

## DETECCION DE ALTERACIONES NUMERICAS EN EL GEN *DYS* Y SU ASOCIACION CON RASGOS CLINICOS

ALEJANDRA MAMPEL<sup>1</sup>, MARIA INES ECHEVERRIA<sup>1</sup>, ANA LIA VARGAS<sup>1</sup>, MARIA ROQUE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza,

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo- IHEM-CCT-CONICET, Mendoza

**Resumen** La distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/B) es una miopatía hereditaria grave y progresiva. Se relaciona con alteraciones en el gen *DYS*, ubicado en el cromosoma X, que codifica para la proteína distrofina. Distintas manifestaciones pueden observarse según el impacto de la alteración genética sobre la proteína. Los registros internacionales de mutaciones refieren una elevada frecuencia (65-70%) de deleciones/duplicaciones de uno o más exones del gen *DYS*. En este trabajo presentamos el estudio de alteraciones numéricas en los 79 exones del gen *DYS*. El estudio fue realizado en 59 individuos pertenecientes a 31 familias no relacionadas. La metodología utilizada fue *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MLPA). En los 31 casos independientes se estableció además el *score* clínico, se realizó el test de Raven y se determinaron los valores de creatininfosfoquinasa (CPK) en sangre. Nuestros datos revelan una frecuencia de alteraciones numéricas en el gen *DYS* del 61.3%, provocando un corrimiento del marco de lectura en el 100% de los casos. Se observó una región con mayor tendencia a presentar alteraciones que involucran un solo exón. La tasa de mutación de *novo* identificada fue del 35.2%. Se halló, a su vez, una asociación significativa entre afectados con alteraciones numéricas y valores del test de Raven de bajo rendimiento. Estos resultados aportan datos a los conocimientos regionales sobre las alteraciones genéticas y su impacto fenotípico en la enfermedad de Duchenne/Becker.

**Palabras clave:** deleción, duplicación, MLPA, distrofia muscular de Duchenne/Becker

**Abstract** *Numeric alterations in the dys gene and their association with clinical features.* The Duchenne/Becker muscular dystrophy is a hereditary miopathy with a recessive sex-linked pattern. The related gene is called *DYS* and the coded protein plays a crucial role in the anchorage between the cytoskeleton and the cellular membrane in muscle cells. Different clinical manifestations are observed depending on the impact of the genetic alteration on the protein. The global register of mutations reveals an enhanced frequency for deletions/duplications of one or more exons affecting the *DYS* gene. In the present work, numeric alterations have been studied in the 79 exons of the *DYS* gene. The study has been performed on 59 individuals, including 31 independent cases and 28 cases with a familial link. The applied methodology was *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MLPA). In the 31 independent cases clinical data were established: i.e. the clinical score, the Raven test percentiles, and the creatininfosphokinase (CPK) blood values. Our results reveal a 61.3% frequency of numeric alterations affecting the *DYS* gene in our population, provoking all of them a reading frame shift. The rate for *de novo* mutations was identified as 35.2%. Alterations involving a specific region of one exon were observed with high frequency, affecting a specific region. A significant association was found between numeric alterations and a low percentile for the Raven test. These data contribute to the local knowledge of genetic alterations and their phenotypic impact for the Duchenne/Becker disease.

**Key words:** deletion, duplication, MLPA, muscular dystrophy of Duchenne/Becker

La distrofia muscular de Duchenne/Becker es una miopatía hereditaria grave y progresiva<sup>1</sup>. Está ligada al sexo y se relaciona con mutaciones en el gen *DYS*. Este

gen está ubicado en el cromosoma Xp21 y es el más extenso conocido hasta la fecha en el genoma humano, abarcando 2.4Mb y 79 exones<sup>2</sup>.

La estimación de su tasa mutacional ha sido de interés tanto para el campo de la investigación como para el cálculo de riesgo en el asesoramiento genético familiar. Se sabe que el gen *DYS* sufre, con alta frecuencia, cambios numéricos que afectan uno o más de sus 79 exones. Estas deleciones y duplicaciones representan entre el 60 a 70% de todos los casos de Duchenne/Becker (DMD/BMD)<sup>3,4</sup>.

Recibido: 3-VIII-2010

Aceptado: 29-XI-2010

**Dirección postal:** Dra. María Roqué, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM-CONICET, CCT-Mendoza, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Parque General San Martín S/N, 5500 Mendoza, Argentina  
Fax: (54-261) 449-4117

e-mail: mroque@fcm.uncu.edu.ar

La distrofia muscular de Duchenne/Becker es una miopatía hereditaria grave y progresiva<sup>1</sup>. Está ligada al sexo y se relaciona con mutaciones en el gen *DYS*. Este gen está ubicado en el cromosoma Xp21 y es el más extenso conocido hasta la fecha en el genoma humano, abarcando 2.4Mb y 79 exones<sup>2</sup>.

La estimación de su tasa mutacional ha sido de interés tanto para el campo de la investigación como para el cálculo de riesgo en el asesoramiento genético familiar. Se sabe que el gen *DYS* sufre, con alta frecuencia, cambios numéricos que afectan uno o más de sus 79 exones. Estas deleciones y duplicaciones representan entre el 60 a 70% de todos los casos de Duchenne/Becker (DMD/BMD)<sup>3,4</sup>. Se ha establecido que, si bien la tasa mutacional general es similar en mujeres y varones, las deleciones/duplicaciones ocurren mayormente (aproximadamente 3 veces más) durante la ovogénesis mientras que las mutaciones puntuales ocurren con el doble de frecuencia durante la espermatogénesis<sup>5</sup>. Una posible explicación para esta tasa diferencial es que en varones las divisiones celulares son constantes y por lo tanto existe una exposición mayor a errores asociados a la replicación del ADN. En cambio en las mujeres, la ovogénesis se detiene durante la vida intrauterina y finaliza durante la fecundación. Alteraciones que ocurren durante la meiosis –como deleciones/duplicaciones- se observan más frecuentemente asociadas a la ovogénesis<sup>6</sup>. Algunos autores diferencian el origen de las duplicaciones, infiriendo que ocurren en la espermatogénesis, al no detectarlas como mutaciones de novo<sup>7</sup>.

La proteína *DYS*, llamada distrofina, está involucrada en la unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto<sup>8</sup>. La alteración de esta proteína altera su unión mecánica con el complejo glico-proteico de la membrana, produciendo una degeneración del músculo como consecuencia de una disminución en la estabilidad de la membrana plasmática y una disrupción del sarcolema<sup>9</sup>.

Según la manera en que esté afectado el gen -y por lo tanto su proteína-, la manifestación fenotípica es más grave en la forma clínica tipo Duchenne (DMD) y menos grave en la forma clínica tipo Becker (BMD). Con el fenotipo DMD se relacionan mutaciones que producen la ausencia completa de la proteína (por delección de la región codificante o por alteraciones genéticas o epigenéticas en su promotor) como también mutaciones que producen una versión trunca de la misma (por codones de terminación prematuros provocados por una mutación *non-sense* o por deleciones/duplicaciones pequeñas que generen un corrimiento del marco de lectura). Esta forma grave tiene una incidencia de 1 en 3500 varones nacidos vivos. En cambio, el fenotipo menos grave BMD se relaciona con alteraciones que afectan la parte central del gen, produciendo una proteína más corta pero que conserva su terminal amino-carboxilo. Esta forma tiene una manifestación más tardía, una progresión clínica más lenta y una incidencia de 1:18 000 nacidos vivos<sup>10</sup>.

La alta frecuencia de deleciones/duplicaciones que sufre el gen *DYS* ha llevado, en primer lugar, a desarrollar y aplicar metodologías que permitan detectar estas alteraciones numéricas tanto en afectados como en portadoras. Es sabido que técnicas citogenéticas clásicas no tienen alcance para detectar este tipo de errores y que la mayoría de las estrategias moleculares basadas en PCR no son cuantitativas y, por lo tanto, no permiten detectar deleciones en portadoras ni tampoco duplicaciones en portadores o afectados. En segundo lugar, la detección de deleciones/duplicaciones ha permitido un análisis genotipo-fenotipo interesante debido a sus posibles efectos sobre el marco de lectura del gen. Los corrimientos en el marco de lectura se asocian con la forma más grave (DMD). En cambio, en caso de conservarse el marco, la clínica se asocia con la forma más leve (BMD)<sup>11</sup>. Este aspecto aumenta enormemente la utilidad para estimar la evolución clínica de los afectados. Y por último, dada la amplia variedad de tamaño de las deleciones/duplicaciones, algunos rasgos clínico-patológicos como el *score* clínico, el test de inteligencia de matrices progresivas de Raven (test no verbal que utiliza habilidades perceptuales, de observación y razonamiento analógico y no requiere conocimientos previos) y los valores de creatininfosfoquinasa sérica (CPK) en sangre podrían asociarse con el tipo de alteración numérica. Si bien son pocos, algunos estudios analizan esta posible asociación<sup>12</sup>.

Nuestro grupo trabajó en la puesta a punto de la metodología *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MLPA) para la detección de deleciones/duplicaciones en el gen *DYS* en nuestra región<sup>13</sup>. Esta metodología se basa en la hibridación simultánea de pares de sondas específicos para cada exón a analizar. La posterior amplificación por PCR mediante un único par de *primers* que junto con la polimerasa son utilizados en condiciones limitantes, le confiere al resultado un carácter semi-cuantitativo, comparado con un ensayo en una muestra sana. La gran ventaja del método es permitir el estudio de deleciones/duplicaciones tanto en mujeres portadoras como en afectados, y a su vez permite investigar en forma simultánea los 79 exones del gen completo.

El objetivo fue establecer la frecuencia de alteraciones numéricas y de mutación *de novo* del gen *DYS* en nuestra región y analizar su asociación con rasgos clínico-patológicos.

## Materiales y métodos

El proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo. Se incluyeron 59 individuos en total, 32 mujeres (rango de edad 25 a 65 años, valor promedio 41 años) y 27 varones (rango de edad 10 meses a 20 años, valor promedio 8.8 años), 31 de los cuales (afectados y portadoras) eran pertenecientes

a familias no relacionadas y 28 tenían un vínculo familiar con alguno de los probandos (Tabla 1).

A partir de 3 ml de sangre periférica se obtuvo ADN mediante la incubación con una solución CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (2% CTAB, 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris buffer), purificación con cloroformo: isoamílico (24:1) y posterior precipitación con etanol puro. Todas las muestras de ADN fueron almacenadas a -20C.

El análisis de MLPA fue realizado en 52/59 de los pacientes incluidos en este estudio. Brevemente, la metodología se basa en la incubación durante 18 h de 250 ng de ADN con un *mix* de pares de sondas que hibridan en los 79 exones del gen. Cada par hibridado es posteriormente ligado entre sí y amplificado con un set de *primers* marcados con 6-FAM (6-carboxifluoresceína)<sup>14</sup>. Los productos amplificados son finalmente resueltos mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI3130 y analizados mediante el *software* GeneMarkerv1.75.

En 27/59 pacientes (24 afectados y 3 portadoras) se estableció el *score* clínico basado en la escala del consejo de investigación médica publicada por Florence et al en 1992 para establecer grados para distrofia muscular de Duchenne asociado a otros parámetros como creatininfosfoquinasa (CPK) y dificultad en la locomoción<sup>15</sup>. Se consideraron 5 niveles según la gravedad clínica. Valor 0 para los asintomáticos con valores de creatininfosfoquinasa (CPK) elevada y/o pseudohipertrofia de músculos gastrocnemios. Valor 1 para fenotipo leve (debilidad muscular con independencia en la marcha, creatininfosfoquinasa (CPK) aumentada y pseudohipertrofia de músculos gastrocnemios). Valor 2 para fenotipo moderado (debilidad que afecta 2 o más grupos musculares, inestabilidad en la marcha, creatininfosfoquinasa (CPK) elevada, pseudohipertrofia de músculos gastrocnemios). Valor 3: fenotipo grave con marcha independiente que requiere uso intermitente de silla de ruedas. Valor 4: pérdida de la marcha independiente y Valor 5: fenotipo caracterizado por inmovilidad total, contracturas y deformaciones articulares.

En 48/59 pacientes (23 afectados y 25 portadoras) se estableció el percentil para el test de Raven<sup>16</sup>, el cual mide inteligencia, capacidad intelectual y habilidad mental general por medio de comparación de formas y razonamiento por analogías. Fue elegido por ser no verbal, no manual y no cultural, se puede aplicar a distintas edades (test modificado para menores de 12 años) independientemente de incapacidades motrices y diferencias culturales. Los resultados son obtenidos de la relación del número de respuestas correctas e incorrectas para los distintos rangos etarios, obteniéndose los correspondientes percentilos (Pc 1 al Pc 99).

En 57/59 pacientes (25 afectados y 22 portadoras) se determinaron los niveles de creatininfosfoquinasa (CPK). Esta

isoenzima puede indicar rabdomiólisis cuando se eleva por encima de sus valores habituales (rango normal para este estudio 99-120 U/l).

Los análisis de frecuencias y asociación fueron realizados mediante el *software* SPSSv17.0. Para el cálculo de *Odds Ratio* (OR) se utilizó una herramienta basada en *Excel*. Esta herramienta permite estimar el intervalo de confianza para la relación entre el número de eventos en el grupo control (sin alteración numérica) respecto del total de individuos de ese grupo y el número de eventos en el grupo experimental (con alteración) respecto del total de individuos de ese grupo.

## Resultados

De los 59 pacientes participantes del estudio, 32 eran mujeres y 27 varones. Treinta y uno de los probandos (25 afectados y 6 portadoras) eran casos independientes y 28 fueron incluidos por tener un vínculo familiar con algún afectado, sobre todo madres de varones afectados (Tabla 1).

El análisis de MLPA se realizó sobre 52 de los 59 pacientes. No se efectuaron 7 estudios por ser madres cuyos hijos presentaban un resultado de MLPA negativo (sin detección de deleciones/duplicaciones). Para establecer la incidencia de deleciones/duplicaciones se tomaron en cuenta los resultados de MLPA obtenidos a partir de los 31 casos independientes.

Se detectaron deleciones/duplicaciones en 19 de los 31 casos independientes (61.3%; IC 95%: 43.6-76.2%) (Tabla 2). El 84.2% (16/19) fueron deleciones y 15.8% duplicaciones. Agrupando el tipo de deleciones según el número de exones que involucran, se observó que la mayoría afecta entre 1 y 10 exones consecutivos (Fig. 1).

La distribución de las alteraciones numéricas detectadas afecta la región génica desde el exón 1 al exón 61 inclusive (Fig. 2).

En numerosos casos, el análisis por MLPA permitió realizar un aporte diagnóstico nuevo al paciente (Tabla 3). En 6 casos no se contaba con ningún estudio previo y el resultado por MLPA fue el primer diagnóstico. En uno afectado (DMD 28) se identificó por MLPA el error genético que no había podido ser detectado por estudios previos basados en PCR. En 3 casos (DMD 6, DMD 8 y DMD 21) se detectaron los márgenes exactos de las deleciones. A su vez, los resultados obtenidos por MLPA para las 3 duplicaciones (DMD 9, DMD 14 y DMD 27) y la deleción en portadora independiente (DMD7) no hubieran sido detectables por PCR multiplex.

Entre los 28 pacientes con vínculo familiar se hallaron alteraciones por MLPA en 17 de ellos. Al analizar las madres respectivas de cada paciente, en 11 de ellas se detectó la misma alteración numérica que la hallada en sus hijos. En las restantes 6 no se detectó alteración por MLPA. De estos resultados se infiere una frecuencia de mutación *de novo* de 35.2% (IC 95%: 41.3-82.6), similar a la reportada en la literatura<sup>7, 10, 12</sup>.

TABLA 1.- Composición de la muestra de individuos incluidos en el estudio.

Casos incluidos	59		
		Varones	27
		Mujeres	32
Probandos independientes	31		
		Varones	25
		Mujeres	6
Con vínculo familiar	28		
		Varones	0
		Mujeres	28

Una observación llamativa es que el 36.8% (7/19) de las alteraciones numéricas detectadas involucran un solo exón, incidencia superior a la encontrada en la literatura<sup>12</sup> y en las bases de datos mundiales<sup>18</sup>.

Nuestros resultados muestran que los exones únicos delecionados fueron el exón 44, 45, 50, y 52 (Fig. 2) y duplicado el exón 43. En todos estos casos, los ensayos por MLPA fueron repetidos y confirmados. Cinco de los 6 pacientes afectados por deleción de un exón único contaban con estudio previo por PCR y en todos estos casos se confirmó lo detectado por MLPA. La literatura consultada revela trabajos que reportan estas regiones como sitios de quiebra frecuente<sup>19-21</sup>.

Para analizar la posible asociación entre las alteraciones numéricas halladas y rasgos clínico-patológicos se utilizó el software SPSSv17.0. Se agruparon los resultados de MLPA en dos categorías: sin deleción/duplicación

(negativo) y con deleción/duplicación (positivo). Por otro lado, se establecieron valores *cut-off* para categorizar las variables clínicas. Se fijaron los siguientes límites: 1-creatinifosfoquinasa (CPK) baja: valor menor a 120 UI/l; 2- test de Raven bajo: valor menor al percentilo 25; 3- score clínico bajo: valor menor o igual a 2. Se realizaron análisis de asociación entre resultados de MLPA negativo/positivo y cada una de las variables clínicas baja/alta. Se calculó el coeficiente de contingencia para cada asociación considerando significancia para un  $p < 0.05$ .

Para el test de Raven se detectó una asociación significativa ( $p < 0.011$ ) entre pacientes con valor menor o igual al percentilo 25 (de bajo rendimiento) y la presencia de deleciones/duplicaciones. El *Odds Ratio* fue de 16.8 (IC: 1.6-176; 95%), mostrando un riesgo aumentado para un rendimiento intelectual bajo en pacientes DMD con alteraciones numéricas.

Para los valores de creatinifosfoquinasa (CPK) no se halló asociación significativa con la presencia de deleciones/duplicaciones. La mayoría de los pacientes incluidos presentaron creatinifosfoquinasa (CPK) alta (valor anormal), independientemente del tipo de alteración hallada. Para el *score* clínico tampoco se encontró asociación significativa con la presencia de deleciones/duplicaciones, observándose *score* tanto bajo (fenotipo más leve) como alto (fenotipo más grave) independientemente de la alteración genética (Tabla 4).

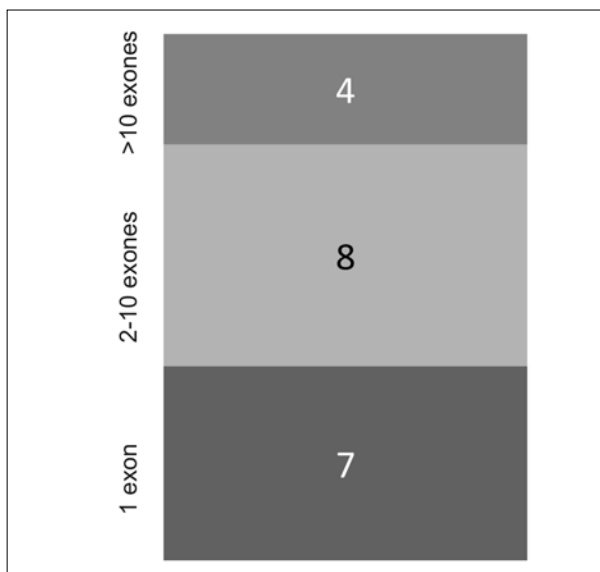


Fig. 1.- Tipo de alteraciones numéricas según el número de exones involucrados. Las alteraciones numéricas detectadas por MLPA fueron agrupadas según el número de exones involucrados en 1 exón, de 2 a 10 exones, y más de 10 exones. Entre todas las alteraciones numéricas detectadas, la frecuencia de alteraciones que afectan un solo exón es del 36.8% (7/19).

### Discusión

Las alteraciones numéricas en el gen *DYS* han sido descritas en la literatura y existen en nuestro país estudios previos sobre el impacto clínico de alteraciones en *DYS*.<sup>22</sup> Se originan usualmente cuando hay un mal alineamiento entre cromosomas homólogos durante un evento de recombinación. La frecuencia con que ocurren estos sucesos ha sido analizada por distintos autores. Nuestros resultados muestran que la tasa de mutación *de novo* es similar a la publicada por varios autores<sup>7, 10, 12</sup>. Esto estaría indicando que no existen efectos ambientales ni alimenticios que las influyan y que sus causas se

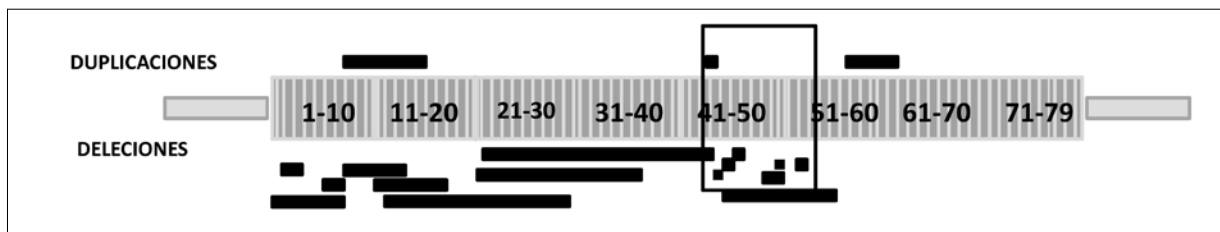


Fig. 2.- Distribución de las alteraciones numéricas halladas. El esquema representa la distribución a lo largo de los 79 exones del gen *DYS* de las deleciones (barras inferiores) y las duplicaciones (barras superiores) detectadas. Como se puede observar, las alteraciones afectan la región génica desde el exón 1 al exón 61 inclusive. Remarcado se señala la región que abarcan los exones 44 a 52, en la cual se registraron todas las alteraciones que involucraron un exón único.

TABLA 2.- Resultados de MLPA sobre 31 probandos independientes.

Resultados MLPA	Número de pacientes	Porcentaje	IC (95%)
Sin deleción/duplicación	12	38.6	23.7-56.1
Con deleción/duplicación	19	61.3	43.6-76.2
Clasificación de del/dupl detectadas	Número de pacientes	Porcentaje	IC (95%)
Deleción de 1 exón	6	19.3	9.1-36.2
Deleción de 2 a 10 exones	6	19.3	9.1-36.2
Deleción mayor a 10 exones	4	12.9	5.1-28.8
Duplicación de 1 exón	1	3.2	0.7-19.5
Duplicación de 2 a 10 exones	2	6.4	0.5-16.2
Duplicación mayor a 10 exones	0	0	-

TABLA 3.- Fenotipos de los 31 probandos independientes y los resultados correspondientes por MLPA y PCR multiplex.

Paciente	Sexo	Fenotipo	MLPA	PCR multiplex	Aporte diagnóstico
DMD1	M	DMD	no del/dup	No realizada	-
DMD2	M	DMD	Del 52	Del 52	-
DMD3	F	Pseudohipertrofia	no del/dup	No aplicable	-
DMD4	F	Pseudohipertrofia	no del/dup	No aplicable	-
DMD5	M	BMD	no del/dup	Negativa	-
DMD6	M	DMD	Del 48-50	Del 48	Sí
DMD7	F	Pseudohipertrofia	Del 8-13	No aplicable	Sí
DMD8	M	DMD	Del 10-17	Del exon 12 y 17	Sí
DMD9	F	Pseudohipertrofia	Dupl 56-61	No aplicable	Sí
DMD10	M	DMD	no del/dup	Negativa	-
DMD11	F	Pseudohipertrofia	no del/dup	No aplicable	-
DMD12	M	DMD	no del/dup	-	-
DMD13	M	DMD	Del 44	Del 44	-
DMD14	M	DMD	Dupl 8-16	No realizada	Sí
DMD15	M	DMD	Del 2-3	No realizada	Sí
DMD16	M	DMD	Del 21-43	No realizada	Sí
DMD17	M	DMD	Del 20 al 36	No realizada	Sí
DMD18	M	DMD	Del 45	Del 45	-
DMD19	M	DMD	no del/dup	Negativa	-
DMD20	M	BMD	no del/dup	Negativa	-
DMD21	M	DMD + S. de Down	Del 12-29	Del 13, 17 y 19	Sí
DMD22	M	BMD	no del/dup	Negativa	-
DMD23	M	DMD	Del 50	No realizada	Sí
DMD24	M	Pseudohipertrofia + Agamaglobulinemia	Del 50	Del 50	-
DMD25	M	DMD	Del 1-7	No realizada	Sí
DMD26	F	asintomático	no del/dup	No aplicable	-
DMD27	M	BMD	Dupl exón 43	No realizada	Sí
DMD28	M	DMD	Del 6 y 7	Negativa	Sí
DMD29	M	DMD	no del/dup	-	-
DMD30	M	DMD	Del 44 al 55	No realizada	Sí
DMD31	M	DMD	Del 45	Del 45	-

TABLA 4.- Análisis de asociación entre rasgos clínico-patológicos y la presencia de alteraciones numéricas detectadas por MLPA.

	N	Bajo	Alto	Coef. de contingencia para MLPA neg/pos	Significancia (p<0.05)	OR
CPK	31	5	26	0.188	0.35 NS	2.8 (CI 95%: 0.39-20)
Score clínico	25	15	10	0.102	0.691 NS	0.6 (CI 95% 0.1-3.5)
Test de Raven	26	19	7	0.471	0.011 S	16.8 (CI 95% 1.6-176)

restringen a eventos moleculares intrínsecos al proceso de recombinación cromosómica.

La metodología utilizada (MLPA) es una herramienta diagnóstica de gran utilidad. Su eficiencia y sensibilidad son altas y su costo accesible. Para países como Argentina es importante resaltar que en un laboratorio de biología molecular con equipamiento estándar y un equipo de electroforesis capilar y personal entrenado en técnicas moleculares es posible poner en marcha esta metodología.

Las deleciones/duplicaciones detectadas por MLPA permiten establecer el tamaño exacto de la alteración y, de esa manera, inferir si el marco de lectura del gen está modificado o no. La base de datos de la Universidad de Leiden<sup>18</sup> tiene una herramienta para predecir el corrimiento del marco en base al tipo de alteración numérica hallada. Esto tiene implicancias clínicas, debido a que en base a la "hipótesis del corrimiento del marco de lectura", se puede predecir el fenotipo DMD o el BMD<sup>23</sup>. Esta predicción es de gran utilidad para el asesoramiento genético de la familia y el manejo clínico de la enfermedad. Nuevas terapias están en marcha basadas en la restauración del marco de lectura perdido mediante el salteado artificial de algún/os exón/es (*exon skipping*)<sup>24</sup>. Contar con el diagnóstico por MLPA permitiría la aplicación de esta terapia en los casos que pierden el marco de lectura.

Nuestros análisis de asociación revelan que los portadores de deleciones/duplicaciones presentan un riesgo aumentado para un menor rendimiento intelectual con respecto a otros afectados de DMD sin alteraciones numéricas. Algunos autores han informado sobre un IC por debajo de la media en pacientes con DMD, sin hallar asociación con el tipo de alteración genética<sup>25</sup>. Otros autores han sugerido que tanto deleciones como mutaciones puntuales en la parte distal del gen *DYS* se asocian con una disminución de la capacidad intelectual<sup>26-29</sup>. Si bien nuestro trabajo ha sido realizado sobre un número limitado de afectados, consideramos de interés profundizar con más estudios la asociación hallada, con el objetivo de ahondar los conocimientos sobre la relación genotipo-fenotipo de esta enfermedad. Pocas enfermedades humanas permiten en la actualidad establecer una clara relación genotipo-fenotipo. De hallarse estas asocia-

ciones, su utilidad fundamental radica en poder aplicar estrategias preventivas. La intervención profiláctica y el acompañamiento médico-psicopedagógico-social promueven mejorar la calidad de vida de los afectados.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Bibliografía

- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010; 9: 77-93.
- Biggar WD. Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Rev* 2006; 27: 83-8.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the *DYS* gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50: 509-17.
- Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Dauwerse JG, et al. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD-gene by homologous YAC recombination. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 19-28.
- Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Muller CR, Muller B. On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet* 1994; 31: 183-6.
- Crow JF. The high spontaneous mutation rate: Is it a health risk? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8380-6.
- Kawamura J, Kato S, Ishihara T, Hiraishi Y, Kawashiro T. Difference of new mutation rates in dystrophin gene between deletion and duplication mutation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku* 1997; 37: 212-7.
- Yoshida M, Ozawa E. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem* 1990; 108: 748-52.
- Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-28.
- Bushby KM, Thamyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1991; 337: 1022-4.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2: 90-5.
- Fai-man Lo I, Keung-san Lai K, Ming-for Tong T, Tak-sum Lam S. A different spectrum of DMD gene mutations in

- local Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Chin Med J* 2006; 119: 1079-87.
13. Marzese DM, Mampel A, Gomez LC, et al. Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families. *Genet Mol Res* 2008; 7: 223-33.
  14. 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: e57.
  15. Florence J, Pandya S, King W, et al. Intrarater of Manual Muscle Test (Medical Research Council Scale). Grades in Duchenne's Muscular Dystrophy. *Physical Therapy* 1992; 72: 115-25.
  16. Raven JC. En: Test de Matrices Progresivas. Para la medida de la capacidad intelectual. Escala Especial. Manual, 4<sup>o</sup> Edición. BsAs: Editorial Paidós, 1966, p 27-43.
  17. Crow J. The high spontaneous mutation rate: Is it a health risk? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8380-6.
  18. den Dunnen J. En: [http://www.dmd.nl/DMD\\_deldup.html](http://www.dmd.nl/DMD_deldup.html). Leiden Muscular Dystrophy pages, Duchenne Muscular Dystrophy (whole exon changes) (DMD\_d); consultado el 26/8/2010.
  19. Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989; 39: 465-74.
  20. Nobile C, Marchi J, Nigro V, Roberts RG, Danieli GA. Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics* 1997; 45: 421-4.
  21. Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, et al. Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet* 2002; 110: 418-21.
  22. Andrada LE, De Vito EL. Clinical and spirometric alterations in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 463-71.
  23. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrichs K, Betecken T. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506.
  24. Aartsma-Rus A. Antisense-mediated modulation of splicing: Therapeutic implications for Duchenne muscular dystrophy. *RNA Biol* 2010; 7: 453-61.
  25. Worden DK, Vignos PJ Jr. Intellectual function in childhood progressive muscular dystrophy. *Pediatrics* 1962; 29: 968-77.
  26. Hodgson SV, Abbs S, Clark S, et al. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy, with special reference to mental ability. *Neuromuscul Disord* 1992; 2: 269-76.
  27. Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 2. Correlations within individual patients. *J Med Genet* 1993; 30: 737-44.
  28. Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32: 277-307.
  29. Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1877-81.

-----

*Los libros congregados e interrogados por un hombre constituyen también un aspecto de su obra y el mapa y espejo de su personalidad.*

Jorge Luis Borges (1899-1986)

Discurso de la recepción de la donación de José Ingenieros, pronunciado el 8 de septiembre de 1956 en la Biblioteca Nacional.