presencia del signo de Gowers, columna vertebral anormalmente curvada (escoliosis), contracturas articulares (pie zambo, mano en garra u otras), y en cuadros avanzados de insuficiencia respiratoria, miocardiopatía o ritmo cardíaco anormal (arritmias).⁵

Se utilizan, además, pruebas de apoyo al diagnóstico clínico, como el nivel de CPK (creatinfosfoquinasa) en plasma, aunque el aumento de la CPK en plasma es inespecífico. También se utilizan las electromiografías, que evalúan patrones neuromusculares, pero que tampoco es una prueba específica. Y en algunos casos se puede realizar una biopsia muscular, que permite la visualización directa de las fibras musculares con ausencia de distrofina o una distrofina anormal, o evaluar la presencia de la proteína por *western blot*; sin embargo, al ser una prueba invasiva, actualmente no es recomendable.⁵

Como la DMD/DMB son enfermedades hereditarias monogénicas, en este caso por alteraciones en el gen de la distrofina (*DMD*), la confirmación de la enfermedad se realiza por medio de pruebas moleculares que detectan dichas alteraciones. Estas pruebas moleculares han ido evolucionado, desde la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hasta la secuenciación de nueva generación (NGS).³²

Pruebas de apoyo al diagnóstico clínico

Prueba CPK (creatinfosfoquinasa)

Evalúa el incremento de la actividad enzimática de la creatin quinasa, aldolasa, transaminasa y piruvato quinasa.³³

Esta prueba se ha utilizado para el diagnóstico de diferentes tipos de distrofias. Considerando que el nivel promedio normal en varones es de 8.3 a 9.6 SU/MI, por ejemplo, tenemos las distrofias más comunes de tipo Duchenne y Becker, que se presentan en niños menores de cinco años con niveles elevadísimos de CPK (entre 845 y 1 240 SU/mL) y conforme avanzan en edad los niveles disminuyen, pero manteniendo siempre una diferencia significativamente mayor que individuos sanos.

Otro ejemplo es la distrofia muscular de Limb-Girdle, en donde los niveles séricos de CPK también se encuentran elevados (entre 220 y 383 SU/mL). En la distrofia facioescapohumeral también se observa cierta tendencia elevada de los niveles séricos de CPK (entre 20 y 32 SU/mL), y en la atrofia muscular espinal (SMA) en algunos casos (SMAII y SMAIII), hay elevación de los niveles séricos de CPK (entre 13 y 22 SU/mL).³³

El aumento de la CPK en plasma es inespecífico ya que puede observarse en numerosas patologías, como enfermedad cerebrovascular aguda, hipertermia maligna, síndrome de Reyé, miopatías congénitas, miositis infecciosa, embolia pulmonar, vasculitis, etc.³³ Por lo tanto, esta prueba es muy sensible pero poco específica y no puede servir como única prueba confirmatoria para el diagnóstico de distrofia muscular de tipo Duchenne o Becker.

Electromiografía (EMG)

Esta es una técnica mediante la cual puede visualizarse de manera gráfica la actividad eléctrica de los músculos esqueléticos, y se emplea para el diagnóstico de diferentes enfermedades neuromusculares.^{34,34,35}

Un estudio prospectivo comparó el análisis del patrón de interferencia (IPA) y la duración media del potencial de la unidad motora (QMUP) en 239 músculos diferentes. Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba respecto al diagnóstico neurológico basado en pruebas histológicas. Se reportó que la sensibilidad de detección de una miopatía o neuropatía estaba en 46% o 38% para QMUP, y 75% o 53% para IPA. En todas las instancias IPA presenta sensibilidad superior sin alterar su especificidad en comparación a QMUP.^{34,34,35}

Pruebas diagnósticas confirmatorias

Los avances en diagnóstico molecular para la detección de ciertas alteraciones genéticas heredadas, por lo general van acompañados del desarrollo de novedosas tecnologías. Estas han ido evolucionando desde la detección de la proteína *in situ*, a la detección de la mutación en el código genético que va dar origen a una alteración en dicha proteína.

Inmunohistoquímica

La detección de distrofina, se realiza sobre las muestras del tejido muscular de cada paciente, por lo que es necesario una biopsia muscular, un fragmento de músculo que se encuentre mínimamente deteriorado, de aproximadamente un centímetro (deltoides, bíceps braquial o vasto lateral).^{27,36,37}

La muestra obtenida se incluye en parafina, se cortan algunas láminas a las que se les realiza tinciones básicas, como hematoxilina y eosina, para un diagnóstico morfológico inicial. ^{27,36,37}

Luego se realizan otras tinciones con inmunomarcaje. Para detectar la distrofina se utilizan tres anticuerpos que reconocen tres diferentes partes de la proteína, el DYS3 que reconoce un tramo del dominio amino-terminal que se traduce a partir de los exones 10 al 12, el DYS1 que reconoce una zona del dominio de cadena central que se traduce a partir del exón 31, y el DYS2 que reconoce una parte de la región carboxi-terminal (17 últimos aminoácidos) (ver figura 3). ^{27,36,37}

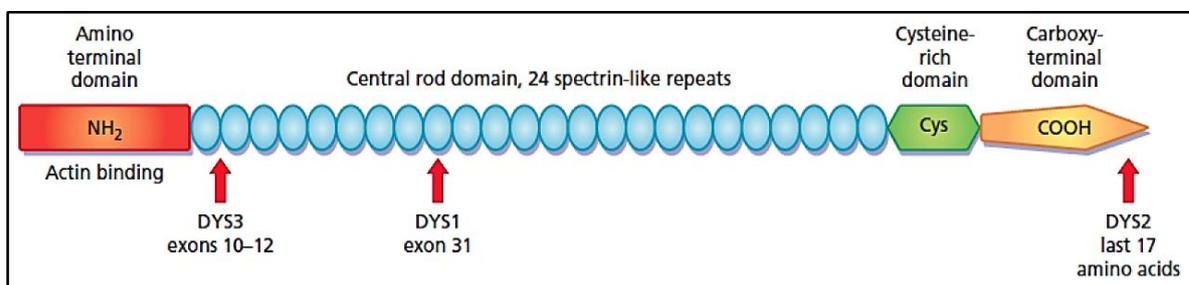


Figura 3. Representación esquemática de la distrofina, sus cuatro dominios generales y las flechas rojas indican el lugar de reconocimiento de los anticuerpos. Obtenido de Muscle Biopsy: A Practical Approach. 4ta Edición.

En un paciente con una distrofinopatía en general, se observa una arquitectura muscular anormal e incremento de tejido conectivo adiposo. En el caso de la DMD, se observa la ausencia total de distrofina. En cambio, en el caso de la DMB el patrón observado es heterogéneo, puede existir irregularidad o disminución de la intensidad del marcaje, esto dependiendo de donde se encuentre la mutación, pudiéndose observar afectados los marcajes de uno, dos o de los tres anticuerpos utilizados. ^{27,36,37}

Western Blot

Se realiza para identificar la distrofina en los pacientes, al igual que la prueba anterior también es necesaria una muestra de biopsia muscular. Este tejido (unos 20µg) debe de ser lisado, homogenizado con un sonicador para evitar que se desintegren las proteínas y centrifugado para obtener la fracción más pesada.^{27,37}

La fracción obtenida se corre en una electroforesis vertical, en un gel de poliacrilamida y con un buffer denaturante, por lo que las proteínas migran por su peso molecular y por su estructura e hidrofobicidad. Luego por electrotransferencia se pasan las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa.^{27,37}

Para detectar y visualizar la distrofina se utiliza la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática. Para esto, primero se incuba la membrana con un anticuerpo monoclonal que posee epítopes que reconocen cierta región de la distrofina, luego se realiza una segunda incubación con otro anticuerpo que en un extremo reconoce el primero y en el otro extremo presenta una enzima (Horseradish peroxidasa) que catalizará la reacción del sustrato añadido posteriormente (luminol) con la emisión de luz como producto (ver figura 4), y, finalmente, se compara la altura de la banda con marcador de pesos moleculares para saber si ha detectado el producto de interés.^{27,37}

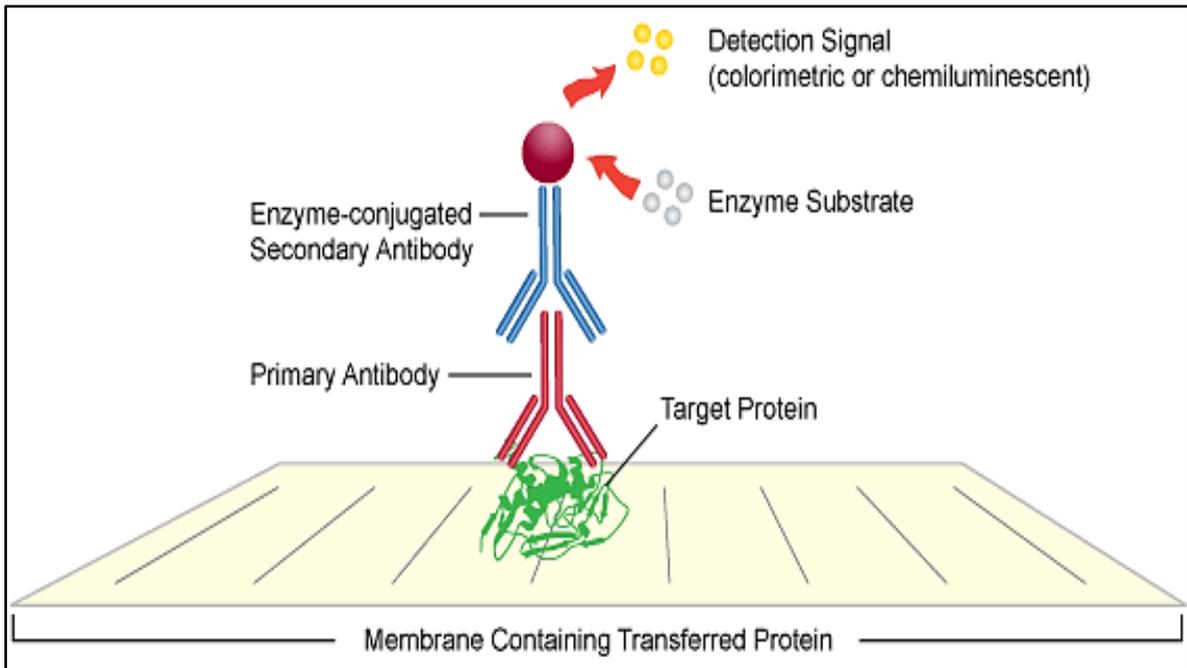


Figura 4. Representación esquemática de la detección de la proteína (distrofina), por un anticuerpo primario, este por un anticuerpo secundario que presenta en su extremo una enzima que emitirá una luz con la adición de un sustrato. Obtenido de protocolos de Leinco Technologies, Inc. (www.leinco.com/western-blotting-protocol)

En el caso de pacientes con distrofia muscular del tipo Duchenne, no se observa ninguna banda correspondiente a la distrofina. El patrón resultante de bandas del *Western blot* difiere mucho entre muestras de pacientes con una distrofia muscular del tipo Becker. En general, se puede observar un peso molecular más bajo si se trata de una gran deleción y uno más alto, si se trata de una duplicación. Sin embargo, no siempre esto se corresponde, ya que también dependerá de si la mutación altera o no el marco de lectura.^{27,37}

PCR y sus derivados

La metodología de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se basa en generar varias copias del fragmento que se quiera analizar a partir de una pequeña cantidad de ADN.

Con los años esta técnica ha presentado varios derivados, como en 1988, Bartlett

et al. utilizaron la técnica PCR-RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) para detectar deleciones en el locus del gen *DMD*, en familias con antecedentes.⁴

Más adelante, para el caso particular del gen *DMD*, uno de los más grandes del genoma humano (79 exones), tendría que amplificarse exón por exón para ser analizados uno por uno en búsquedas de mutaciones patológicas. Sin embargo, diversos estudios reportaron que existen *hot spots* (regiones del gen en donde ocurren mayoritariamente mutaciones patológicas). Es entonces que surgió el test de Chamberlain, luego el de Beggs y después el de Kunkel, que utilizan la PCR *multiplex*, una variante de la PCR, que consiste en la amplificación de hasta 10 exones al mismo tiempo. Estos test se han venido utilizando en diferentes hospitales, incluyendo los peruanos (hasta la actualidad), para la búsqueda de mutaciones en el gen *DMD*. Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas, porque no analiza los 79 exones, solo es capaz de detectar mutaciones del tipo deleción, y no puede detectar portadoras de deleciones. Además, no detecta duplicaciones de exones del gen.^{6,7,10,38}

Secuenciación

Esta metodología es el método considerado el estándar de oro para el diagnóstico molecular clínico, debido a su precisión en la detección de pequeñas variantes genéticas de uno o más nucleótidos.³⁹

La secuenciación Sanger se basa en la detección de las bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C), consecutivamente en un fragmento de ADN previamente amplificado. Sanger *et al.*, en 1974 publica el fundamento de la técnica que en un inicio se realizaba manualmente separando los

fragmentos en grandes geles de acrilamida.³⁹

Actualmente existen diferentes plataformas automatizadas que realizan la separación de los fragmentos y la detección de las bases nitrogenadas. En general, un protocolo de secuenciación consta de seis pasos. Primero se amplifica el fragmento que se desea analizar y se comprueba por electroforesis, luego se purifica el amplicón. Después se realizan dos amplificaciones de dicho amplicón, una con el *primer forward* y otra con el *primer reverse*. En esta reacción se utilizan dNTPs marcados con fluorocromos, verde para adenina, rojo para timina, amarillo para guanina y azul para citosina. Después se precipitan los preparados para quedarnos solo con las moléculas y se disuelven en formaldehído, se denatura el ADN y se corren las muestras en un secuenciador para ser analizados en una computadora, con programas como el Chromas.³⁹⁻⁴¹

El fundamento de esta técnica consiste en que los fragmentos amplificados que son de diferentes tamaños, subirán por un capilar en orden de tamaño y un láser traspasará cada uno de ellos, entonces dependiendo de cuál sea la base nitrogenada en que termine cada fragmento, este emitirá una longitud de onda representada por un color (verde, rojo, amarillo o azul), y esto es lo que es detectado por la computadora que traduce el color por la base nitrogenada que corresponde (ver figura 5).³⁹⁻⁴¹

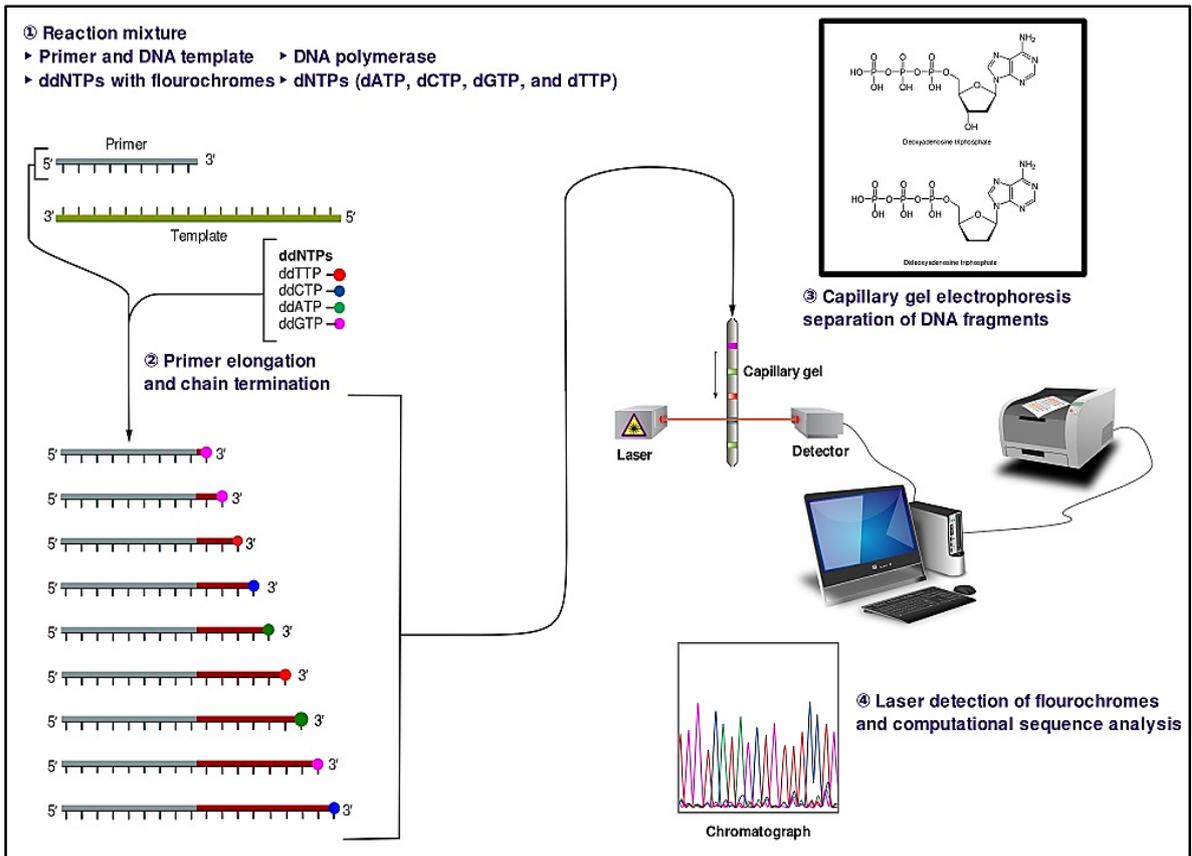


Figura 5. Representación gráfica del fundamento de la secuenciación Sanger. Obtenido de file Sanger sequencing de Estevezj 2012.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Se describe por primera vez en el 2002, por la compañía MRC-Holland. Con ella, se pueden analizar ADN, ARN o ADN-met, y a diferencia de la PCR-*multiplex*, es capaz de detectar y cuantificar entre 35 y 50 regiones en una sola reacción.⁸

Este método se lleva a cabo en cuatro pasos; primero denaturación del ADN, luego hibridación de las sondas que contienen una región complementaria y otra que varía en tamaño (cola), después se ligan los fragmentos hibridados, para que finalmente se amplifiquen dichos fragmentos.⁸

Posteriormente los fragmentos son separados por electroforesis capilar. Los resultados son analizados utilizando diferentes programas, como el Coffalyser, que

valoran todos los pasos de la reacción y analizan numérica y estadísticamente cada fragmento y cada muestra (ver figura 6).⁸

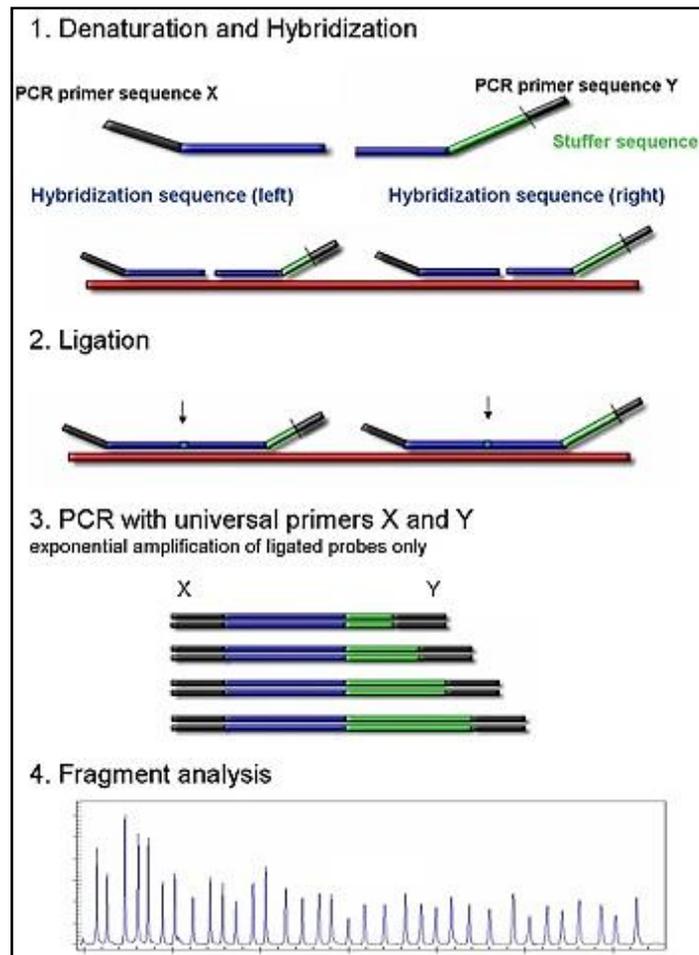


Figura 6: Esquemización del proceso de MLPA. Fuente: MRC Holland. (www.mlpa.com/WebForms)

La ventaja de amplificar hasta 50 regiones a la vez de la MLPA, hace que con solo dos reacciones se puedan amplificar y analizar presencia/ausencia de los 79 exones del gen *DMD*. La empresa MRC-Holland es la que produce los mixes de sondas comerciales (*probemix*). En este caso los probemix utilizados son el P034 y P035, que ya se han utilizado en diferentes estudios, para la búsqueda de mutaciones patológicas en dicho gen.^{12,14,15}

Esta capacidad de la MLPA para analizar todos los exones del gen *DMD* en pacientes afectados, presenta una alta sensibilidad y especificidad y una fuerte

identificación de los puntos de ruptura de los reordenamientos. Sin embargo, un punto crucial en la interpretación de los resultados de la MLPA, está en la detección de deleciones de un solo exón, ya que en estos casos dicha deleción aparente, en realidad podría deberse a una pequeña mutación en la secuencia que dificulta la hibridación de la sonda específica, por lo tanto, aparentes deleciones de exones individuales detectadas por MLPA, deben ser revisadas por secuenciación Sanger.^{8,42}

Para el caso de la DMD/DMB, se han realizado varios estudios que han informado que la técnica MLPA es una herramienta sencilla, rápida y fiable en la detección de deleciones y duplicaciones del gen *DMD*. La utilidad de la técnica es evidente sobretodo en el estudio de las mujeres probables portadoras, ya que con esta información se pueden prever futuros casos (consejería genética).^{12,14,15}

Next Generation Sequencing (NGS)

El diagnóstico de trastornos genéticos monogénicos utilizando secuenciación Sanger por lo general tiene un tiempo de respuesta de 6-8 semanas, dependiendo del tamaño y complejidad del gen estudiado. Sin embargo, el flujo de trabajo laborioso, la naturaleza propensa a errores, y el alto costo de funcionamiento hacen que sea poco atractivo en esta nueva era de la genómica, sobre todo cuando las regiones genómicas son demasiado grandes.^{9,24,42,43}

La secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva (NGS) es la tecnología más avanzada de análisis molecular con la que contamos actualmente. Esta nos permite detectar diferentes tipos de mutaciones de un solo gen un grupo de ellos o de todo el exoma de un individuo. Esta técnica se presenta en dos variantes; la secuenciación *Target*, que funciona con paneles donde se amplifican

de uno o varios genes completos a la vez, y la secuenciación del exoma total que amplifica toda la región traducible de un individuo.^{9,24,42,43}

Existen diferentes empresas que ofrecen plataformas para la NGS, como *Roche*, *Illumina*, *Pacific Biosciences* y *Life technologies*. Cada una de ellas presenta metodologías diferentes, pero el fundamento de la técnica es el mismo.⁴⁴

Esta técnica se realiza en cuatro pasos, primero se preparan las librerías genómicas, luego se capturan las librerías con los *beads* y se cargan en los chips, se corren las muestras en el equipo y finalmente se analizan los resultados.⁴⁴

NGS-Target

La secuenciación de nueva generación tipo *target*, utiliza paneles a la hora de preparar las librerías, que son kits que contienen *primers* para amplificar entre 100 a 400 genes a la vez.

Para preparar la librería genómica, si se trata de ARN, primero se transcribe en ADNc, si es ADN solo se denatura y se amplifican todas las regiones posibles con los pares de *primers* que contenga el panel utilizado.

Luego se realiza una pequeña digestión de los extremos de los amplicones (secuencia de los *primers* utilizados), y, finalmente, se adicionan en los extremos de cada amplicón unas pequeñas secuencias conocidas con el nombre de adaptadores (ver figura 7).^{19,42,45}

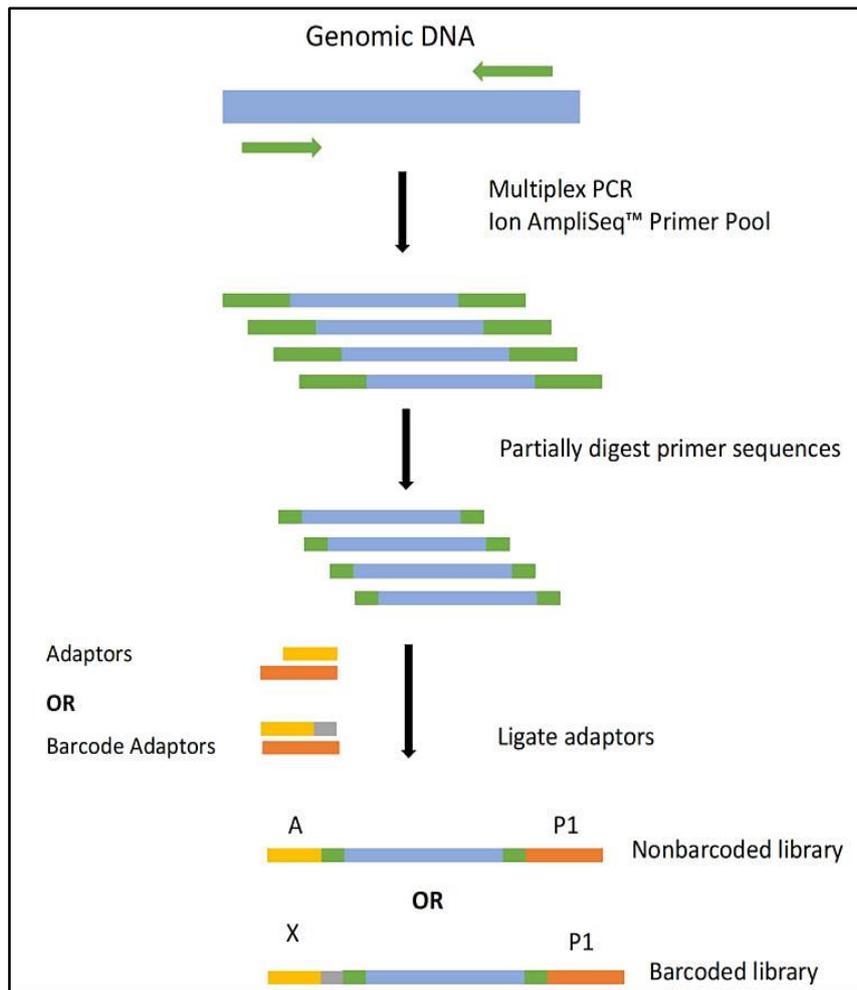


Figura 7. Pasos para realizar la librería genómica para NGS-*target*. Obtenido de *Ion AmpliSeq DNA and RNA library preparation user guide* (Thermo Fisher Scientific)

Para cargar los chips, primero se mezclan las librerías con los *beads* que también contienen unas pequeñas secuencias de ADN adheridas, que van a ser complementarias a uno de los adaptadores. Esta mezcla se expande uniformemente en el chip de manera que cada *bead* se deposita en un pocillo del chip.^{19,42,45}

La corrida de los chips se realiza adicionando consecutivamente cuatro buffers que contienen cada uno los cuatro diferentes nucleótidos dTPA, dTPC, dTPG y dTPT, y la lectura es por cada ion H⁺ que se desprende cuando se incorpora cada base (ver figura 8).^{19,42,45}

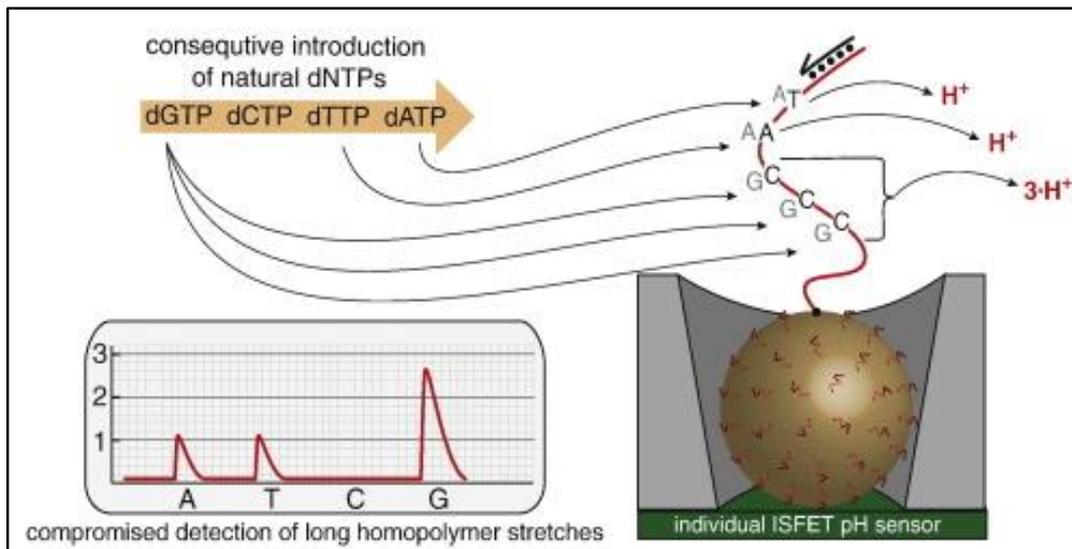


Figura 8. Fundamento de la secuenciación con la plataforma Ion Torrent, utilizando un sensor de pH.

La información de la lectura se va almacenando en la computadora conforme avanza la corrida y luego los *softwares* ordenan toda la información obtenida por región y la comparan con la secuencia estándar del GenBank (NC_000023.10) de un individuo sano para encontrar diferencias. Los resultados de las diferencias encontradas se pueden exportar en un archivo excel de fácil comprensión.^{19,42,45}

Diferentes empresas han diseñado paneles que contienen *primers* para el análisis de ciertos grupos de enfermedades. El caso de *Life Technologies* que trabaja con la plataforma *ion torrent*, ofrece un kit *Ion ampliseq inherited disease panel target*, que contiene 10 000 pares de *primers* para amplificar todos los exones de 328 genes, siendo uno de estos genes analizados, el gen *DMD*. El uso de esta tecnología para la búsqueda de mutaciones causantes de distrofinopatías está ampliamente difundido.^{19,42,45}

Una de las ventajas de esta técnica, es que permite la secuenciación no solo del gen en cuestión, el gen *DMD*, en un menor tiempo. Además de no encontrarse mutaciones en este gen, pueden encontrarse variaciones en otros genes asociados

a enfermedades o síndromes que presentan síntomas semejantes a la distrofia muscular del tipo Duchenne o Becker.

Un estudio que utiliza un panel que contiene sondas para el gen DMD, ha demostrado que, en comparación con métodos tradicionales de diagnóstico molecular, esta técnica presenta una especificidad del 99.99% y una sensibilidad del 98.96% para variaciones del número de copias y 100% para identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Diversos estudios demuestran resultados prometedores en el desarrollo de tecnologías de NGS para aplicaciones clínicas.⁴⁵

1.3 Definición de términos básicos

Validación de una prueba diagnóstica: Es un proceso mediante el cual se intenta probar si un método es adecuado o no para ser utilizado para diagnosticar una enfermedad. Se basa en índices como la sensibilidad y especificidad de la prueba con respecto a otra llamada *gold standard*.

MLPA: Por sus siglas en inglés *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, es una técnica que en cuatro pasos es capaz de amplificar hasta 50 regiones a la vez a partir de ADN genómico. Esta técnica detecta variación en el número de copias de las regiones analizadas.

NGS: Por sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*, es una técnica capaz de secuenciar todo el exoma de una persona, o en el caso de usar *panels*, secuenciar hasta 1000 genes a la vez. Por medio de esta metodología se pueden detectar mutaciones pequeñas (*nonsense, frameshift, splicesite* y *misense*).

Distrofinopatías: Conforman un subgrupo de las distrofias musculares, en las que existe una alteración en la proteína distrofina causada por mutaciones en el gen *DMD*. Las distrofinopatías comprenden hasta el momento, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB) y miocardiopatía dilatada ligada al X.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1 Tipo y diseño

Esta investigación es de tipo cuantitativo, observacional, descriptivo, transversal, prospectivo. Respecto al diseño, el presente es un estudio de precisión diagnóstica

Es de tipo cuantitativo porque se realiza un análisis estadístico de los datos obtenidos. Es de tipo observacional ya que solo se recaudaron datos, por medio de la revisión de los archivos que contienen la información básica de los pacientes, así como fotocopias de sus exámenes clínicos (diagnóstico clínico, en este caso DMD/DMB), y el genotipado (diagnóstico molecular) mediante técnicas en biología molecular (MLPA y NGS-*Target*).

Esta investigación es descriptivo, ya que se realiza un estudio de precisión diagnóstica y además este estudio se realiza sobre una sola variable (tipo de mutación), es transversal porque los datos de los pacientes y las muestras proporcionadas, fueron obtenidos en un solo espacio de tiempo. Las pruebas moleculares se llevaron a cabo con la misma muestra de ADN obtenida en el momento de la entrevista.

Este estudio es además prospectivo, porque se utilizaron muestras de pacientes diagnosticados clínicamente con una distrofinopatía, que se encuentran almacenadas en el banco de ADN del Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular (CIGBM) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (FMH-USMP), muestras que fueron recolectadas para un estudio anterior.

Diseño muestral: Los participantes fueron pacientes que acudieron a los servicios de neurología o pediatría y genética en hospitales de Lima-Perú, por sospecha de algún tipo de distrofia muscular y fueron referidos al CIGBM.

Se calculó el tamaño de la población mediante el software EPIDAT 3.1, considerándose la sensibilidad y especificidad esperadas de la MLPA es del 99% aproximadamente, con una razón de un individuo no enfermo por cada enfermo, una precisión del 3% y un nivel de confianza al 95%. El programa indicó serían necesarios 44 pacientes y 43 individuos sanos. Sin embargo, la prueba de la MLPA se les realizó a 46 pacientes y 45 controles.

Se realizó una búsqueda extensiva en los archivos del CIGBM, entre los pacientes que consintieron voluntariamente participar en un proyecto anterior titulado **“Diagnóstico Genético Molecular en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y Becker (BMD) en Perú”**, aprobado y financiado por el Instituto de Investigación de la FMH-USMP. Se escogieron pacientes que cumplieran con ciertos criterios de selección.

Criterios de inclusión

- Que cuenten con la información sobre características fenotípicas de ambulación, dificultades para caminar, hipertrofia de gemelos, signo de Gowers, hipotonía y escoliosis.
- A los cuales se les hayan realizado ambas pruebas complementarias, tanto nivel de CPK como electromiografía.
- Los que hayan consentido voluntariamente que su ADN extraído de sangre periférica, sea almacenado en el banco de ADN del CIGBM a -80°C, y se siga utilizando con fines de diagnóstico molecular.

Criterios de exclusión

- Los de sexo femenino, ya que las distrofinopatías al ser un carácter ligado al sexo, son enfermedades predominantes en varones.
- Los que procedan de otras poblaciones diferentes a la peruana.

2.2 Procedimientos de recolección de datos

Para el diagnóstico clínico

Para la recolección de datos clínicos, el instrumento que se utilizó fue el archivo de que se encuentra en las instalaciones del CIGBM. Se revisaron todos los archivos, separando los pacientes, que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

Para el diagnóstico molecular

Se realizó en varias etapas; primero se recuperó el ADN del banco a -80°C , y para genotipar las muestras se realizaron consecutivamente las pruebas de MLPA, NGS-*target* y secuenciación Sanger.

Recuperación del ADN: Se descongelaron las muestras, se les evaluó calidad, corriendo 1ul de muestra en un gel de agarosa al 0.75% por 30min a 100v, y se cuantificaron las muestras con un espectrofotómetro NANODROP.

Técnica de la MLPA: Se realizó según el MLPA-DNA *protocol, version* MDP-v003 (MRC-*Holland* 2013), tal como se resume en la tabla 1. Se utilizaron los *probemix*: P034 y P035. Estos contienen sondas para detectar los 79 exones del gen *DMD*.

Tabla 1: Resumen de la metodología empleada para MLPA

Paso	Día	Proceso	Reactivo	Programa
1	1	Denaturación	5 uL de DNA	98°C x 5 min
2	1	Pausa	Adicionar 3 uL de master mix hibridación (1.5 uL de buffer MLPA + 1.5 de mix de sondas)	25°C
3	1	Hibridación		95°C x 1 min 60°C x 16 h
4	2	Pausa	Adicionar 32 uL de master mix ligación (25 uL de H ₂ O _d + 3 uL de buffer ligasa A + 3 uL de buffer ligasa B + 1 uL de ligasa-65)	54°C
5	2	Ligación		54°C x 20 min 98°C x 5min
6	2	Pausa	Adicionar 10 uL de master mix PCR (7.5 uL de H ₂ O _d + 2 uL de mix PCR + 0.5 de mix polimerasa)	25°C
7	2	PCR		95°C x 30 s 95°C x 30 s 60°C x 30s 72°C x 1min 72°C x 20 min 25°C

La separación de fragmentos se realiza por electroforesis capilar, para esto primero se debe realizar un pretratamiento que consiste en mezclar 1uL del producto de PCR más 0.2uL de marcador de peso (LIZ 500) y 9uL de formamida HiDi, y denaturar la mezcla por 3 min a 90°C. La separación se lleva a cabo en un equipo ABI-3500, con un capilar de 50cm y POP 7, siendo las condiciones 1.6KV de voltaje de inyección y 15 segundos de tiempo de inyección.

Análisis de la MLPA: Se realizó mediante el programa de libre acceso Coffalyser, recomendado por la MRC-*Holland*. Comprende dos etapas, una en la que se lleva a cabo un análisis de fragmentos para cada muestra, y otra donde se lleva a cabo un análisis comparativo. De la primera etapa, lo más importante es el puntaje que el programa le asigna a la reacción de la MLPA (FMRS) y de la segunda etapa lo más importante es el puntaje que el programa le da a su propio análisis (CAS).

Finalmente, se usó la relación de fluorescencia (DQ) según el MLPA *General Protocol version* MDP-003 (08-08-2013). (ver Tabla 2)

Tabla 2. Correspondencia del genotipo según el número de copias presente vs. el índice DQ asignado. Fuente: MLPA-DNA *protocol versión* MDP-v003 (MRC-Holland)

Nivel del número de copias	Cociente del dosaje
Normal	0.85 < DQ < 1.15
Duplicación heterocigota	1.35 < DQ < 1.55
Triplicación	1.70 < DQ < 2.20
Deleción heterocigota	0.35 < DQ < 0.65
Deleción homocigota	0
Número de copias ambiguo	Otros valores

Comprobación de las mutaciones de tipo deleción de un solo exón: Para estos casos se realizó la confirmación, como lo sugiere el inserto de la *probemix* P034 y P035. Se diseñó una PCR *multiplex* de dos exones, el que supuestamente está delecionado y un exón control; si el exón analizado amplifica, entonces se secuenció en busca de una pequeña mutación que sea la responsable de la falsa detección de la deleción total del exón.

PCR *multiplex*: Se analizaron seis casos (ver tabla 3), se amplificaron en reacciones por separado para cada paciente.

Tabla 3. Pacientes a los que se les realizó la PCR *multiplex*, los exones analizados y los exones utilizados como controles

Código	Exón delecionado	Tamaño amplicón	Exón control	Tamaño amplicón
DMD-18	Exón 44	268	Exón 4	196
DMD-35	Exón 51	388	Exón 4	196
DMD-62	Exón 23	423	Exón 4	196
DMD-74	Exón 7	279	Exón 49	439
DMD-83	Exón 52	113	Exón 49	439
DMD-92	Exón 45	547	Exón 4	196

Las reacciones y programas utilizados para la realización de las PCR *multiplex* se especifican en la tabla 4. Los amplicones obtenidos se separaron en una electroforesis vertical, en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 4. Pasos a seguir para las PCR *multiplex* según el exón que se utilizó como control

PCR	Reactivo	Programa		
Para el exón control 4	16.5µL de agua + 2.8µL de buffer MgCl (10X) + 1.7µL MgCl (25mM) + 0.6µL dNTPs (10mM) + 0.3µL de cada <i>primer</i> (50µM) + 0.3µL taq (5u) + 2µL ADN	94°	6min	32 ciclos
		94°	1min	
		53°	30s	
		65°	3min	
		65°	7min	
		10°	10min	
Para el exón control 49	16.5µL de agua + 2.8µL de buffer MgCl (10X) + 1.7µL MgCl (25mM) + 0.6µL dNTPs (10mM) + 0.3µL de cada <i>primer</i> (50µM) + 0.3µL taq (5u) + 2µL ADN	94°	6min	32 ciclos
		94°	1min	
		65°	30s	
		72°	3min	
		72°	7min	
		10°	10min	

Secuenciación Sanger: Se realizó en seis pasos, descritos en la siguiente tabla, en un equipo ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

Tabla 5. Pasos a seguir para la secuenciación Sanger

Paso	Proceso	Reactivo	Programa		
1	Primera PCR	17µL de agua + 2.8µL de buffer MgCl (10X) + 1.7µL MgCl (25mM) + 0.6µL dNTPs (10mM) + 0.3µL de cada <i>primer</i> (50µM) + 0.3µL taq (5u) + 2µL ADN	94°	6min	32 ciclos
			94°	1min	
			53°	30s	
			65°	3min	
			65°	7min	
			10°	10min	
2	Purificación	Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit			
3	Segunda PCR	17µL de agua + 2.8µL de buffer MgCl (10X) + 1.7µL MgCl (25mM) + 0.6µL dNTPs (10mM) + 0.3µL de cada <i>primer</i> (50µM) + 0.3µL taq (5u) + 2µL ADN	96	1min	
			96	10s	
			50	5s	
			60	2min	
			4	10min	

Paso	Proceso	Reactivo	Programa
4	Precipitación	Agregar 2µL de EDTA + 2µL de Ac. Na + 50µL de etanol absoluto	Vortex, reposar 15 min, centrifugar a 3700rpm por 45 min, invertir placa y centrifugar a 1250rpm por 1min.
		Agregar 70µL de etanol a 70°	Vortex, centrifugar a 3700rpm por 45 min, invertir placa, centrifugar a 1250rpm por 1min y reposar 20min.
5	Denaturación	Agregar 13µL de formamida HiDi	96° por 3min
6	Secuenciación	<i>A&B fast sequencing (Applied Biosystems)</i>	

Los resultados son exportados en formato “meg.”, por lo que las secuencias pueden leerse con varios programas como Chromas version 2.6.5. Se realizó la búsqueda manual de alteraciones en la secuencia basada en la secuencia estándar del GenBank (NC_000023.10).

Técnica del NGS-target: Para la realización de esta técnica, se mandaron las muestras a la empresa Macrogen en Corea, con ciertas especificaciones. Fueron enviados 20uL de cada uno de los ADN con una cantidad aproximada de 30ng/uL.

Macrogen realizó nuevamente pruebas de calidad de ADN y cuantificación de las muestras. Luego se prepararon librerías tal como lo indica el *Ion AmpliSeq DNA and RNA library preparation user guide (Thermo Fisher Scientific)*, utilizándose el kit *Ion AmpliSeq Inherited Disease Panel*. Y se corrieron las muestras en la plataforma *Ion Ampliseq PGM*. Macrogen también realizó el primer análisis de los datos obtenidos, encontrando todas las variaciones de las muestras enviadas con respecto a la secuencia estándar del GenBank (NC_000023.10).

Macrogen envió sus resultados en formato Excel, que contenía una hoja por

paciente. En ella se especificaban varios ítems, los más importantes fueron la posición dentro del genoma donde está ubicada la mutación, el cromosoma, el gen, la secuencia de origen, la respectiva secuencia alterada, el tipo de mutación, la frecuencia del alelo y un puntaje de calidad del resultado obtenido.

Análisis de Resultados del NGS-*target*

Primero se analizaron los resultados, buscando solo variaciones encontradas en el gen *DMD*. Luego se procedió a buscar una por una las posiciones de la variación en la secuencia estándar del *GenBank* (NC_000023.10).

Se identificaron variaciones intrónicas o exónicas, se anotaron las mutaciones según la nomenclatura recomendada por la HGVS (*Human Genome Variation Society*) y por quién fue reportada inicialmente, de tratarse de mutaciones nuevas (nunca antes reportadas), se les nombró también según la misma nomenclatura.

Una vez identificadas las mutaciones, se realizó un secuenciamiento Sanger, tal como se explicó anteriormente para comprobar los resultados encontrados con la NGS-*target*.

2.3 Procesamiento y análisis de los datos

Primero se realizó un análisis basado en las bases de datos, eDystrophin, UMD-TREAT-NMD *DMD mutations database* (*Universal Mutation Database-Translational Research in Europe for the Assessment and Treatment-Neuromuscular Disorders*) y la LOVD (*Leiden Open Variation Database*), para determinar la funcionalidad de las mutaciones encontradas.

Luego se realizaron análisis descriptivos de la población, evaluándose los tipos de

mutación y la distribución de los mismos, utilizándose el estadístico Chi-cuadrado. Dicho análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software STATA 12.0.

Finalmente, se procedió a calcular con el software Epidat 3.1: la sensibilidad, especificidad de la prueba MLPA, antes y después de tener los resultados de la prueba NGS-*target* que se utilizó como segundo tamizaje (“*screening*”).

2.4 Aspectos éticos

Todos los archivos de los pacientes que contienen su información básica y fotocopias de los exámenes correspondientes (pruebas de CPK y electromiografías), que se encuentran conservados en las instalaciones del CIGBM, poseen el debido consentimiento informado (ver Anexo 1) firmado, que se obtuvo por el proyecto: “Diagnóstico Genético Molecular en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y Becker (BMD) en Perú”, aprobado y financiado por el Instituto de Investigación de la FMH-USMP.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Características de la población

El presente estudio se realizó con la información de 46 pacientes varones peruanos menores de 18 años, referidos por neurólogos o pediatras genetistas, diagnosticados clínicamente con una distrofinopatía. Cada uno de ellos presentaba tres o más características fenotípicas distintivas de la enfermedad; como son, dificultad para caminar, hipertrofia de gemelos, signo de Gowers, hipotonía o escoliosis. Además, en pruebas complementarias como la concentración de CPK en suero sanguíneo tenían valores elevados (valores mayores a 174U/L en varones), y una electromiografía que evidencia un patrón neuropático.

Todos los datos clínicos se obtuvieron de los archivos del CIGBM y todas las muestras (ADN) poseen un consentimiento informado firmado, que especifica que tanto la información clínica del paciente, como el ADN extraído a partir de su sangre periférica y almacenado en el banco de ADN (a -80°C) del CIGBM, se podría utilizar en un futuro para investigación en relación al diagnóstico genético molecular de la enfermedad.

También se utilizó la información y ADN de 45 controles varones peruanos sanos, del banco de ADN del CIGBM. A todos los ADN se les comprobó calidad y tenían bandas conservadas, con concentraciones iguales o mayores a 25ng/μL.

Diagnóstico Molecular por MLPA

Como el diagnóstico molecular se llevó a cabo en varias fases, se obtuvieron los resultados por partes; primero, mediante la prueba MLPA se solucionaron el 57% de los casos, se encontraron 22 casos de deleciones y cuatro de duplicaciones de

uno o más exones (ver tabla 6). De estos, tres deleciones y una duplicación, son mutaciones no reportadas previamente.

Por otro lado, de los 22 casos de deleciones, seis son deleciones de un único exón. A estos se les realizó una reacción de PCR *multiplex* tal como se especifica en la metodología para comprobar que se trate de la pérdida de todo el exón y no solo de una alteración dentro de dicho exón. Como resultado, solo en uno de los casos se obtuvo el amplificado del exón implicado, y posteriormente se encontró una pequeña mutación del tipo *nonsense*.

Tabla 6. Relación de pacientes con una distrofinopatía y sus correspondientes mutaciones según MLPA

Código	Tipo de Mutación	Impacto en el marco de lectura	Mutación	Mutación Reportada	Mutación Reportada
DMD-13	Delección	Exón 4-7	Out of frame	c.(?_187-1)_(649+1_?)del	Schwartz (2004)
DMD-14	Delección	Exón 48-52	Out of frame	c.(?_6913-1)_(7660+1_?)del	Schwartz (2004)
DMD-18	Delección	Exón 44	Out of frame	c.(?_6291-1)_(6438+1_?)del	Moizard (1998)
DMD-21	Duplicación	Exón 18-30	Out of frame	c.(?_2169-1)_(4233+1_?)dup	no
DMD-23	Duplicación	Exón 2	Out of frame	c.(?_32-1)_(93+1_?)dup	Hamed (2006)
DMD-24	Delección	Exón 46-53	Out of frame	c.(?_6615-1)_(7872+1_?)del	Prior (2005)
DMD-25	Delección	Exón 8-9	Out of frame	c.(?_650-)_(960+1_?)del	Zeng (2007)
DMD-33	Delección	Exón 48-52	Out of frame	c.(?_6913-1)_(7660+1_?)del	Schwartz (2004)
DMD-35	Delección	Exón 51	Out of frame	c.(?_7310-1)_(7542_?)del	Moizard (1998)
DMD-39	Delección	Exón 45-50	Out of frame	c.(?_6439-1)_(7309+1_?)del	Schwartz (2004)
DMD-40	Delección	Exón 5-44	In frame	c.(?_265-1)_(6438+1_?)del	Taylor (2007)
DMD-45	Delección	Exón 45-50	Out of frame	c.(?_6439-1)_(7309+1_?)del	Schwartz (2004)

Código	Tipo de Mutación	Impacto en el marco de lectura	Mutación	Mutación Reportada	Mutación Reportada
DMD-50	Duplicación	Exón 2	Out of frame	c.(?_32-1)_(93+1_?)dup	Hamed (2006)
DMD-51	Delección	Exón 45-50	Out of frame	c.(?_6439-1)_(7309+1_?)del	Schwartz (2004)
DMD-58	Delección	Exón 46-47	Out of frame	c.(?_6615-1)_(6912+1_?)del	Schwartz (2004)
DMD-62	<i>Nonsense</i>	Exón 23	-----	c.2991C>G	Taylor (2007)
DMD-64	Delección	Exón 14-48	In frame	c.(?_1603-1)_(7098+1_?)del	no
DMD-69	Delección	Exón 48-50	Out of frame	c.(?_6913-1)_(7310+1_?)del	Prior (2005)
DMD-71	Delección	Exón 20-44	Out of frame	c.(?_2381-1)_(6438+1_?)del	Chelly (1991)
DMD-74	Delección	Exón 7	Out of frame	c.(?_531-1)_(649+1_?)del	Tuffery-Giraud (2009)
DMD-77	Delección	Exón 58-79	In frame	c.(?_8548-1)>(*1_?)del	no
DMD-79	Duplicación	Exón 52	Out of frame	c.(?_7543-1)_(7660+1_?)dup	Prior (2005)
DMD-80	Delección	Exón prom-29	Out of frame	c.?(4071+1_?)del	no
DMD-83	Delección	Exón 52	Out of frame	c.(?_7543-1)_(7660+1_?)del	Darras (1988)
DMD-87	Delección	Exón 3-7	Out of frame	c.(?_94-1)_(649+1_?)del	Baumbach (1989)
DMD-92	Delección	Exón 45	Out of frame	c.(?_6439-1)_(6614+1_?)del	Bakker (1989)

Nota: La nomenclatura utilizada para nombrar las mutaciones es la recomendada por la HGVS (*Human Genome Variation Society*), y en negrita se distinguen las mutaciones antes no reportadas.

A continuación, se describen dos de los casos no reportados previamente, un ejemplo de duplicación y otro de delección.

Paciente DMD-21

Paciente de 10 años, que presentó signo de Gowers, empezó a caerse a los 8 años y ya no camina, presenta inflamación del corazón desde los 8 años. Los exámenes complementarios revelan un CPK elevado y una electromiografía positiva. En

cuanto a la historia familiar, por el lado materno, el paciente tuvo un tío que falleció de causas desconocidas, dos tíos que fallecieron a los 19 y 18 años y que estuvieron en silla de ruedas los últimos años de sus vidas, también tiene un primo de un año diagnosticado clínicamente con una distrofia muscular. (ver figura 9).

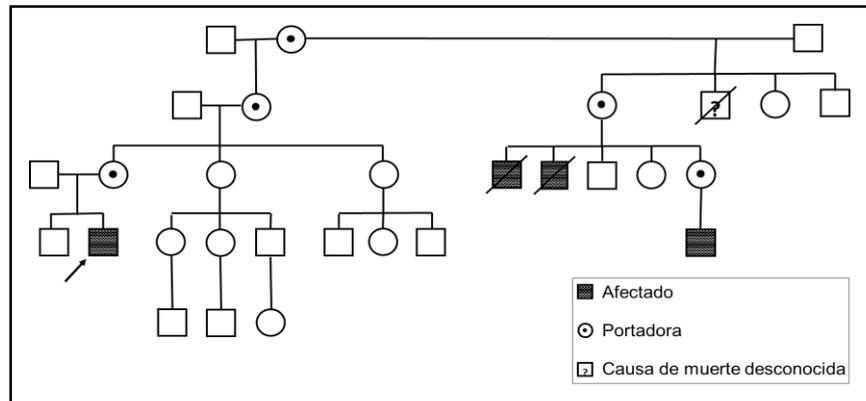


Figura 9. Heredograma familiar del paciente DMD-21.

A este paciente previamente se le habían realizado los test de Chamberlain y Beggs, no encontrándose ninguna alteración. Sin embargo, la prueba MLPA indica una duplicación de 17 exones, desde el exón 18 hasta el 30, con un DQ promedio de 2(ver figura). Gracias al esquema presentado (figura), se puede entender que cuando se duplica esta región se altera el marco de lectura (out of frame).

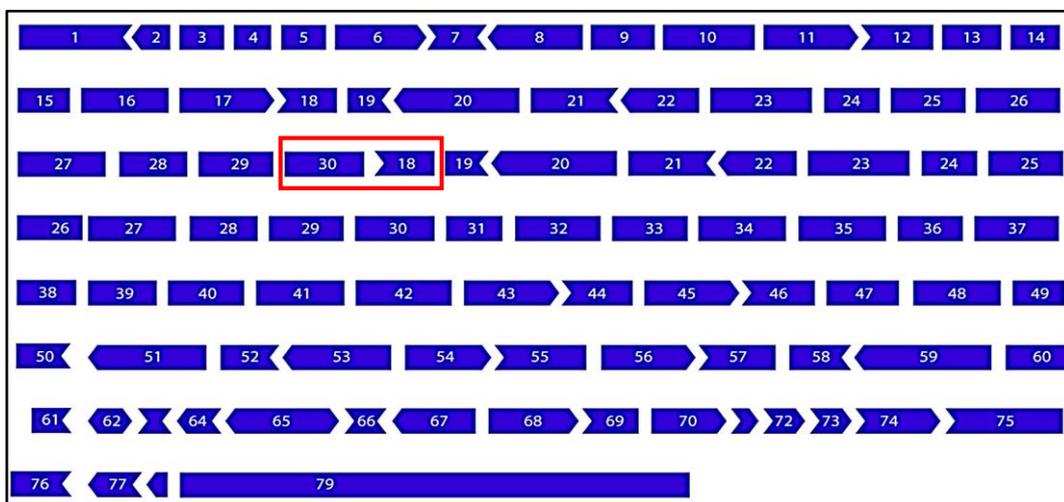


Figura 10. Esquema representativo de como se ve afectado el marco de lectura del gen *DMD* para el paciente DMD-21.

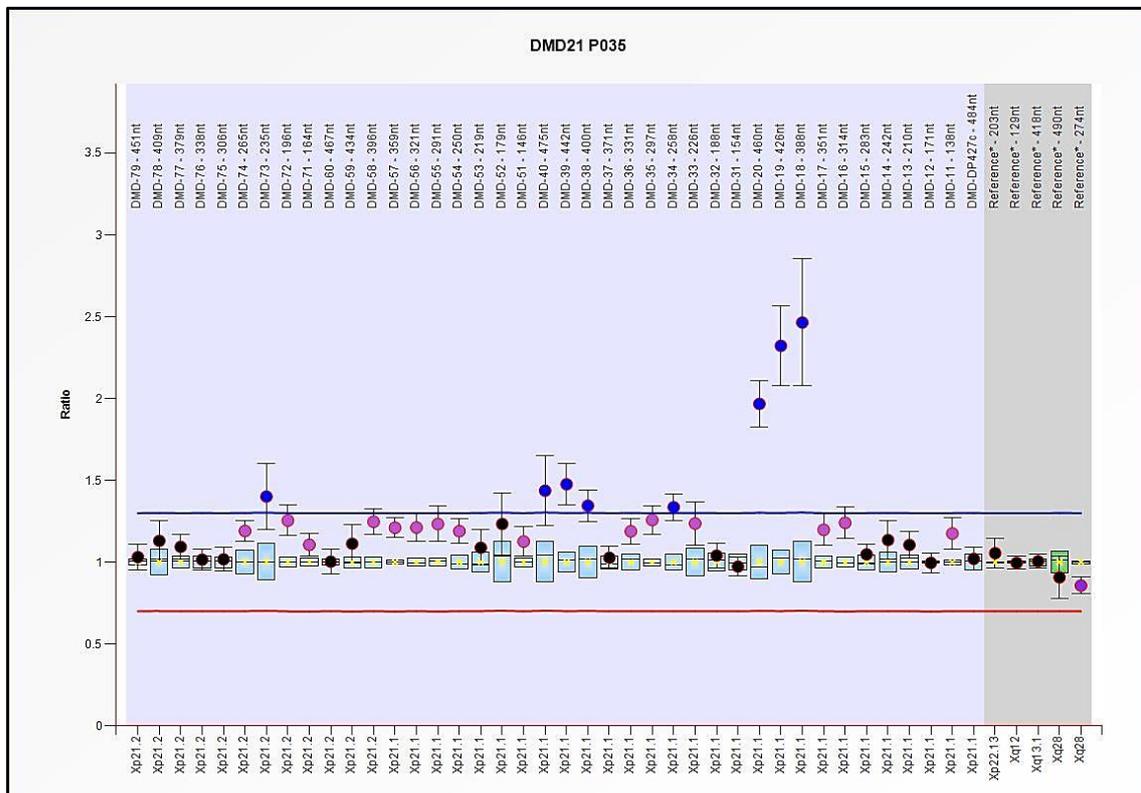
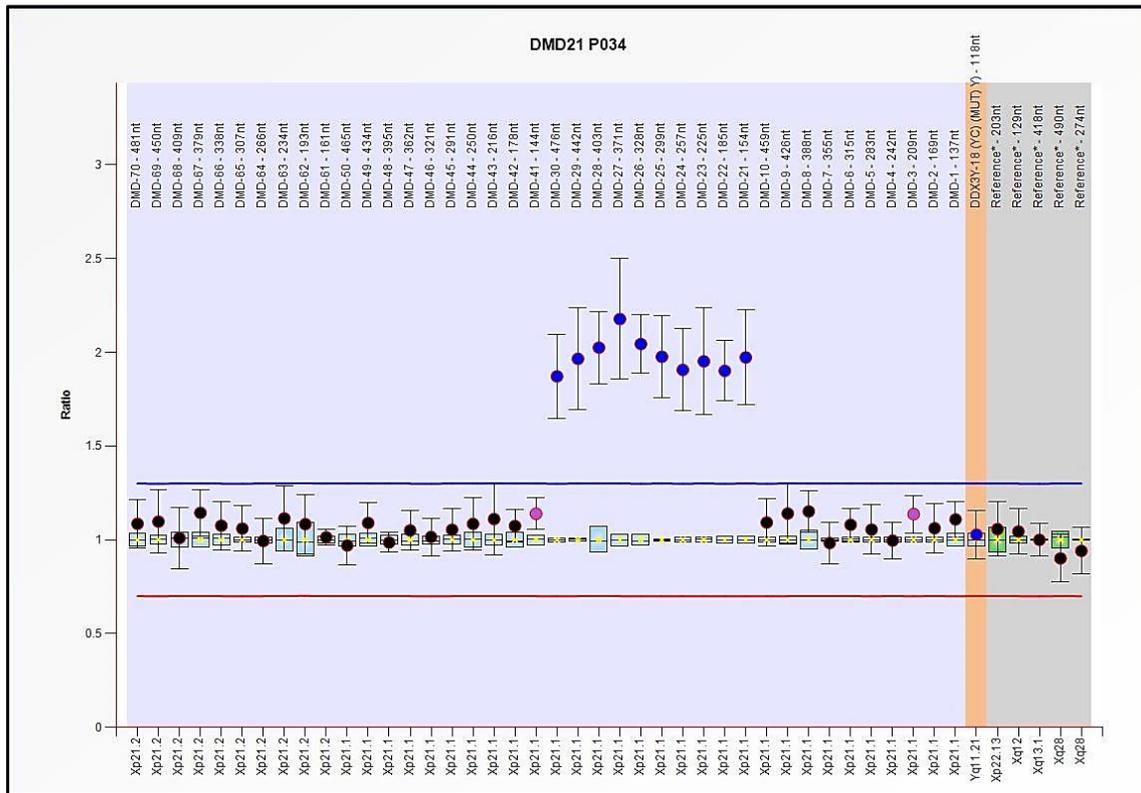


Figura 11: Diagrama del resultado obtenido con los Probemix P034 y P035 para el paciente DMD-21. Arriba se observa el resultado con la Probemix P034, una duplicación de los exones 21 al 30; y abajo con la Probemix P035, una duplicación de los exones 18 al 20 (puntos azules).

Paciente DMD-77

Paciente de 14 años, presenta hipertrofia de gemelos, empezó a tener dificultad para caminar a los nueve años, pero aún puede desplazarse, los exámenes complementarios muestran CPK elevado y una electromiografía que evidencia una miopatía. El paciente es el tercer hijo de una pareja, y su madre es hija única. (ver figura 12)

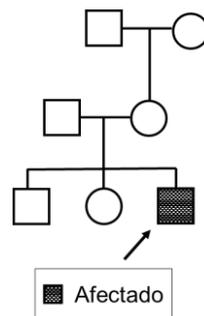


Figura 12. Heredograma familiar del paciente DMD-77.

La prueba MLPA indica una delección de 22 exones, desde el exón 58 hasta el 79, con un DQ promedio de 0 (ver figura 14). Gracias al esquema presentado (ver figura 13), se puede entender que cuando se pierde esta región no se altera el marco de lectura (in frame).

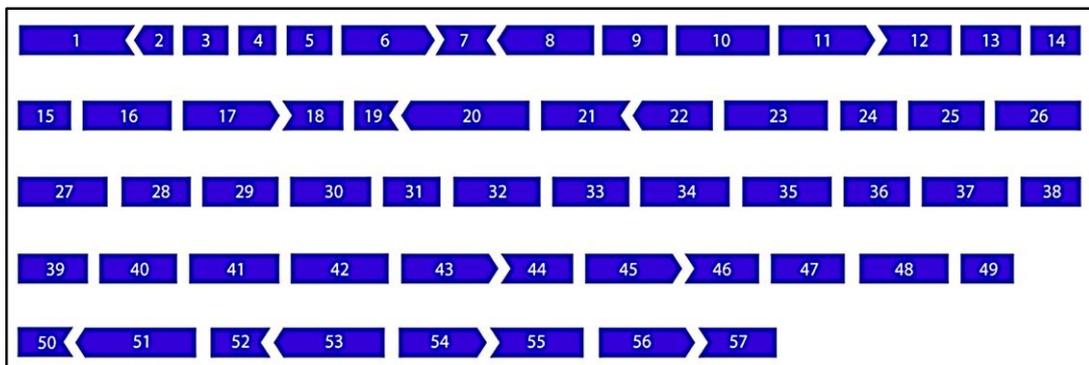


Figura 13. Esquema representativo de como se ve afectado el marco de lectura del gen *DMD* para el paciente DMD-77.

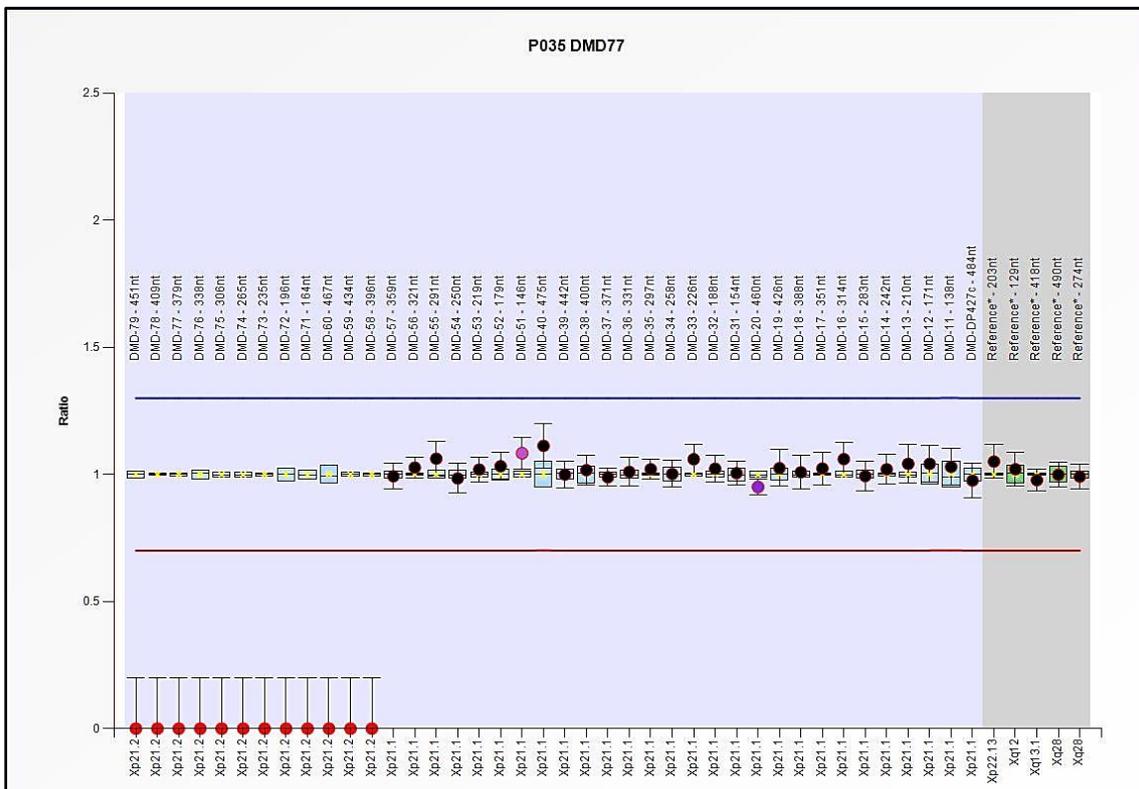
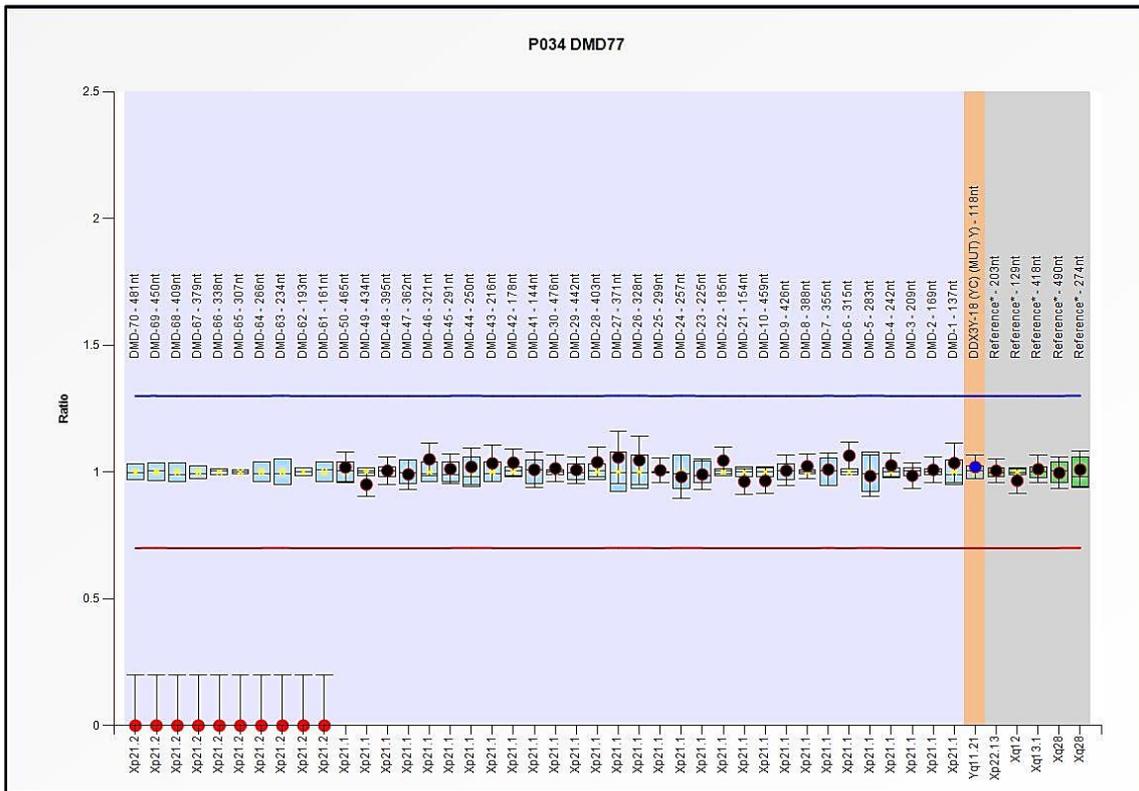


Figura 14: Diagrama del resultado obtenido con los Probemix P034 y P035 para el paciente DMD-77. Arriba se observa el resultado con la Probemix P034, una delección de los exones 61 al 70; y abajo con la Probemix P035, una delección de los exones 58 al 60 y del 71 al 79 (puntos rojos).

Diagnóstico Molecular por NGS-target

El segundo análisis, por medio de la prueba NGS-target, realizado solo a los pacientes que resultaron negativos para la prueba de la MLPA (20 individuos), identificó 14 casos de mutaciones sin sentido (*nonsense*), cuatro casos de mutaciones de cambio de marco de lectura (*frameshift*) y dos casos de mutaciones que alteran el *splice site* (ver tabla 7).

De las mutaciones identificadas gracias al NGS-target y comprobadas por secuenciación Sanger, se encontraron siete no reportadas antes, cuatro de tipo *nonsense* y tres de tipo *frameshift*.

Tabla 7. Relación de pacientes con una distrofinopatía y sus correspondientes mutaciones según NGS-target y comprobadas por secuenciación Sanger.

Código	Posición en GRCh37.p13	Tipo de Mutación	Región Afectada	Mutación	Mutación Reportada
DMD-10	32305683	<i>Frameshift</i>	Exón 43	c.6253 delT	No
DMD-11	32613940	<i>Frameshift</i>	Exón 13	c.1533_1536 delGTGA	Brezin (2005)
DMD-22	31279081	<i>Nonsense</i>	Exón 63	c.9277C>T	No
DMD-31	32382719	<i>Nonsense</i>	Exón 36	c.5134C>T	Flanigan (2009)
DMD-34	32398632	<i>Nonsense</i>	Exón 34	c.4840G>T	No
DMD-36	32490285	<i>Nonsense</i>	Exón 22	c.2945T>A	No
DMD-38	32490364	<i>Nonsense</i>	Exón 22	c. 2866C>T	Taylor (2007)
DMD-41	32482754	<i>Nonsense</i>	Exón 24	c.3224G>A	Flanigan (2009)
DMD-43	31747789	<i>Frameshift</i>	Exón 52	c.7618_7619 delAA	No
DMD-44	32472892	<i>Nonsense</i>	Exón 26	c.3490A>T	No
DMD-49	32591946	<i>Nonsense</i>	Exón 14	c.1620G>A	...
DMD-52	31366736	<i>Nonsense</i>	Exón 61	c.9100C>T	Flanigan (2009)

Código	Posición en GRCh37.p13	Tipo de Mutación	Región Afectada	Mutación	Mutación Reportada
DMD-60	31187703	<i>Frameshift</i>	Exón 74	c.10409delT	No
DMD-63	31515036	<i>Nonsense</i>	Exón 57	c.8416C>T	Taylor (2007)
DMD-66	32632431	<i>Nonsense</i>	Exón 12	c.1471C>T	Kneppers (1995)
DMD-67	32466617	<i>Nonsense</i>	Exón 27	c.3742C>T	Flanigan (2009)
DMD-68	31196785	<i>Splicesite</i>	Intrón 70	c.10223+1G>A	Takehima (2010)
DMD-70	32717339	<i>Nonsense</i>	Exón 8	c.721C>T	Prior (2005)
DMD-72	32827609	<i>Splicesite</i>	Intrón 7	c.649+1G>T	Stockley (2006)
DMD-84	32398743	<i>Nonsense</i>	Exón 34	c.4729C>T	Taylor (2007)

Nota: La nomenclatura utilizada para nombrar las mutaciones es la recomendada por la HGVS (Human Genome Variation Society), y en negrita se distinguen las mutaciones antes no reportadas.

A continuación, se describen dos de los casos no reportados previamente, un ejemplo de mutación de tipo *nonsense* y otro de tipo *frameshift*.

Paciente DMD-36

Paciente de ocho años, presenta hipertrofia de gemelos, hipotonía desde el primer año y empezó a tener dificultades para caminar desde los 6 años. Los exámenes complementarios presentan un nivel de CPK elevado y una electromiografía positiva. Lamentablemente no se cuenta con el heredograma de este paciente.

La prueba NGS-*target* indica que existe un cambio de una timina (T) por una adenina (A) en la posición 32490285 (Según la referencia GRCh37.p13), esta posición se ubica en el cromosoma X, gen *DMD*, exón 22. Esta variante (c.2945T>A) fue comprobada mediante secuenciación Sanger (ver figura15),

gracias a la cual se observa cómo el cambio de una timina por una adenina, provoca un cambio del aminoácido leucina (TTG) a un codón de parada (TAG).

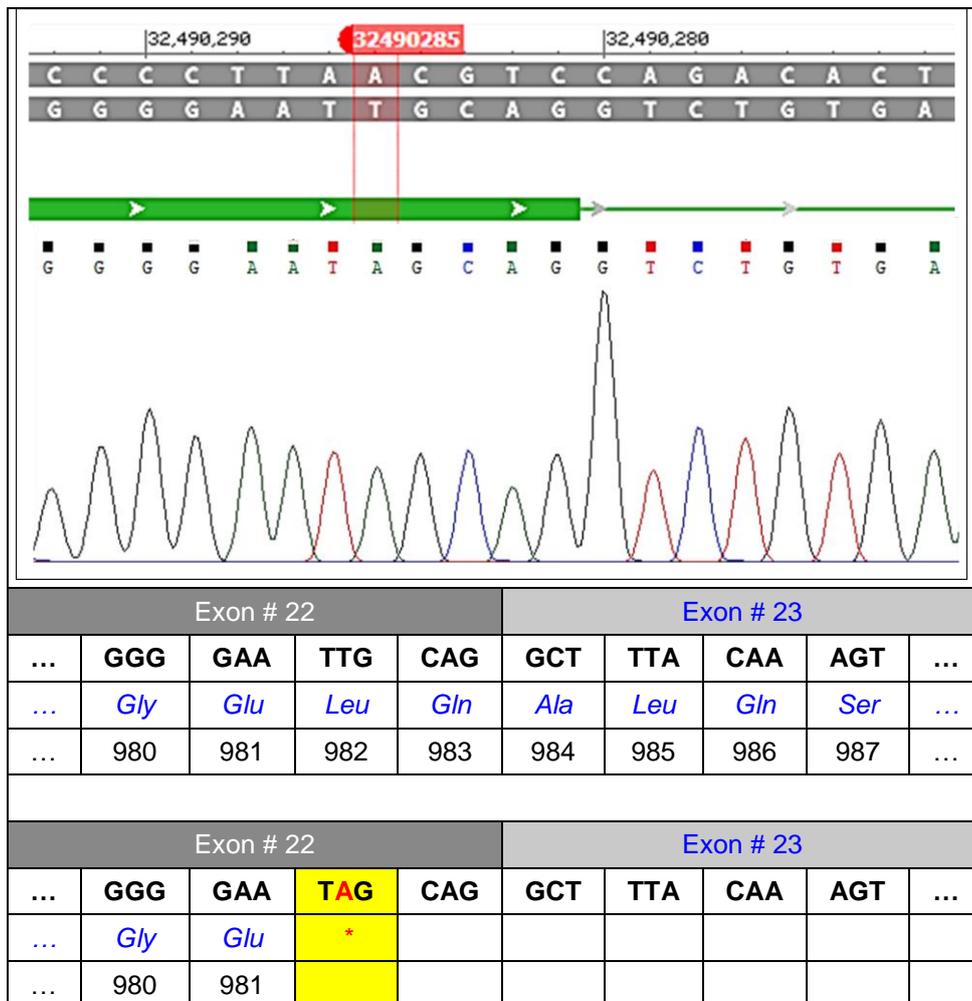


Figura 15. Secuencia del exón 22 para el paciente DMD-36. Arriba comparación de la secuencia estándar del GenBank (NC_000023.11) con la secuencia forward del paciente. Abajo evaluación del cambio de codones en la traducción de la proteína.

Paciente DMD-60

Paciente de ocho años, con hipertrofia de gemelos, hipotonía desde el primer año y empezó con dificultades para caminar a los 6 años. Los exámenes complementarios indican CPK elevado y una electromiografía positiva. En cuanto a su historia familiar, el paciente tiene un tío materno afectado (ver imagen 16).

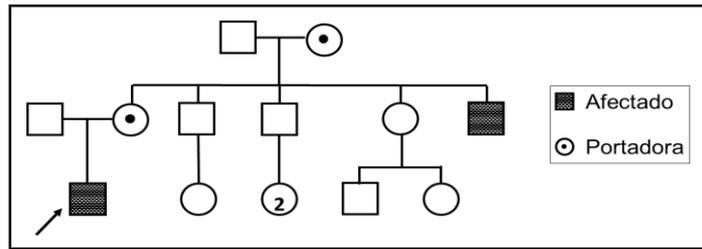


Figura 16. Heredograma familiar del paciente DMD-60

La NGS-*target* indica que existe la pérdida de una timina (T) en la posición 31187703 (Según la referencia GRCh37.p13), esta posición se ubica en el cromosoma X, gen *DMD*, exón 74. Esta variante (c.10409delT) fue comprobada mediante secuenciación Sanger (ver figura 17), gracias a la cual se observa cómo la pérdida de una timina, no provoca cambio del aminoácido en esa posición, pero si un codón más abajo, un cambio de leucina (TTA) a un codón de parada (TAA).

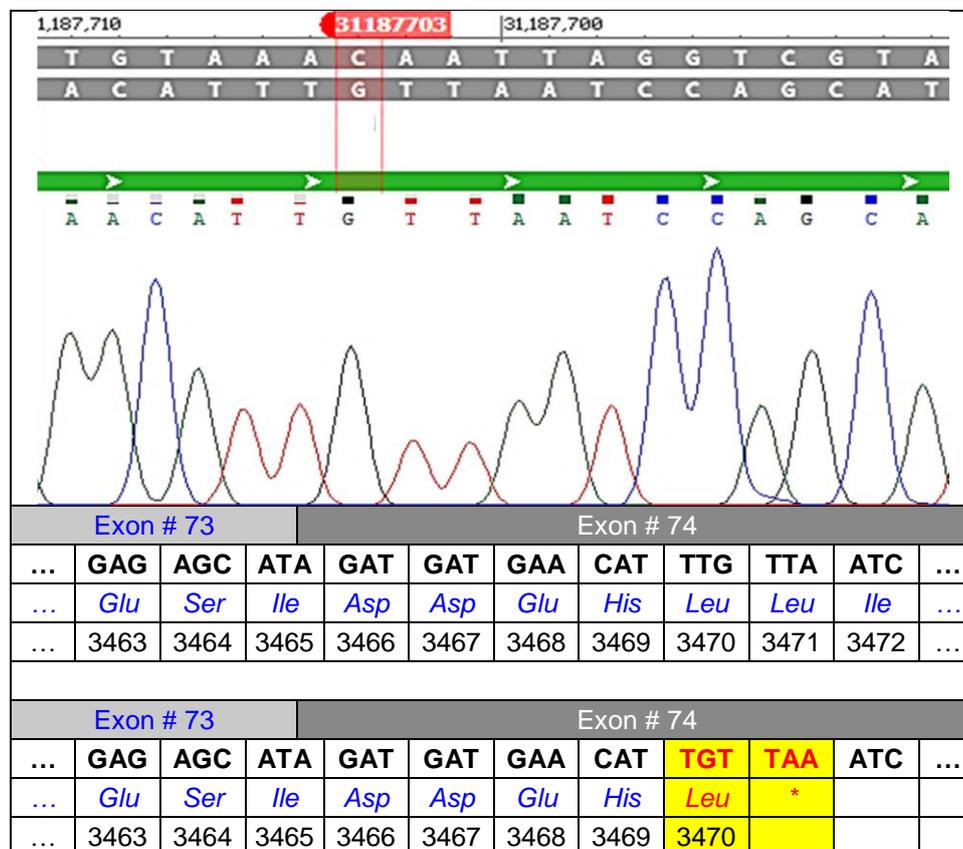


Figura 17. Secuencia del exón 74 para DMD-60. Arriba comparación de la secuencia estándar (NC_000023.11) con la secuencia forward del paciente. Abajo evaluación del cambio de codones en la traducción de la proteína

Resultados descriptivos

De los 46 pacientes analizados, 21 presentan deleciones de uno o más exones, cuatro presentan duplicaciones de uno o más exones y 21 presentan pequeñas mutaciones (ver tabla 8), las mutaciones pueden abarcar o encontrarse en diferentes exones (ver imagen 18).

Al comparar estos resultados con lo reportado por la UMD-TREAT-NMD DMD *mutations database*, mediante una prueba Chi-cuadrado, se observa que los valores obtenidos no son significativamente semejantes a los esperados.

Tabla 8. Distribución de los tipos de mutaciones en el gen DMD

Tipos de Mutaciones	UMD-TREAT-NMD DMD	Datos Presentes	Chi Cuadrado
Deleciones	68%	45.65%	
Duplicaciones	11%	8.70%	0,8177
Pequeñas Mutaciones	21%	45.65%	
<i>Nonsense</i>	50%	71.43%	
<i>Frameshift</i>	34%	19.05%	0,9789
<i>Splicesite</i>	14%	9.52%	
<i>Missense</i>	2%	0.00%	

De los 21 pacientes con pequeñas mutaciones (20 diagnosticados por NGS-target y uno por MLPA), 15 son de tipo *nonsense*, cuatro de tipo *frameshift* y dos de alteración de *splicesite* (ver tabla 8). Al comparar esto con lo reportado por la UMD-TREAT-NMD DMD *mutation database*, mediante la prueba Chi-cuadrado, los valores obtenidos no son significativamente semejantes a los esperados.

Validación de la prueba diagnóstica MLPA

El primer análisis de validación de la prueba MLPA, sobre un total de 46 pacientes, 26 resultaron con mutaciones en el gen *DMD* del tipo deleción o duplicación; lo que

nos indica un porcentaje de sensibilidad del 57% y un porcentaje de especificidad del 100% para la prueba de la MLPA.

Tabla 9. Primera tabla de contingencia para la prueba MLPA

	Enfermos	Sanos
MLPA Positivo	26	0
MLPA Negativo	20	45
Total	46	45

Sin embargo, como la prueba de la MLPA solo es capaz de detectar mutaciones del tipo deleción o duplicación, se realiza un segundo análisis de validación considerando como el total de pacientes a los 26 positivos, después de descartar mediante el *NGS-Target* que los demás pacientes presentan pequeñas mutaciones. Este segundo análisis indica un porcentaje de sensibilidad y especificidad del 100%.

Tabla 5. Tabla de contingencia corregida para la prueba MLPA

	Enfermos	Sanos
MLPA Positivo	26	0
MLPA Negativo	0	25
Total	26	25

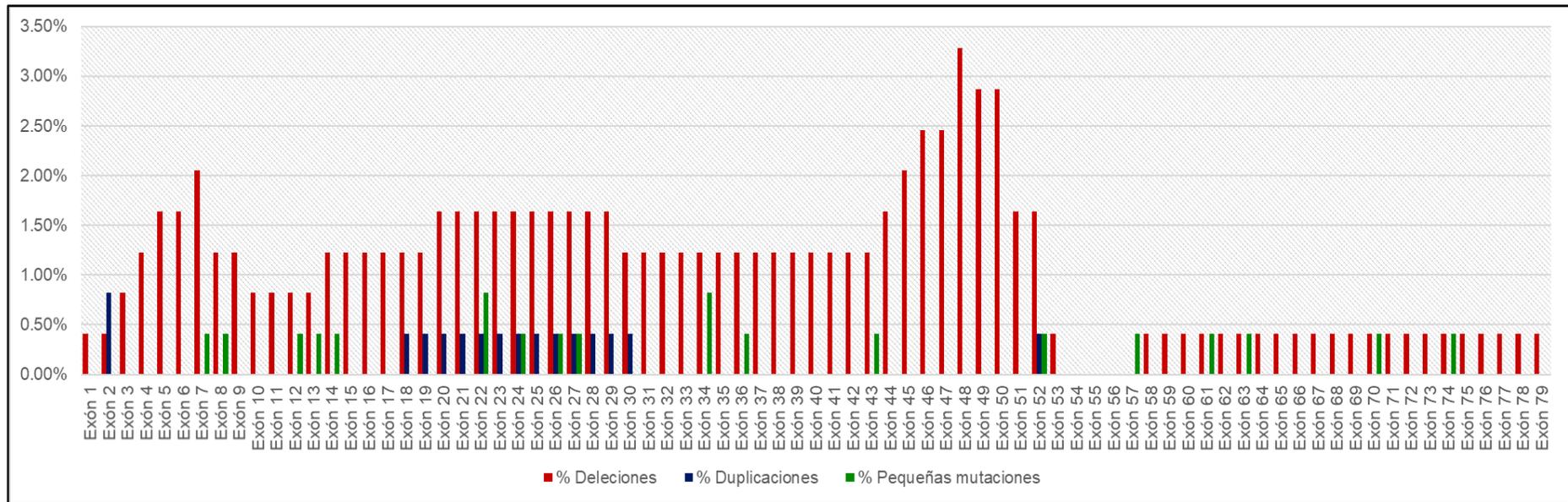


Figura 18. Distribución de los tipos de mutaciones presentes por exones.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Existen muchos tipos de distrofias musculares que presentan síntomas o signos similares, pero cada una puede tener una causa diferente. Por ello el diagnóstico de estas enfermedades se hace más complicado.⁴⁶

Para algunos tipos de distrofia muscular, Duchenne o Becker (distrofinopatías), que son enfermedades monogénicas, el diagnóstico molecular es el más adecuado. Sin embargo, elegir una técnica adecuada puede ser un problema.³²

Actualmente, en primera instancia, el diagnóstico clínico se realiza mediante una exploración física, presencia de signos característicos, y con la ayuda de algunas pruebas complementarias, sensibles, pero poco específicas como la CPK y la electromiografía, tal como lo describen Beggs & Kunkel, en 1990. Ellos también describen el uso de la biopsia muscular ya que es una prueba muy específica, sin embargo, en el presente está considerada una prueba muy invasiva y por lo tanto, poco recomendada.^{4,5,40}

En cuanto al diagnóstico molecular de las distrofinopatías, la búsqueda de mutaciones en el gen *DMD*, ha ido evolucionando. Desde la aparición de la PCR y su validación como técnica diagnóstica; como los test (PCR *multiplex*) que llevan el nombre de sus inventores, descritos por Chamberlain *et al.*, en 1988; Beggs *et al.*, en 1990; y Kunkel *et al.*, en 1986. Estos permiten detectar la presencia o ausencia de nueve, nueve y seis exones del gen *DMD* respectivamente.^{6,7,38} En hospitales peruanos aún se utilizan los test de Chamberlain y de Beggs. Sin embargo, aunque estos tres test logran evaluar 24 exones en regiones con alta probabilidad de variación (*hotspots*), esto no es suficiente ya que el gen *DMD* tiene 79 exones. Además, esta técnica solo permite detectar deleciones de los exones más no

duplicaciones, y únicamente de individuos homocigotos. También se puede realizar la secuenciación Sanger de todos los exones por separado y buscar mutaciones, pero se tienen que realizar 79 reacciones de PCR, una por cada exón, y luego 158 reacciones de secuencia en *forward* y *reverse*. Esto implica un mayor gasto de dinero y tiempo.^{40,41}

La técnica MLPA permite la amplificación de hasta 50 regiones a la vez, por lo que solo en dos reacciones se logran amplificar los 79 exones del gen *DMD*. Otras ventajas de la técnica son, que es capaz de detectar no solo deleciones sino también duplicaciones de uno o más exones, y además detectar si las mujeres son portadoras de las mutaciones.¹²⁻¹⁵

En este trabajo se evaluaron mediante la técnica MLPA a 46 pacientes con distrofia muscular, de los cuales 21 presentan deleciones, cuatro duplicaciones de uno o más exones del gen *DMD* y una mutación *nonsense*. Bladen *et al.*, en 2015, en la UMD-TREAT-NMD *DMD mutation database*, indican que el porcentaje de deleciones es de 69% y el de duplicaciones es del 11%, por lo que se esperaría que la MLPA resuelva el 80% de los casos.⁴⁷ En el presente estudio, gracias a la MLPA solo se resolvió el 57% de los casos. Sin embargo, este porcentaje no se debe a la capacidad de la técnica sino a la distribución mutacional de esta población, tal como se detallará más adelante.

Cabe mencionar que la MLPA no es una técnica validada para diagnóstico como lo es la PCR y secuenciación Sanger, por ello es importante analizar muy bien los resultados. El inserto de las *probemix* P034 y P035 (*MRC-Holland*), indica que en el caso de duplicaciones de uno o más exones no hay lugar a dudas siempre y cuando el DQ se encuentre entre 1.85 y 2.15, en el caso de deleciones, si se trata

de varios exones tampoco existen dudas (DQ de cero), pero si se trata de la presencia de una deleción de un solo exón, aunque el DQ sea cero, la *MRC-Holland* recomienda comprobarla mediante una PCR. Como lo ha reportado Schwartz & Duno, en 2004, la primera vez que se utilizó la MLPA para la búsqueda de mutaciones en el gen DMD; y también otros autores como Jansenn *et al.*, en 2005 que reportan una mutación *nonsense* nueva encontrada indirectamente por la MLPA, o Bai *et al.*, en 2016 que trabajaron con una población más grande (433 familias) y encontraron tres pequeñas mutaciones de 57 casos de deleciones de un solo exón.^{8,11,14,23} En el presente estudio se encontraron seis pacientes con deleciones de un solo exón, las cuales fueron comprobadas mediante una PCR *multiplex* de dos fragmentos y solo en uno de los casos se obtuvo el amplicón del exón comprometido, fragmento que se secuenció hallándose una mutación *nonsense*.

Por lo expuesto, al parecer la MLPA es muy sensible a nivel del reconocimiento entre las sondas y el ADN genómico, en este caso en particular, se trata del exón 23, y la pequeña mutación se encuentra en la región de complementariedad con la sonda, y es por esto que el cambio de una citosina por una guanina altera el reconocimiento por lo que aparece finalmente como si todo el fragmento estuviese deletado.

En este trabajo en casos de MLPA negativos, se utiliza como segunda técnica de búsqueda de mutaciones, la *NGS-target*, tal como se ha utilizado en otros trabajos; como Li *et al.*, en 2016, resolvieron el 82.7% por MLPA y el 17.3% por NGS más secuenciación Sanger; o, Bai *et al.*, en 2016, encontraron mutaciones en el 73% de los casos por MLPA y en el 21% por NGS más secuenciación Sanger; o, Zhong *et*

al., en 2017, solucionaron el 70.65% por MLPA y el resto por NGS-*target*.^{22,23,25} Aquí se reporta que el 43% restante de los pacientes presentaban pequeñas mutaciones, gracias al NGS-*Target*, mediante el “*Ion AmpliSeq inherited disease panel target*”. Además, éstas fueron comprobadas mediante secuenciación Sanger, tal como lo recomiendan los diferentes autores.

Esta población de pacientes peruanos con una distrofinopatía, presenta en un 45.5% de los casos deleciones de uno o más exones, en un 9% de los casos, duplicaciones de uno o más exones y en un 45.5% de los casos, pequeñas mutaciones. Esto resulta significativamente diferente ($p=0.8607$) a lo reportado por Bladen *et al.*, en 2015, en la UMD-TREAT-NMD DMD *mutation database*, (68%, 11% y 21%, respectivamente)²¹, una de la bases de datos internacional más completas. Otras bases de datos reconocidas que señalan datos similares son; LOVD, reportada por Aartsma-Rus *et al.*, en 2006, que indica un 66% de grandes deleciones, un 12% de grandes duplicaciones y un 22% de pequeñas mutaciones¹⁶, y eDystrophin, reportada por Nicolas *et al.*, en 2012, que indica un 64% de grandes deleciones, 22% de grandes duplicaciones y 14% de pequeñas mutaciones.¹⁷

Es importante señalar que las bases de datos mencionadas son europeas, y quizá la gran diferencia geográfica sea una respuesta a la diferencia significativa de las frecuencias mutacionales del gen *DMD* en esta población. En China también se han realizado trabajos similares, como; Guo *et al.*, en 2015, que genotipa una población de pacientes con DMD indicando también datos similares a los de las poblaciones europeas, un 64.6% de grandes deleciones, un 10.3% de grandes duplicaciones y 25.1% de pequeñas mutaciones.²⁰ Y Zhong *et al.*, en 2017, que al igual que en este trabajo utilizaron en primera instancia MLPA, en los casos

negativos, NGS-*target* más secuenciación, ellos indicaron un 68% de grandes deleciones, 9% de grandes duplicaciones y un 23% de pequeñas mutaciones.²⁵

Por lo tanto, en nuestra población las deleciones de uno o más exones del gen *DMD* no son la causa más común de una distrofinopatía, sino que aparentemente tanto las deleciones como las pequeñas mutaciones se presentan en frecuencias iguales.

En cuanto a las pequeñas mutaciones, en el presente estudio, el mayor porcentaje fue de mutaciones de tipo *nonsense* (71%), seguido muy por debajo por las mutaciones *frameshift* (19%) y *splice-site* (10%). Bladen *et al.*, en 2015, en la UMD-TREAT-NMD *DMD mutation database* indica que el tipo de mutaciones *nonsense*, *frameshift* y *splice-site* se presentan en un 50%, 34% y 14%, respectivamente²¹; entonces, la distribución de las pequeñas mutaciones en esta población de pacientes con distrofinopatías también es significativamente diferente ($p=0.9745$), aparentemente debido a un aumento de mutaciones de tipo *nonsense* y una disminución de las de tipo *frameshift* en esta muestra.

Además, según Guo *et al.*, en 2015, en la población china se presenta un 49% de pequeñas mutaciones tipo *nonsense*, 36% de *frameshift* y 15% de *splice-site*²⁰, datos similares a las frecuencias europeas. Sin embargo recientemente, Wang *et al.*, en 2017, para una muestra del sur de China indicaron una frecuencia un tanto diferente (44% *nonsense*, 46% *frameshift* y 10% *splice-site*)²⁶, tanto a la población europea como a la nuestra, ya que se presentan en porcentajes similares las mutaciones de tipo *nonsense* y *frameshift*.

Entre los 46 pacientes evaluados, se presentan 42 mutaciones diferentes, siendo la mutación que más se repite (tres veces) la deleción de los exones del 45 al 50.

Además la mayoría de deleciones también se presentan entre los exones 45 y 50, dato que coincide con lo reportado para poblaciones europeas, primero por Aartsma-Rus *et al.*, en 2006, que en la base de datos LOVD, indican que la región *hotspot* para largas deleciones en el gen DMD se encuentra entre los exones 45 y 53¹⁶, luego, lo reportado por Bladen *et al.*, en 2015, que en la UMD-TREAT-NMD DMD *mutation database*, indican la región *hotspot* entre los exones 45 y 55.⁴⁷ Y también para la población china, reportado por Yang *et al.*, en 2013 y por Guo *et al.*, en 2015, que indican que la región *hotspot* para las grandes deleciones se encuentra entre los exones 45-54.^{18,20}

De las 42 mutaciones encontradas, 12 son mutaciones nunca antes reportadas, comprobadas mediante la búsqueda en las diferentes bases de datos; LOVD, reportada Aartsma-Rus *et al.*, en 2006¹⁶, UMD-TREAT-NMD DMD *mutation database* reportada por Bladen *et al.*, en 2015²¹ y eDystrophin reportada por Nicolas *et al.*, en 2012.¹⁷ Cuatro de ellas fueron detectadas por MLPA, una duplicación: c.(?_2169-1)_(4233+1_?)dup; tres deleciones: c.(?_1603-1)_(7098+1_?)del, c.(?_8548-1)_(?_?)del y c.?(4071+1_?)del; y siete pequeñas mutaciones detectadas por NGS-*target* y verificadas por secuenciación Sanger, entre ellas cuatro *nonsense*: c.9277C>T, c.4840G>T, c.2945T>A y c.3490A>T, y tres de tipo *frameshift*: c.6253 delT, c.7618_7619 delAA y c.10409delT.

En lo referente a la validación de la técnica MLPA como medio de diagnóstico molecular, se demuestra que presenta una sensibilidad y especificidad del 100%, pero solo para la detección de deleciones y duplicaciones de uno o más exones, que al parecer en nuestra población se encuentra alrededor del 54%, valor significativamente menor que lo reportado para poblaciones europeas; 78% en la

base de datos LOVD, reportada por Aartsma-Rus *et al.*, en 2006¹⁶, 79% en la UMD-TREAT-NMD DMD *mutation database* reportada por Bladen *et al.*, en 2015²¹ y 86% en la eDystrophin reportada por Nicolas *et al.*, en 2012.¹⁷ También es diferente a lo indicado en poblaciones chinas, por una metodología idéntica a la utilizada en este trabajo, un 82.7% reportado por Li *et al.*, en 2016²², un 77.5% reportado por Bai *et al.*, en 2016²³ y un 76.7% reportado por Zhong *et al.*, en 2017.²⁵ Por lo tanto, al parecer la técnica del MLPA para diagnóstico en la población peruana no es tan eficiente como para otras poblaciones.

En el presente trabajo se evalúan la sensibilidad y especificidad de la MLPA con respecto a un diagnóstico clínico, pero desde que apareció esta metodología, se han realizado diversos estudios de validación. Por ejemplo, Schwartz & Duno, en 2004, compararon la MLPA con la PCR multiplex o el Southern blot¹¹; Lalic *et al.*, en 2005, la confrontaron solo contra la PCR multiplex¹²; Jansenn *et al.*, en 2005, la compararon con la PCR multiplex o por FISH (fluorescence in situ hybridization)¹⁴ y Lai *et al.*, en 2006, que también realizaron la comparación con la PCR multiplex¹⁵; todos ellos concluyeron que la MLPA es más sensible y específica que las demás técnicas.

La validación de la NGS-*target* en este trabajo, no se ha realizado. Sin embargo, cabe mencionar que tanto Wei *et al.*, en 2014 y Okubo *et al.*, en 2016^{19,24}, realizaron una validación de la NGS-*target* versus MLPA y secuenciación Sanger, concluyendo ambos que esta es 99.99% sensible y específica para la detección de largas deleciones, 50% para grandes duplicaciones y 100% para pequeñas mutaciones. Por lo tanto, para un diagnóstico molecular adecuado de las DMD/DMB, se recomienda realizar primero un tamizaje por MLPA, confirmado en

caso de tratarse de una delección de un solo exón por PCR más secuenciación Sanger. De no encontrarse una mutación por MLPA se debe realizar un NGS-*target* en busca de alguna pequeña mutación patogénica, confirmándola también por secuenciación Sanger.

La caracterización genética de una enfermedad en una determinada población y el conocimiento de los métodos más eficientes para diagnosticarla, tienen importancia médica económica y social. El que los pacientes tengan acceso a un diagnóstico temprano y certero, les permitirá estar mejor preparados para el desarrollo de la enfermedad, tener acceso a terapias que mejoren la calidad de vida del paciente o incluso ser considerados para posibles ensayos clínicos con nuevos medicamentos o terapias que le ofrezcan alguna mejora al paciente. Dentro de las novedosas terapias, se encuentran la terapia celular por medio de la inyección de células madre, o la terapia genética por medio de la conocida técnica del *exón skipping*, tal como lo reportan Aartsma-Rus *et al.*, en 2002; Nowak *et al.*, en 2004 y Falzarano *et al.*, en 2015.⁴⁸⁻⁵⁰

El acceso de la familia del paciente al asesoramiento genético es otro punto importante. Para ello es necesario armar un heredograma del paciente y conocer la historia familiar, para saber si existe la sospecha de que la enfermedad sea hereditaria. De ser así es importante confirmar la presencia de portadoras en la familia en edad fértil, para brindar el asesoramiento y tratar de prevenir futuros embarazos afectados, tal como lo sugieren Aartsma-Rus *et al.* en 2016.^{32,51}

Entonces, para llevar a cabo una consejería genética es necesario el diagnóstico de portadoras de la enfermedad, y las técnicas MLPA y NGS-*target* permiten realizar esta detección. Durante la ejecución de este estudio, se han observado

casos de familias con varios miembros afectados (hermanos, tíos maternos, primos maternos, etc.), que no recibieron diagnóstico temprano y en algunos casos no saben qué enfermedad padecían. De haber contado con esta información a tiempo, las familias pudieron haber tomado decisiones reproductivas informadas, previendo estos casos.

Por último, gracias al presente estudio se ha logrado implementar la MLPA y la NGS-*target*, para la detección de distrofinopatías, en el CIGBM. Esta es una contribución importante para detectar las mutaciones en la población peruana, que no se ha estudiado previamente. Además, se ha construido una pequeña base de datos en excel con la información de estos pacientes que posteriormente se ampliará y compartirá en bases de datos internacionales como LOVD, con miras a que nuestros pacientes puedan ser considerados en futuros ensayos clínicos.

CONCLUSIONES

- El diagnóstico molecular por MLPA resulta válido en la detección de mutaciones conocidas o nuevas, de tipo delección o duplicación, de uno o más exones en todo el gen *DMD*, con una sensibilidad y especificidad del 100%.
- Esta población de pacientes peruanos con DMD/DMB, presenta una distribución mutacional de un 45.65% de delecciones, 8.70% de duplicaciones y 45.65% de pequeñas mutaciones (71.43% del tipo *nonsense*, 19.05% *frameshift* y 9.52% *splice site*).
- Se demostró que la distribución de los tipos de mutaciones causantes de la DMD/DMB de esta población de pacientes peruanos es significativamente diferente a lo reportado por la UMD-TREAT-NMD DMD *global database*, que contiene datos de todo el mundo. Por lo que mediante la prueba MLPA, se esperaba solucionar el 57% de los casos.
- Se logró confeccionar un banco de ADN caracterizado genéticamente, que a futuro se compartirá en una base de datos internacional, para que nuestros pacientes puedan ser tomados en cuenta en futuras investigaciones clínicas, evaluación de nuevos fármacos o terapias.

RECOMENDACIONES

- Implementar la técnica MLPA como técnica diagnóstica para detectar mutaciones de tipo delección o duplicación de uno o más exones, de los 79 exones del gen *DMD*, lo que aumentará el número de pacientes correcta y tempranamente diagnosticados.
- Este estudio se realizó en una pequeña población de pacientes peruanos (la mayoría limeños) con distrofinopatías. Se debe realizar un estudio con muestras de todo el país, para confirmar la distribución significativamente diferente, de los tipos de mutaciones causantes de esta enfermedad en nuestro país.
- Realizar estudios con familias grandes, para establecer las mutaciones heredadas y de novo. Esto podría demostrar por qué la distribución de tipos de mutaciones causantes de esta enfermedad, es significativamente diferente en nuestro país.
- Realizar un estudio de costo-efectividad para las técnicas MLPA y NGS-target, versus las técnicas actualmente empleadas en nuestro país, y proponer de esta manera la mejor metodología para un diagnóstico más certero y accesible al público.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Silva CT, Fonseca DJ, Mateus H. Distrofia muscular de Duchenne y Becker. *Acta Médica Colomb.* 2005;30(3):113.
2. Bajek A, Porowinska D, Kloskowski T, Brzoska E, Ciemerych MA, Drewa T. Cell therapy in Duchenne muscular dystrophy treatment: clinical trials overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2015;25(1):1–11.
3. Cammarata-Scalisi F, Camacho N, Alvarado J, Lacruz-Rengel MA. Presentación clínica de la distrofia muscular de Duchenne. *Rev Chil Pediatría.* 2008;79(5):496–502.
4. Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 1990;85(3):613–619.
5. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77–93.
6. Chamberlain Jeffrey S., Gibbs Richard A., Ranier Joel E., Caskey Thomas. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press; 2012.
7. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 1990;86(1):45–48.
8. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-

dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57–e57.

9. Vasli N, Böhm J, Le Gras S, Muller J, Pizot C, Jost B, *et al.* Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012 Aug;124(2):273–83.
10. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):11141–11156.
11. Schwartz M, Dunø M. Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genet Test.* 2004;8(4):361–367.
12. Lalic T, Vossen RH, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, *et al.* Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(11):1231–1234.
13. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, *et al.* Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet.* 2005 Jun;117(1):92–8.
14. Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 2005 Feb;6(1):29–35.
15. Lai KKS, Lo IFM, Tong TMF, Cheng LYL, Lam STS. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe

- Amplification (MLPA). Clin Biochem. 2006 Apr;39(4):367–72.
16. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JCT, Fokkema IF, Van Ommen G-JB, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. Muscle Nerve. 2006 Aug;34(2):135–44.
 17. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan J-C, Chelly J, Leturcq F, *et al.* Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. Orphanet J Rare Dis. 2012;7(1):45.
 18. Yang J, Li SY, Li YQ, Cao JQ, Feng SW, Wang YY, *et al.* MLPA-based genotype–phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. BMC Med Genet. 2013 Mar 1;14:29.
 19. Wei X, Dai Y, Yu P, Qu N, Lan Z, Hong X, *et al.* Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study. Eur J Hum Genet. 2014 Jan;22(1):110–8.
 20. Guo R., Zhu G., Zhu H., Ma R., Peng Y., Liang D., *et al.* DMD mutation spectrum analysis in 613 Chinese patients with dystrophinopathy. J Hum Genet. 2015;
 21. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, *et al.* The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. Hum Mutat. 2015 Apr;36(4):395–402.

22. Li S, Bai Y, Zhao Z, Kong X. Mutation analysis of 81 cases with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Chin J Med Genet.* 2016;
23. Bai Y., Li S., Zong YN., Li XL., Zhao ZH., Kong XD. Mutation screening of 433 families with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Chin Med J (Engl).* 2016;
24. Okubo M, Minami N, Goto K, Goto Y, Noguchi S, Mitsuhashi S, *et al.* Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. *J Hum Genet.* 2016;61(6):483.
25. Zhong J., Xu T., Chen G., Liao H., Zhang J., Lan D. Genetic analysis of the dystrophin gene in children with Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 2017;
26. Wang DN, Wang ZQ, Yan L, He J, Lin MT, Chen WJ, *et al.* Clinical and mutational characteristics of Duchenne muscular dystrophy patients based on a comprehensive database in South China. *Neuromuscul Disord.* 2017;
27. Bushby Katherine M.D, Anderson Louise V.B. *Muscular Dystrophy: Methods and Protocols.* ilustrada. Humana Press; 2001.
28. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2(12):731–740.
29. Winder SJ, Gibson TJ, Kendrick-Jones J. Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett.* 1995;369(1):27–33.
30. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):291–

329.

31. Le Rumeur E, Winder SJ, Hubert J-F. Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 2010 Sep;1804(9):1713–22.
32. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016 Mar;53(3):145–51.
33. D'ottavio G, Parodi R, Montero M, Egri N, Carlson D, Greca A. Creatinfosfoquinasa y su aplicación clínica. *Anu Fund Dr JR Villavicencio*. 2008;16:156–159.
34. Ayala AP, Cedillo REE, Morales RE, Villaseñor CP. Estudios de imagen y electromiografía en las miopatías inflamatorias. *Reumatol Clínica*. 2009;5:23–27.
35. Nirikko AC, Rösler KM, Hess CW. Sensitivity and specificity of needle electromyography: a prospective study comparing automated interference pattern analysis with single motor unit potential analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Mot Control*. 1995;97(1):1–10.
36. Oliveira ASB, Gabbai AA, Schmidt B, Hitomi Kiyomoto B, Lima GC, Minetti C, *et al*. Carrier detection of duchenne and becker muscular dystrophy using muscle dystrophin immunohistochemistry. *Arq Neuropsiquiatr*. 1992;50(4):478–485.
37. Montejo-Pujadas Y., Zaldívar-Vaillant T., Acevedo-López A.M. Técnicas diagnósticas descritas en el estudio de la distrofia muscular de

- Duchenne/becker. Rev Neurol. 2002;
38. Kunkel Louis M. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1986;322:73–7.
 39. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1974;
 40. Santillán-Garzón S., Diego-Álvarez D, Buades C, Romera-López A, Pérez-Cabornero L, Valero-Hervás D, *et al*. Diagnóstico Molecular De Enfermedades Genéticas: Del Diagnóstico Genético Al Diagnóstico Genómico Con La Secuenciación Masiva. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2015;26(4):458–469.
 41. Bonnal RJP, Severgnini M, Castaldi A, Bordoni R, Iacono M, Trimarco A, *et al*. Reliable resequencing of the human dystrophin locus by universal long polymerase chain reaction and massive pyrosequencing. *Anal Biochem*. 2010 Nov;406(2):176–84.
 42. Niba ETE, Tran VK, Tuan-Pham LA, Vu DC, Nguyen NK, Ta VT, *et al*. Validation of ambiguous MLPA results by *targeted* next-generation sequencing discloses a *nonsense* mutation in the DMD gene. *Clin Chim Acta*. 2014 Sep;436:155–9.
 43. Cantacessi C, Jex AR, Hall RS, Young ND, Campbell BE, Joachim A, *et al*. A practical, bioinformatic workflow system for large data sets generated by next-generation sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep 1;38(17):e171–e171.
 44. Li S, Tighe SW, Nicolet CM, Grove D, Levy S, Farmerie W, *et al*. Multi-platform assessment of transcriptome profiling using RNA-seq in the ABRF next-

- generation sequencing study. *Nat Biotechnol.* 2014 Sep;32(9):915–25.
45. Froyen G, Broekmans A, Hillen F, Pat K, Achten R, Mebis J, *et al.* Validation and Application of a Custom-Designed *Targeted* Next-Generation Sequencing Panel for the Diagnostic Mutational Profiling of Solid Tumors. Scarpa A, editor. *PLOS ONE.* 2016 Apr 21;11(4):e0154038.
 46. Erazo-Torricelli R. Actualización en distrofias musculares. *Rev Neurol.* 2004;39(9):860–871.
 47. Tuffery-Giraud S, Béroud C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel-Calemard L, *et al.* Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat.* 2009 Jun;30(6):934–45.
 48. Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson AA, den Dunnen JT, van Ommen G-JB, van Deutekom JC. *Targeted* exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2002;12:S71–S77.
 49. Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* 2004 Sep;5(9):872–6.
 50. Falzarano M, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules.* 2015 Oct 7;20(10):18168–84.
 51. Lao-Villadóniga JI. Acercamiento diagnóstico y asesoramiento genético en el retraso mental. *Rev Neurol.* 2001;33:1–6.

Anexo 1: Consentimiento informado

LIBRE CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE INFORMADO

Título de la Investigación:

Diagnóstico molecular de enfermedades neuromusculares en pacientes peruanos

Estimado Señor(a):

Muchas enfermedades neuromusculares tienen origen genético y su caracterización clínica puede dificultarse debido a cambios en la evolución de los síntomas y la semejanza en los signos en las etapas muy tempranas o muy tardías. Los estudios de genética han descubierto cientos de genes involucrados en enfermedades neuromusculares y sus variantes mutantes que producen enfermedades están siendo descubiertas y ello se usa como diagnóstico. Entre las más importantes están la Distrofia Muscular de Duchenne y de Becker, Distrofia Miotónica, neuropatía de Charcot-Marie Tooth, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, etc.

La Distrofia Muscular de Duchenne (DM) es la enfermedad genética neuromuscular mas frecuente, que afecta a uno de cada 3500 - 4000 niños. Se caracteriza por debilidad y degeneración muscular progresiva. El gen responsable (DMD) ha sido identificado, y está en el cromosoma X por lo que frecuentemente se ve que afecta a varones de una familia (ejm. hermanos, o sobrinos y tíos maternos) aunque también se presenta de manera esporádica y es transmitido a través de una madre portadora sin signos clínicos. El gen produce una proteína llamada distrofina, encontrada principalmente en músculos esquelético, cardiaco y liso normales, un cambio en la información genética (mutación) de DMD produce una distrofina disfuncional o ausente que es la causa primaria de la distrofia. Una variante genética la distrofia de Becker (BD) es también un desorden que se ubica en el cromosoma X y que conlleva a debilidad muscular progresiva menos severa afectando principalmente a adultos.

¿Por qué se está haciendo esta investigación?

Ye existen genes identificados de enfermedades neuromusculares y identificar la mutación en un paciente será de utilidad para determinar la enfermedad, su evolución y tratamiento. Las mutaciones que producen DM y BM pueden ser identificadas por métodos moleculares de tal manera que sirven como diagnóstico genético para corroborar o descartar esta distrofias en los pacientes. Esta información no solo es útil para el paciente, sino que puede ser extendida a la familia en la búsqueda de personas portadoras de la mutación y ofrecer un mejor consejo genético. Determinar que es la distrofia de Duchenne es importante para el tratamiento terapéutico y quirúrgico para la mejora de la calidad de vida. Además los avances de la ciencia vislumbran nuevos tratamientos que serán realizados de acuerdo a la mutación de cada paciente.

El diagnóstico molecular no es muy accesible a la población peruana y nuestra idea es poner a disposición este servicio para beneficio de la comunidad, específicamente en enfermedades neuromusculares.


DR. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Ciudad de Lima - PERU

¿Cuál es el objetivo de la investigación?

Implementar el diagnóstico molecular de enfermedades neuromusculares para nuestro medio y determinar cuál corresponde a cada paciente y su familia. El resultado del diagnóstico guiará la estrategia de tratamiento y terapéutica a seguir en cada caso.

Entrarán al estudio los participantes elegidos

- Pacientes diagnosticados molecularmente con Distrofia Muscular de Duchenne o Becker
- Pacientes diagnosticados clínicamente con DM o BM
- Familiares potenciales portadores del gen de pacientes con diagnóstico molecular
- Otras enfermedades neuromusculares de origen genético tipificadas clínicamente.
- Pacientes que firmen este consentimiento informado.

No participarán en el estudio

- Pacientes con otras enfermedades distintas.
- Pacientes que no firmen el presente consentimiento informado

¿En que consiste su participación o de su hijo?

Se le tomará a usted o a su hijo, una muestra de sangre de la vena, 5 ml (alrededor una cucharada) que servirá para el examen de los genes en el diagnóstico molecular. Se solicitará, si tuviera, exámenes clínicos y moleculares previos.

¿Cómo es la toma de muestra?

En una sola visita para la extracción de sangre o si prefiere puede hacer sacar la muestra por una persona profesional de su confianza o en una farmacia, en este caso puede enviar la muestra en tubo de EDTA (tapa morada) al laboratorio CGBM o solicitar su recojo.

¿Qué tipo de exámenes se realizan?

Los exámenes tienen duración variada dependiendo del gen y del tipo de mutación. Se incluirán una o más de las siguientes pruebas: de PCR (polymerase chain reaction), electroforesis, RT-PCR, secuenciación y microchips de DNA. Estos exámenes genéticos se realizarán primariamente en el Centro de Genética de Biología Molecular (CGBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad San Martín de Porres. Si fuera necesario, las muestras podrían ser enviadas a laboratorios que cuenten con tecnologías más eficientes para el diagnóstico genético.

¿Cuáles son las ventajas de participar en este estudio?

Es muy importante para los padres y pacientes adultos saber con exactitud la causa de la enfermedad neuromuscular y el diagnóstico molecular permite esa identificación. Ello conlleva a pronósticos y tratamientos que son específicos para cada enfermedad genética. Además los avances de la ciencia están revelando nuevas aproximaciones y estrategias terapéuticas según el gen y sus mutaciones, el conocer la mutación en cada paciente es el paso fundamental para participar de esas nuevas terapias. El diagnóstico no solo es para los pacientes sino también involucra a posibles familiares portadores que de ese modo podrían tener, si quisieran, una planificación racional de su familia.


DR. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación



Cuando tenga su resultado un genetista le explicará la prueba y la especificidad de la mutación a usted y al neurólogo o médico tratante.

¿Cuánto tiempo tomará participar en este estudio?

Solo requeriremos de la participación en una oportunidad para la toma de muestra de sangre. El análisis puede durar algunas semanas si se tuviera resultados positivos, o varios meses si fuera necesario enviar la muestra fuera del país.

¿Qué desventajas existen de esta investigación?

No existe ninguna desventaja aparte del tiempo empleado en los exámenes, de aproximadamente 20 minutos y una toma rutinaria de sangre (5 ml) con las molestias como el dolor de la hincada al introducir la aguja para la extracción de la sangre, que a veces se acompaña de moretón.

¿Quién conocerá el resultado y si se habrá acceso público a la información?

El trabajo genético está planificado de manera de mantener el resultado fuera del alcance del público en general y mantener el anonimato respectivo. Una copia del resultado se entregará al paciente o al padre responsable en este consentimiento. La información individual o conjunta del trabajo podrá ser usada en información pública o científica resguardando la identidad del paciente o su familia.

¿Puedo retirarme o retirar mi hijo del estudio?

Si, usted o su hijo puede retirarse del estudio, solo háganos saber su negativa a participar. Si Ud, por consideraciones personales o de cualquier índole desea retirarse, bastará con comunicarlo. No habrá ninguna modificación en su atención rutinaria.

¿Tendré que realizar algún pago por los exámenes y estudios?

No, Ud. no tendrá que realizar ningún tipo de pago.

¿Recibiré dinero por someterme a este estudio?

No se ha previsto pagos por participar en este estudio.

¿A quien puedo recurrir para preguntar acerca de una duda o queja?

Para cualquier duda usted puede comunicarse con :

Dr. Ricardo Fujita A., Director CGBM, FMH- USMP 3652300-anx. 152

Dra. Maria Luisa Guevara G. ,DC, Docente investigadora 3652300-anx. 152

En caso de queja puede hacerlo con

Dr. Amador Vargas, Presidente del Comité institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres-Clinica Cada Mujer 335 0483 anx. 160

Quién vigila que la ejecución del proyecto bajo las normas éticas establecidas en el Perú.

Participación voluntaria


DR. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica Cada Mujer

Su participación en el estudio será totalmente voluntaria y si Ud. decide no participar, no se verá afectado en ningún aspecto de su atención, teniendo los mismos derechos como paciente. La única diferencia es que no se le realizará la entrevista y no se le tomará la muestra para los análisis que tienen que ver estrictamente con el estudio.

¿Es posible que mi muestra pueda ser utilizada para el análisis genético de otras enfermedades?

Su muestra será archivada en un lugar seguro dentro del laboratorio de la Facultad de Medicina de la USMP, en condiciones de total confidencialidad y solo se utilizará para estudiar enfermedades que puedan seguir contribuyendo al progreso de la ciencia. De ninguna manera será utilizada para otros fines. El laboratorio se reserva el derecho de destruir la muestra después de un tiempo estimado como máximo de 20 años. Ud. no necesariamente tiene que aceptar que su sangre sea utilizada para otros estudios que no sean específicamente el actual. Por lo cual se le pide se sirva a autorizar el uso o no de su muestra de sangre para estudios futuros.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE:

"He leído y entendido la información prestada y escrita en este documento. También afirmo que he tenido la oportunidad de hacer algunas preguntas y resolver algunas dudas. Por lo que acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación"

Nombre del paciente:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Huella digital:	<input type="checkbox"/>
Nombre y apellidos del testigo:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Lima ____ de ____ del ____	



DR. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Ciudad de Lima - Perú



ASÍ MISMO AUTORIZO A QUE SI FUERA CONVENIENTE MI SANGRE PUEDE SER UTILIZADA PARA EL ANALISIS DE OTRAS ENFERMEDADES HEREDITARIAS DIFERENTES DEL PRESENTE ESTUDIO

Nombre del paciente:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Huella digital:	<input type="checkbox"/>
Nombre y apellidos del testigo:	_____
Documento de identidad:	_____
Firma:	_____
Lima ____ de ____ del ____	



AS
DR. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Perú



Anexo 2: Instrumentos de recolección de datos

1. Hoja de especificaciones del equipo termociclador VERITI (Veriti Thermal Cycler).



SPECIFICATION SHEET

Veriti Thermal Cycler

Veriti Thermal Cycler

Easy-to-program, robust thermal cycling

Key features

- VeriFlex™ Blocks for precise temperature control and superior optimization
- Intuitive color touch-screen interface
- Easy networking and remote access options
- Veriti™ Dx option—FDA Class I Medical Device for *in vitro* diagnostic use



	Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler	Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	Veriti™ 384-Well Thermal Cycler	Veriti™ 60-Well Thermal Cycler
Block format	0.1 mL alloy	0.2 mL alloy	0.02 mL aluminum	0.5 mL aluminum
Features	Fast 0.1 mL format and sample block	Standard 0.2 mL format and sample block	Standard 0.02 mL format and sample block	0.5 mL reaction tubes for large-volume reactions
Max block ramp rate	5.0°C/sec	3.9°C/sec	3.7°C/sec	3.3°C/sec
Max sample ramp rate	4.25°C/sec	3.35°C/sec	3.1°C/sec	2.7°C/sec
Enabled to run Fast chemistry	Yes	Yes	No	No
Temperature accuracy	±0.25°C (35°C–99.9°C)			
Temperature range	0°C–100.0°C			
Temperature uniformity	<0.5°C (20 sec after reaching 95°C)			
Dimensions (H x W x D)	24.5 x 23.7 x 48.5 cm (9.6 x 9.3 x 19.1 in)			
Weight	11.4 kg (25 lb)			
PCR volume range	10–30 µL	10–80 µL	5–20 µL	25–100 µL
Instrument memory	USB and onboard memory; onboard capacity >500 protocols			
Display interface	6.5 inch VGA 32k color with touch screen			
T _m calculator	Menu-driven through touch screen			
Power	100–240 V, 50–60 Hz, max. 800 VA			
VeriFlex Blocks range	25°C (5°C zone-to-zone)	25°C (5°C zone-to-zone)	NA	NA
Cat. No.	4375305	4375786	4388444	4384638
Cat. No. for Dx option*	4452299	4452300	4452301	NA

* The Veriti Dx Thermal Cycler is classified as a US FDA Class I Medical Device. It conforms to IVDD (98/79/EC) requirements and is CE IVD-labeled in Europe. The instrument is manufactured to ISO 13485 and GMP requirements.

Find out more at thermofisher.com/veriti

ThermoFisher
SCIENTIFIC

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. COL03345 0117

2. Hoja de especificaciones del equipo analizador genético ABI 3500 (Applied Biosystems 3500 and 3500xL Genetic Analyzers).

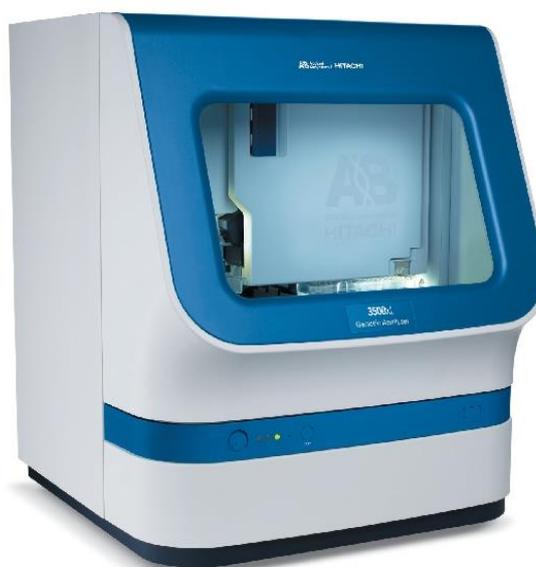


SPECIFICATION SHEET
3500 and 3500xL Series Systems for Human Identification

Applied Biosystems 3500 and 3500xL Genetic Analyzers

Key Features

- 8-capillary 3500 System and 24-capillary 3500xL System
- Advanced thermal system design improves temperature control for demanding DNA fragment analysis applications
- Single-line 505 nm, solid-state long-life laser—utilizes a standard power supply, requires no heat removal
- Significantly improved signal uniformity from instrument to instrument, run to run, and capillary to capillary
- Powerful, integrated data collection and primary analysis software provide real-time assessment of data quality
- Radio Frequency Identification (RFID) technology tracks key consumables data and records administrative information
- Advanced multiplexing capabilities for DNA fragment analysis with up to six unique dyes
- Unrivaled application flexibility—one array and one polymer are used for most applications
- Simple setup, operation, and maintenance—the easy-to-run, easy-to-own DNA sequencer



Overview

Applied Biosystems sets a new standard in capillary electrophoresis with the 8-capillary 3500 and 24-capillary 3500xL Genetic Analyzers. The 3500 Series Genetic Analyzers¹ are specifically designed to support the demanding performance needs of validated and regulated environments while retaining the unsurpassed application versatility that life science researchers expect from Applied Biosystems.

System Components

The Applied Biosystems 3500 and 3500xL Genetic Analyzers are supplied as follows:

- Capillary electrophoresis instrument
- 8-capillary (3500 system) or 24-capillary (3500xL system) array and polymer
- DNA Sequencing, Fragment Analysis and/or HID reagents

1. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

- Dell computer workstation with flat-screen monitor
- Integrated software for instrument control, data collection, quality control, and autoanalysis of sample files for basecalling and fragment sizing

System Consumables

Applied Biosystems provides the following consumables for use on the 3500 Series System:

- **Capillary Arrays:** The internally uncoated capillaries are supplied in assemblies of 8 or 24 capillaries per array, with a built-in frame for easy installation. Arrays are available in 36 cm and 50 cm capillary lengths to support multiple applications and run methodologies. The 50 cm array has been optimized for many applications for use with POP-7™ polymer and specific run modules. This simplifies user selection and provides run times

approximately equivalent to those observed with previous-generation systems using the 36 cm array. The 3500 and 3500xL capillary arrays are specified for 160 injections.

- **POP-7™, POP-6™, and POP-4™ Performance-Optimized Polymers:** The 3500 and 3500xL POP-7™, POP-6™, and POP-4™ polymers are designed in ready-to-use, load-and-run pouches. POP polymers are available in two sizes, 384 samples (a maximum of 60 injections on the 3500 system or 20 injections on the 3500xL system) and 960 samples (a maximum of 120 injections on the 3500 system or 50 injections on the 3500xL system). The pouch has adequate polymer to support the stated number of samples or injections, plus additional volume for initial setup and installation operations. Most applications may be run with POP-7™ polymer, along with the 50 cm array.

- **Buffers and Conditioning Reagent Consumables:** Similar to the 3500 system polymer pouches, the 3500 Series Genetic Analyzer Cathode Buffer, Anode Buffer, and Conditioning Reagent are designed for ready-to-use, load-and-run installation. Consumable containers are disposed of when the maximum number of samples has been processed.

- **Cathode Buffer Container (CBC):** Prefilled container with 1X Buffer to support all electrophoresis applications. The container has two separate compartments: the left side contains the cathode buffer for electrophoresis, and the right side contains spent polymer waste from the capillary wash between injections. The CBC is specified to be used on the instrument for up to 7 days after first installation (or a maximum of 120 injections on the 3500 system, or

TABLE 1. Sequencing Throughput and Performance Specifications.

Run Module	Throughput			Configuration		Performance	
	Average Run Time (Minutes)	Average Throughput, 3500xL (Samples/Day)	Average Throughput, 3500 (Samples/Day)	Array Separation Distance (cm)	Polymer Type	Median Bases Collected in 90% of Samples	KB QV20 CRL in 90% of Samples
RapidSeq50_POP7	≤40	≥840	≥280	50	POP-7™	≥600	≥500
StdSeq50_POP6	≤135	≥240	≥80	50	POP-6™	≥700	≥600
FastSeq50_POP7	≤65	≥504	≥168	50	POP-7™	≥750	≥700
StdSeq50_POP7	≤125	≥264	≥88	50	POP-7™	≥1,000	≥850
ShortReadSeqPOP7	≤30	≥1,104	≥368	50	POP-7™	≥325	≥300
MicroSeq_POP7	≤125	≥264	≥88	50	POP-7™	≥1,000	≥850
MicroSeq_POP6	≤135	≥240	≥80	50	POP-6™	≥700	≥600
RapidSeq_BDX_50_POP7	≤40	≥840	≥280	50	POP-7™	≥600	≥500
StdSeq_BDX_50_POP6	≤140	≥240	≥80	50	POP-6™	≥700	≥600
FastSeq_BDX_50_POP7	≤65	≥504	≥168	50	POP-7™	≥750	≥700
StdSeq_BDX_50_POP7	≤125	≥264	≥88	50	POP-7™	≥1,000	≥850
ShortReadSeq_BDX_POP7	≤30	≥1,104	≥368	50	POP-7™	≥325	≥300

1. The specifications are reported using long-read Sequencing Standard.

2. Throughput (Samples/Day) is determined as the total number of samples that can be run in 23 hours (allows time for sample preparation, instrument maintenance, and warm-up).

3. QV20 CRL is defined as the longest uninterrupted segment of bases with an average of QVs≥20, calculated over a sliding window of 21 base pairs.

4. The fast ShortReadSeq module collects 300 bp in 30 minutes for operations requiring short verification of sequence content, e.g., clone QC verification.

5. BDX classified run modules are optimized with the 3500 Series Systems to obtain more usable data when sequencing reactions are purified using the BigDye XTerminator® purification kit.



TABLE 2. Fragment Analysis Throughput and Performance Specifications.

Module Name	Throughput			Configuration	
	Average Run Time (Minutes)	Average Throughput, 3500xL (Samples/Day)	Average Throughput, 3500 (Samples/Day)	Array Separation Distance (cm)	Polymer Type
FragAnalysis50_POP7	40	≥840	≥280	50	POP-7™
FragAnalysis50_POP6	100	≥336	≥112	50	POP-6™
LongFragAnalysis50_POP7	125	≥264	≥88	50	POP-7™
HID36_POP4	35	≥936	≥312	36	POP-4™
SNaPshot50_POP7	30	≥1,104	≥376	50	POP-7™

1. Throughput (Samples/Day) is determined as the total number of samples that can be run in 23 hours (allows time for sample preparation, instrument
2. Resolution Range is defined as the range of bases over which the peak spacing interval divided by the peak width at half peak height is greater than 1.
3. Sizing Precision is the standard deviation of sizes for a given allele size across all capillaries in the same run.
4. Multirun Sizing specification is a measure of the precision of the 3500 System across multiple runs. For example, it would be expected that a 200 bp allele

50 injections on the 3500xL system, whichever comes first).

- Anode Buffer Container (ABC):

Prefilled container with 1X Buffer to maintain a source of ions and the correct pH for electrophoresis. The ABC is specified to be used on the instrument for up to 7 days after first installation (or a maximum of 120 injections on the 3500 system, or 50 injections on the 3500xL system, whichever comes first).

- The Cathode and Anode Buffer Containers are made from a recyclable plastic material, reducing the systems' impact on the environment. **Note:** The containers are marked with the #7 recycling symbol (Other—polycarbonate). Follow applicable laws and regulations for proper disposal.

- Conditioning Pouch: Prefilled pouch with a conditioning reagent used for priming the polymer pump, washing the pump between polymer type changes, and during instrument shutdown. The pouch has sufficient volume for a one-time use.

Radio Frequency Identification (RFID) Labeling

The 3500 Series Systems incorporate RFID labels on all capillary arrays, polymer pouches, buffer containers, and conditioning pouches. These labels allow for tracking and reporting of consumables usage, lot and part numbers, expiration dates, and on-instrument lifetime. The tracked consumables data are stored and retrievable from the 3500 Series Data Collection Software even if the consumable is removed from the instrument.

Instrument Normalization Reagent

The GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2 is specially formulated for dual-purpose use on the 3500 Series Systems. The reagent may be used as a size standard for DNA fragment sizing applications. In addition, the reagent can be used as a normalization standard by enabling the normalization feature in the Data Collection Software. The 3500 Series Systems, working together with the GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2 (and specific normalization software features), help minimize instrument-to-instrument, run-to-run, and capillary-to-capillary variation.

Reagents

Reagents Available for Use With the 3500 Series Genetic Analyzers:

- BigDye® Terminator v1.1 and 3.1 Cycle Sequencing Kits



Performance							
General		Sizing Precision of 100% of Alleles in ≥90% of Samples			Multirun Sizing of 100% of Alleles in ≥90% of Samples		
Resolution Range in ≥90% of Samples	Largest Fragment Collected in ≥90% of Samples	50–400 bp	401–600 bp	601–1,200 bp	50–400 bp	401–600 bp	601–1,200 bp
40 to 520	≥600	<0.15	<0.30	NA	<1 bp	<2 bp	NA
20 to 550	≥600	<0.15	<0.30	NA	<1 bp	<2 bp	NA
40 to 700	≥1,200	<0.15	<0.30	<0.45	<1 bp	<2 bp	<3 bp
60 to 400	≥420	<0.15	NA	NA	<1 bp	NA	N/A
40 to 120	≥120	<0.50	NA	NA	<1 bp	NA	NA

maintenance, and warm-up).

across 3 runs would have an average deviation of <1 bp in 90% of all samples.

- GeneScan™ LIZ® Size Standards
- GeneScan™ ROX™ Size Standards
- Application-specific kits

System Software

- **Primary Analysis With 3500 Series Data Collection Software**
The Applied Biosystems 3500 and 3500xL Genetic Analyzers include Data Collection Software with a simple user interface and clean design for easy display of consumable and array usage information, quick-start functionality, system maintenance reminders, and several convenient features. Basecalling and fragment sizing functionalities are performed within the primary Data Collection Software, allowing for real-time data quality evaluation. An optional upgrade provides security, audit, and eSig features to assist laboratory compliance with 21 CFR Part 11 security, audit, and eSig requirements.
- **Secondary Analysis Software Options**
 - Sequencing Analysis Software v5.4 with KB™ Basecaller v1.4.1— for sequence base call editing, re-basecalling, reporting, and printing
 - Variant Reporter® Software v1.1— for mutation detection, SNP discovery, comparative sequencing, resequencing, validation, and sequence confirmation
 - SeqScape® Software v2.7— for resequencing applications with library identification
 - GeneMapper® Software v4.1— for microsatellite, LOH, SNP, MLPA, AFLP, and t-RFLP analyses
 - GeneMapper® *ID-X* Software v1.2— for analysis of Human Identification data using AmpF/STR® kits
 - MicroSEQ® ID Analysis Software v2.2— for microbial sequence typing using MicroSEQ® Kits

3500 System Operating Specifications

Laser	Long-life, single-line 505 nm, solid-state laser excitation source
Electrophoresis Voltage	Up to 20 kV
Oven Temperature	Active temperature control from 18°C to 70°C
Minimum Computer Requirements	Hardware: Pentium® IV 1.86 GHz Processor Operating system: Windows Vista® SP1 Installed RAM: 2 GB Hard drive: 1X 80 GB 7200 RPM SATA 3.0GB/s and 8 MB data burst cache
Operating Environment	Temperature: 15°C–30°C (Room temperature should not fluctuate more than ±2°C during an instrument run) Humidity: 20–80% (noncondensing)
Main Power Voltage	100–240 V ±10% 50–60 Hz ±10%
Current	Maximum: 15 A
Maximum Power Dissipation	417 VA, 371 W (approximately, not including computer and monitor)
Dimensions	Width (closed-door): 61 cm Width (open-door): 122 cm Depth: 61 cm Height: 72 cm Weight: 82 kg (approximately)
Service and Warranty	1-year limited warranty on parts and labor Service installation Application training Post-warranty service contract is available for sale.

Sample Requirement

The 3500 Series Systems can analyze many types of templates prepared by a variety of sample preparation protocols. Samples are automatically injected directly

from 96- or 384-well* microtiter plates. The 3500 Series Systems are also designed for use with 96-well Fast and 8-tube standard or Fast strips.

* The 3500xL Genetic Analyzer is compatible with 384-well plates.

www.appliedbiosystems.com/3500hid

For Research Use Only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

For those who require IVD-marked devices, the 3500 Dx and 3500xL Dx Genetic Analyzers and system accessories meet the requirements of the In Vitro Diagnostics Medical Devices Directive (98/79/EC). The 3500 Dx and 3500xL Dx systems are for distribution and use in specific European countries only. For more information about the 3500 Dx Series Systems, contact your Applied Biosystems representative. The purchase price of this Instrument includes a grant of a limited, non-transferable license under U.S. patents and method claims of its foreign counterparts, and under U.S. patents and element claims of its foreign counterparts, to use this particular instrument for electrophoresis methods employing fluorescence as a means of detection. No other licenses or rights are hereby conveyed either expressly, by implication, or estoppel including, but not limited to, any claims to a composition. This instrument incorporates technology subject to one or more patents licensed from Hitachi, Ltd. as well as patents and patented technology owned by or under control of Applied Biosystems. This instrument is authorized for use in DNA sequencing and fragments analysis only. This Authorization is included in the purchase price of the instrument and corresponds to the up-front fee component of a license under process claims of U.S. patents and under all process claims for DNA sequence and fragment analysis of U.S. patents now or hereafter owned or licensable by Applied Biosystems for which an Authorization is required, and under corresponding process claims in foreign counterparts of the foregoing for which an Authorization is required. The running royalty component of licenses may be purchased from Applied Biosystems or obtained by using Authorized reagents purchased from Authorized suppliers in accordance with the label rights accompanying such reagents. Purchase of this instrument does not itself convey to the purchaser a complete license or right to perform the above processes. This instrument is also licensed under U.S. patents and apparatus and system claims in foreign counterparts thereof. No rights are granted expressly, by implication, or by estoppel under composition claims or under other process or system claims owned licensable by Applied Biosystems. For more information regarding licenses, please contact the Director of Outlicensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

©2010 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

Printed in the USA, 08/2010 Publication 112SP01-01 B-091137 0210



Headquarters
850 Lincoln Centre Drive | Foster City, CA 94404 USA
Phone 650.638.5800 | Toll Free 800.345.5224
www.appliedbiosystems.com

International Sales
For our office locations please call the division headquarters or refer to our Web site at www.appliedbiosystems.com/about/offices.cfm

3. Hoja de especificaciones del equipo ION TORRENT (The Ion PGM System High-quality, accessible sequencing).

iontorrent

SPECIFICATION SHEET

Ion PGM System

The Ion PGM System

High-quality, accessible sequencing

The Ion PGM™ System makes affordable, high-quality next-generation sequencing accessible to human disease researchers and microbiologists around the world. The Ion PGM System is a reliable sequencing platform that combines simple sample preparation and data analysis solutions with flexible chip output for ultimate project flexibility.



Ion PGM System performance specifications

		Ion 314™ Chip v2 or Ion 314 Chip v2 BC	Ion 316™ Chip v2 or Ion 316 Chip v2 BC	Ion 318™ Chip v2 or Ion 318 Chip v2 BC
Output*	200 base 400 base†	30–50 Mb 60–100 Mb	300–600 Mb 600 Mb–1Gb	600 Mb–1Gb 1.2–2 Gb
Reads		400–550 thousand	2–3 million	4–5.5 million
Run time	200 base 400 base	2.3 hr 3.7 hr	3.0 hr 4.9 hr	4.4 hr 7.3 hr
Research areas		Cancer research, inherited disease research, microbial genomics, stem cell research, agriculture, epigenomics, metagenomics, forensic science, and ancient DNA genomics		
Key applications		Targeted DNA sequencing, copy number analysis, targeted RNA sequencing, small RNA sequencing, <i>de novo</i> microbial sequencing, bacterial typing research, viral typing research, ChIP sequencing, methylation analysis, SNP verification, and genotyping by sequencing		
Target selection solutions		Ion AmpliSeq™ technology, Ion TargetSeq™ kits (3 custom enrichment kits and 1 multi-blocker kit)		
Library solutions		Ion AmpliSeq™ Library Kits, Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit, Ion Total RNA-Seq Kit v2, Ion Library Equalizer™ Kit, and 384 barcodes supported by Torrent Suite™ Software		
Data analysis solutions		<p>Torrent Suite Software processes signals, calls bases, aligns sequences, and performs basic variant calling as the primary analysis software for the Ion PGM™ Sequencer.</p> <p>Optimized data analysis workflows have been developed for targeted DNA sequencing, targeted RNA sequencing, microbial <i>de novo</i> sequencing, microbial typing research, and other research applications using third-party software solutions and freely downloadable plug-ins.</p> <p>Ion Reporter™ Software performs controlled analysis, annotation, and reporting of variants along with application-specific workflows to support single, trio, and paired tumor–normal analysis.</p>		

ThermoFisher
SCIENTIFIC

iontorrent

Ion PGM Sequencer specifications

Working environment (for indoor use only)	Temperature: 68–77°F (20–25°C)	Clearances:	
	Humidity: 40–60%, noncondensing	12 in. (30.5 cm) in rear	4 in. (10 cm) on left side
	Altitude: <6,500 ft (2,000 m)	4 in. (10 cm) on right side	4 in. (10 cm) from front edge of bench to sequencer bezel
		36 in. (90 cm) aisle in front of bench for operator access	8 in. (20 cm) from front edge of bench to the conical tubes
Gas supply	Connection: 0.25 in. push-to-connect fitting	Pressure: 35–45 psi	Composition: nitrogen (grade 4.5, 99.995% or better)
Other connections	Ethernet: 1 GigE	USB: 2x USB 2.0	
Power	Voltage: 100 V (min) to 240 V (max) Current: 9 A (max)	Frequency: 50/60 Hz	Power draw: 200–300 W
Dimensions	24 x 20 x 21 in./61 x 51 x 53 cm (W x D x H)		
Weight	Crated for shipment: 85 lb/39 kg	Free-standing: 65 lb/30kg	

Ion PGM Torrent Server specifications

Product configuration	A single free-standing tower computer appliance, included with the purchase of the Ion PGM System. Includes Torrent Suite Software with all necessary software components to deliver signal processing, base calling, read alignment, and variant calling.		
Processor	Dual 8-core 2.6 GHz CPUs		
Memory	64 GB RAM		
Storage (approx.)	18 TB		
Operating System	Ubuntu™		
Dimensions (approx.)	9 x 28 x 43 in./22 x 71 x 17 cm (W x D x H)		
Weight (approx.)	121 lb/55 kg		
Power	Voltage: 100 V (min) to 240 V (max) Current: 12 A (max)	Frequency: 50/60 Hz	Power draw: 1,100 W
Data formats	Industry-standard FASTQ, SFF, BAM, and VCF format outputs		

Ordering information

Product	Cat. No.
Ion PGM System (includes Ion PGM Sequencer and Ion PGM Torrent Server)	4462921
Ion Chef System	4484177
Ion OneTouch 2 System	4474779

Find out more at thermofisher.com/pgm

* Expected output with >99% aligned/measured accuracy. Output is dependent on read length and application.

† 400 base pair chemistry is not compatible with the Ion Chef™ Instrument at this time.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. Ubuntu is a trademark of Canonical Limited.

CO126656 1015

ThermoFisher
SCIENTIFIC