

# ANÁLISIS DE UNA COHORTE ARGENTINA AFECTADA CON DISTROFIA MUSCULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO

**Palabras clave:** Distrofia muscular, Distrofinopatías, Secuenciación de Exoma Completo, Duchenne.  
**Key words:** Muscular dystrophy, Dystrophinopathies, Whole Exome Sequencing, Duchenne.

Las distrofias musculares son patologías hereditarias que ocasionan debilidad y degeneración progresiva del músculo esquelético. Dentro de ellas se destaca un subgrupo por su alta frecuencia, las Distrofinopatías, causadas por alteraciones en el gen *DMD*. Dado que los síntomas clínicos de estas patologías se superponen, dificultando el diagnóstico diferencial, es de suma importancia realizar estudios moleculares para poder diferenciar el tipo de distrofia muscular y así establecer el estándar de cuidado adecuado. Además, como gran parte de los protocolos terapéuticos que se están comenzando a implementar son mutación-dependientes, se debe conocer la alteración molecular del paciente. A su vez, es de gran importancia académico-científica el estudiar y caracterizar las variantes de secuencia halladas hasta el momento en el gen *DMD* con el fin de contribuir con el entendimiento de las bases genético-moleculares de estas patologías. Por un lado, se analizó una cohorte de 154 pacientes con distrofia muscular confirmándose el diagnóstico de Distrofinopatía en el 77% de ellos y de otras distrofias musculares en el 11% de los mismos, alcanzando una tasa de detección del 88%. Por otro lado, se analizaron unas 3.060 variantes de secuencia provenientes de la base de datos LOVD no detectándose *hotspots* (zona del gen propensa a sufrir alteraciones) del gen, y también se realizó un estudio de desequilibrio de ligamiento (estudio de alta complejidad para detectar la naturaleza hereditaria de una enfermedad, “linkage” en inglés) detectando 4 haplotipos co-segregantes en nuestra población. Finalmente, nuestro trabajo contribuye con la caracterización de la población argentina afectada con Distrofinopatías y conduce a una mayor comprensión de las alteraciones pequeñas que tienen lugar en el gen *DMD*.

■ Micaela Carcione,<sup>1,2</sup> Leonela Luce,<sup>1,2</sup> Chiara Mazzanti,<sup>1,2</sup> y Florencia Giliberto,<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires; Facultad de Farmacia y Bioquímica; Cátedra de Genética. Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>CONICET - Universidad de Buenos Aires; Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM). Buenos Aires, Argentina.

\*E-mail: giliberto@flor@gmail.com

Muscular Dystrophies (MD) are a group of inherited diseases that cause weakness and progressive degeneration of muscle tissue. Among them, Dystrophinopathies are the most prevalent type of MD and are caused by mutations in the *DMD* gene. However, the clinical symptoms of these pathologies overlap, hindering differential diagnosis, which is of paramount importance to establish the standard of care. Therefore, it is essential to carry out molecular studies to be able to differentiate between each type of MD. As mutation-dependent protocols are being implemented, the patient's molecular alteration must be characterized. Moreover, it is of great academic-scientific importance to study and characterize sequence variants found in the *DMD* gene in order to contribute to the understanding of the genetic/molecular basis of these pathologies. On one hand, a cohort of 154 patients with MD were analyzed, corroborating Dystrophinopathy diagnosis in 77% of them and other MDs in 11%, reaching a detection rate of 88%. On the other hand, 3,060 sequence variants from the LOVD database were analyzed, not detecting hotspots in the *DMD* gene. Also, a linkage disequilibrium study was carried out, detecting 4 cosegregating haplotypes in our cohort. Finally, our work contributes to the characterization of a Dystrophinopathy Argentine population and leads to a better understanding of the small alterations that take place in the *DMD* gene.

## ■ DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares son pa-

tologías hereditarias que ocasionan debilidad y degeneración progresiva del músculo esquelético. Bajo

este término, se incluye un grupo de desórdenes con una amplia heterogeneidad clínica, genética y bioquí-

mica (Mercuri *et al.*, 2013). Históricamente, las distrofias musculares eran clasificadas en base a los hallazgos clínicos. Sin embargo, el número y la diversidad de enfermedades que afectan al músculo exceden a la variedad de signos y síntomas con los cuales se presentan. Recién durante las últimas 2 décadas, gracias al descubrimiento de las bases genéticas de las formas más comunes de distrofia, se ha podido mejorar la categorización de los cuadros clínicos. Fue gracias al avance en la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares subyacentes a las distrofias musculares que se logró el establecimiento de consensos internacionales para el manejo clínico y diagnóstico de las mismas, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y la mejora en los estándares de cuidado de los pacientes.

#### ■ DISTROFINOPATÍAS: DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD) Y DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER (DMB)

Las distrofias musculares más frecuentes son las Distrofinopatías. Éstas son enfermedades de herencia recesiva ligada al cromosoma X y monogénicas, es decir, originadas por variantes genéticas en un gen en particular, en este caso el gen *DMD* (Xp21.2; OMIM #300377). Debido a la presencia de alteraciones moleculares, el gen no puede producir una proteína funcional llamada distrofina. Además, estos cuadros clínicos presentan un modo de herencia recesiva ligada al cromosoma X, lo cual significa que los hombres con alteraciones en este gen padecerán la enfermedad, ya que ellos poseen un único cromosoma X, siendo la ausencia o producción inadecuada de proteína la responsable de los trastornos musculares. En cambio, las mujeres serán portadoras asintomáticas en su gran mayoría. Esto

ocurre porque poseen dos cromosomas X y con que uno de ellos no esté alterado, la cantidad de proteína que se produce es suficiente para no generar distrofia muscular.

DMD es una patología muscular severa producida por la ausencia de la proteína codificada por el gen *DMD*, la distrofina, y afecta a 1 de 3.500-5.000 varones nacidos vivos (Muller *et al.*, 1994; Guiraud *et al.*, 2015). Se caracteriza por degeneración progresiva de las fibras musculares, con niveles elevados de las enzimas creatina-fosfoquinasa (CPK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Emery, 1977). Los síntomas comienzan a evidenciarse a edades muy tempranas, observándose un retraso en la adquisición de la marcha, caídas frecuentes, pseudohipertrofia gemelar y dificultades tanto para correr como para levantarse del piso y subir escaleras. En la adolescencia, los pacientes pierden la capacidad de caminar, lo cual suele conllevar al desarrollo de escoliosis e incluso grandes contracturas musculares. Esta enfermedad conduce a fallas cardíacas y/o respiratorias que, pese al tratamiento con corticoides, conllevan al fallecimiento en edades tempranas (Ryder *et al.*, 2017). Por otro lado, DMB posee una sintomatología similar a la DMD pero de progresión más lenta. La incidencia de la DMB es 1 de 18.000 - 20.000 niños nacidos con vida (Helderman-van den Enden *et al.*, 2013). En este caso, el músculo expresa a la proteína distrofina, pero la misma puede ser menos funcional o puede encontrarse en niveles más bajos, aunque su funcionalidad sea normal (Blyth *et al.*, 1958).

Ahora bien, ¿cómo se realiza el diagnóstico de estas enfermedades? En principio, se conoce que las alteraciones moleculares responsables de DMD/DMB son grandes deleciones (pérdida de al menos 1 exón del

gen) en el ~68% de los casos, grandes duplicaciones (ganancia de al menos 1 exón del gen) en el ~11% y alteraciones pequeñas en el ~20% restante (Aartsma-Rus *et al.*, 2016). Las alteraciones moleculares del gen *DMD* de menor frecuencia son las variantes intrónicas profundas y/o variantes en secuencias regulatorias, las cuales acontecen en el ~1% de los casos.

Sabiendo esto, el algoritmo molecular para la pesquisa de alteraciones en el gen *DMD* comienza con la búsqueda de grandes deleciones y duplicaciones (Aartsma-Rus *et al.*, 2016). El método elegido por excelencia es la técnica cuantitativa denominada Amplificación Múltiple de Sondas Ligadas o MLPA (Schwartz *et al.*, 2004). Esta técnica permite determinar la dosis en la que se encuentran todos los exones que componen al gen *DMD*. En caso de no hallarse una gran deleción o duplicación, se debe continuar con la búsqueda de alteraciones pequeñas mediante la secuenciación de los exones y de los sitios consenso de *splicing*. Esto generalmente se realiza mediante PCR-Secuenciación de Sanger, sin embargo, recientemente, gracias a los avances en el campo de la secuenciación de próxima generación (NGS) y a la disminución en sus costos, la secuenciación de exoma completo se ha transformado en una rápida, certera y costo-efectiva alternativa diagnóstica. La secuenciación de exoma completo consta del análisis de todas las secuencias exónicas, lo cual corresponde a secuenciar el 1,5-2% del genoma humano. Se estima que en el 85% de los casos las alteraciones causantes de patología se localizan en exones, por lo que esta técnica posee una alta expectativa de éxito.

Entonces, teniendo en cuenta los dos cuadros de Distrofinopatía y sabiendo que el algoritmo diagnós-

tico molecular es el mismo, se debe conocer la existencia de la llamada "Teoría del Corrimiento del Marco de Lectura". Esta teoría demuestra una correlación entre el fenotipo y la alteración molecular del paciente, cumpliéndose en el ~92% de los casos (Monaco *et al.*, 1988). ¿Qué es lo que postula dicha teoría? Que alteraciones que producen corrimiento en el marco de lectura conllevan a una terminación prematura de la traducción y, por ende, a una proteína trunca no funcional que será degradada. ¿Qué significa que una alteración produzca un corrimiento en el marco de lectura? Significa que la alteración estará provocando una pérdida o ganancia de material genético de manera tal que se alterará la forma en la que el ribosoma lee la información codificada en el ADN para luego traducirla a proteína. De esta manera, no sólo la proteína generada será sumamente distinta a la proteína *wild-type*, sino que además tendrá un codon de terminación prematuro de la traducción. Todo esto provocará que dicha proteína sea degradada por la maquinaria celular. Volviendo a las distrofinopatías y siguiendo lo postulado por esta teoría, alteraciones que produzcan un corrimiento en el marco de lectura y por lo tanto conlleven a la ausencia de distrofina producirán un fenotipo grave, es decir DMD. En cambio, variantes que no alteran el marco de lectura pueden generar una distrofina de distinto tamaño, pero parcialmente funcional que escapará a la degradación. Finalmente, la disminución en la funcionalidad de la distrofina resultante producirá un fenotipo leve o DMB.

¿Por qué es sumamente importante el diagnóstico molecular en pacientes con sospecha de Distrofinopatía? Actualmente, alrededor de 200 protocolos terapéuticos distintos se encuentran bajo desarrollo, validación o ensayos clínicos para

las Distrofinopatías. Entre ellas, ha sido condicionalmente aprobada por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) la terapia de evasión del codon de terminación prematuro de la traducción [Ataluren, PTC Therapeutics], ya en uso en nuestro país (Haas *et al.*, 2015). Dicha terapia aplica al 10% de los pacientes con Distrofinopatía que poseen alteraciones de tipo *nonsense* (Bushby *et al.*, 2014). ¿Qué es una alteración de tipo *nonsense*? Es una alteración pequeña donde se produce un cambio de un nucleótido por otro, que convierte al codón implicado en uno de terminación prematura de la traducción. Esta alteración generará una proteína trunca, no funcional y de menor tamaño que será degradada. Volviendo a la terapia de Ataluren, ésta permite sintetizar una proteína completa al evadir el codón de terminación prematuro de la traducción, mediante la incorporación de un aminoácido en su lugar. Como gran parte de estas terapias tienden a corregir la alteración molecular particular de cada paciente, resulta de suma importancia que cada afectado tenga caracterizada su alteración de forma precisa, de modo de poder establecer el protocolo que mejor se le adecúe.

#### ■ COHORTE ARGENTINA AFECTADA CON DISTROFINOPATÍA ANALIZADA POR SECUENCIACIÓN DE EXOMA COMPLETO

Partiendo de una cohorte de 154 pacientes varones con sintomatología compatible con Distrofinopatía, se identificó mediante secuenciación de exoma completo la alteración molecular causante de patología en 118 de ellos. En cuanto al tipo de alteración molecular identificada, se hallaron alteraciones de tipo *nonsense* (*sin sentido*), *frameshift* (*cambio de marco de lectura*), *splicing* (*de corte y empalme*), *mis-sense* (*sentido cambiado*), *in-frame*

(*en marco de lectura*) y sinónimas. Dichos hallazgos permitieron confirmar el diagnóstico clínico presuntivo de Distrofinopatía, determinar los estándares de cuidado adecuados para cada paciente y seleccionar candidatos que apliquen a los protocolos mutación-dependiente. Entre los pacientes estudiados (total son 154 pacientes), se determinó que 52 de ellos aplicarían para la terapia de Ataluren.

Recordando la teoría del marco de lectura, ésta fue empleada para determinar el fenotipo esperado en 38 de los pacientes, los cuales eran portadores de alteraciones de tipo *frameshift* o *in-frame*. El fenotipo esperado y observado coincidió en todos los casos, salvo por 4 pacientes. De estos 4 pacientes, 2 presentaban un fenotipo más grave (DMD) y variantes sin corrimiento del marco, mientras que los dos restantes presentaban un fenotipo más leve (DMB) y variantes con corrimiento del marco. Las discrepancias observadas en estos últimos dos pacientes podrían explicarse por la ocurrencia de un salteo fisiológico de los exones que portan la alteración, puesto que si estos fueran removidos del ARN mensajero (ARNm) el marco se restituiría. No obstante, estas hipótesis deben ser validadas mediante el análisis del ARNm.

En un paciente con fenotipo grave (DMD) se encontró una variante que produce la delección de un codón (c.10101\_10103del) que no provoca corrimiento en el marco de lectura. En ese momento, la misma había sido reportada en la base de datos Leiden Open Variation Database (LOVD) en 5 varones afectados clasificada como de significado incierto. ¿Qué se puede hacer en un caso así? En el caso de contar con muestras de la familia, se puede llevar a cabo un estudio de segregación de la variante con el fin de vali-

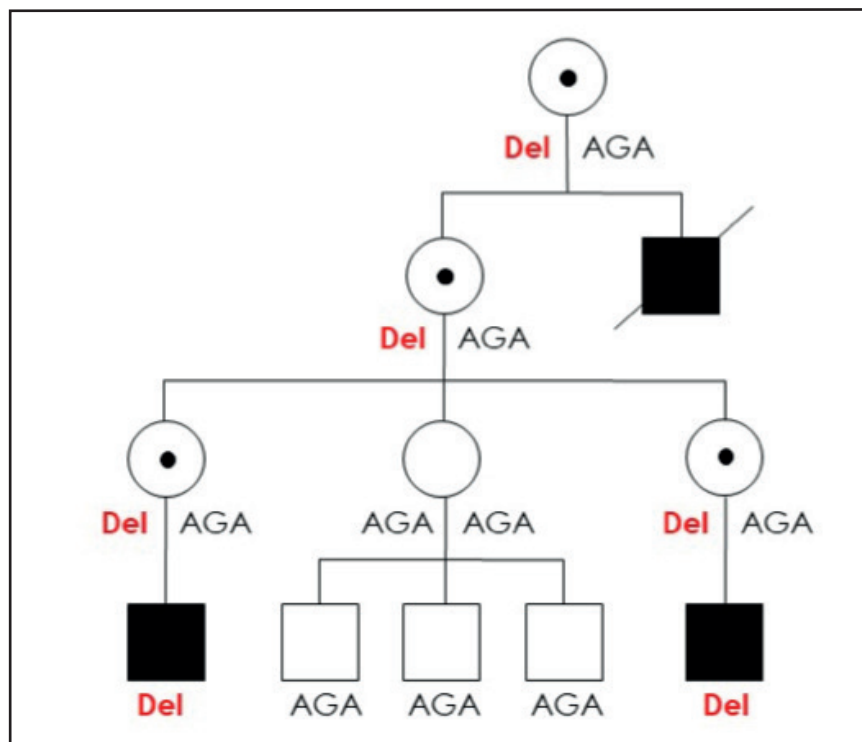
dar su efecto deletéreo. En este caso, al contar con muestras se realizó la segregación (Figura 1) y se pudo detectar la alteración molecular en 3

mujeres portadoras obligadas, mientras que no se detectó en los varones sanos. Más aún, un pequeño niño que sólo presentaba caídas frecuen-

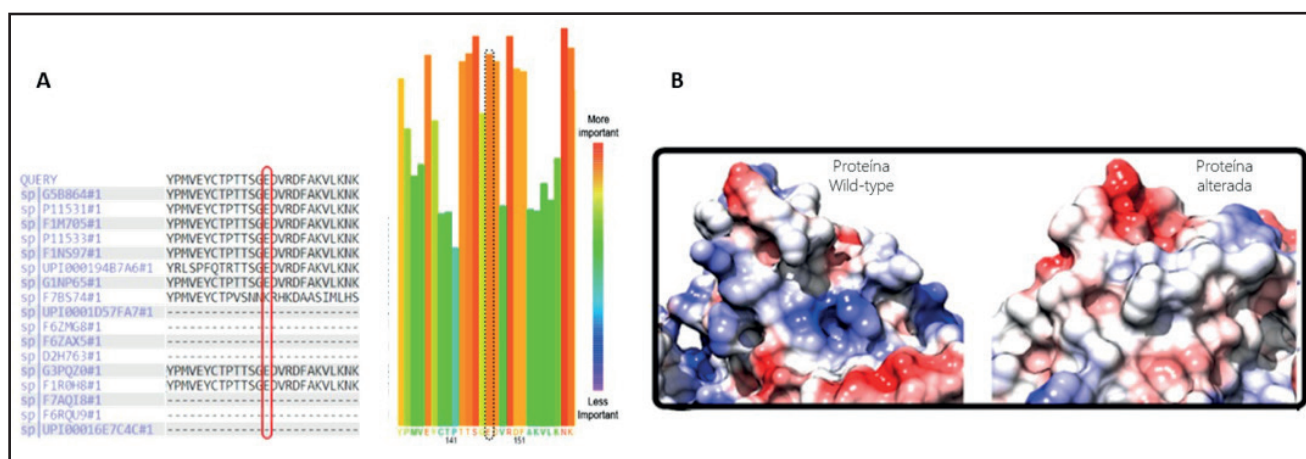
tes pudo ser diagnosticado tempranamente y su madre pudo ser clasificada como portadora obligada.

Ahora, ¿qué se podría hacer si no se cuenta con muestras de la familia? En ese caso, se puede realizar un análisis bioinformático de la variante hallada para validar su efecto deletéreo. En la figura 2 se puede observar que el aminoácido que se pierde como consecuencia de la alteración hallada se encuentra altamente conservado. A su vez, en dicha figura se puede observar el modelado molecular de la proteína resultante y como dicha proteína se ve alterada al compararla con la proteína original, llamada *wild-type*.

Como esta variante no provoca un corrimiento en el marco de lectura, se debe analizar que dominios se ven afectados para poder correlacionar la misma con el fenotipo observado (DMD). Finalmente, se pudo observar que esta deleción afecta los dominios ricos en cisteína y C-terminal de la proteína, especialmente el sitio de unión a distroglicanos, por lo que el aminoácido implicado en la deleción debe tener un fuerte impacto en la función de la proteína provocando así un fenotipo más grave al esperado.



**Figura 1:** Segregación intrafamiliar de la variante c.10101\_10103del. Los círculos representan a las mujeres y los cuadrados a los varones. Una línea diagonal que atraviesa a la figura indica que el individuo ha fallecido. Los cuadrados pintados de negro representan a los individuos enfermos y los círculos con un punto a las mujeres portadoras obligadas. Del en rojo: deleción de 3 bases. AGA: alelo wild-type. Las mujeres poseen dos copias del cromosoma X, por eso presentan dos alelos.



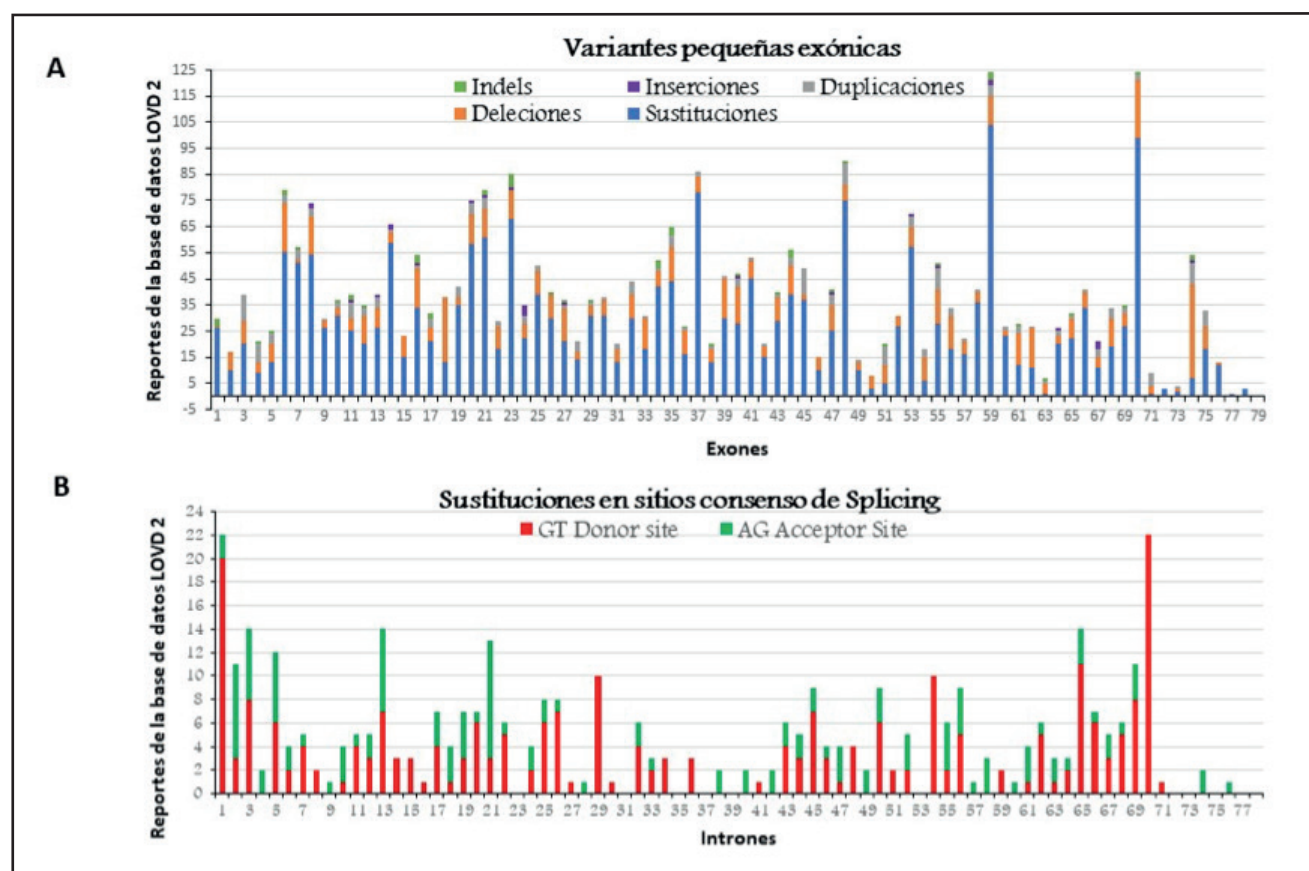
**Figura 2:** Análisis bioinformático de la variante c.10101\_10103del. (A) Conservación del aminoácido implicado en la deleción entre especies y su importancia relativa en la estructura de la proteína. (B) Modelado molecular de la proteína tanto wild-type como alterada.

Continuando con los resultados de la secuenciación de exoma completo, en 36 pacientes no pudo identificarse la alteración causante de la patología. Ahora bien, ¿qué se puede hacer en estos casos? Para descartar la posibilidad de haber filtrado la alteración patogénica y confirmar el correcto procesamiento de todos los exones del gen *DMD*, los datos crudos fueron analizados mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV), pero dicho trabajo no arrojó nuevos resultados y todos los exones demostraron ser correctamente leídos. Puesto que muchos de estos pacientes cuentan con biopsia e inmunohistoquímica compatible con Distrofinopatía, se cree que podrían portar alteraciones en zonas regulatorias o intrónicas profundas

que no son detectadas por esta metodología. ¿Qué significa que la inmunohistoquímica sea compatible con Distrofinopatía? Significa que se está evidenciando una ausencia o disminución de la proteína distrofina en la biopsia de músculo esquelético del paciente.

¿Son las Distrofinopatías los únicos cuadros de distrofias musculares? No, en verdad no son las únicas, aunque son las más frecuentes. Si bien la ausencia y/o disminución de la distrofina en el estudio de inmunohistoquímica es frecuentemente considerado como confirmación del diagnóstico de Distrofinopatía, debe tenerse en cuenta que puede también ser consecuencia secundaria por alteraciones en otros genes aso-

ciados a cuadros de distrofia muscular (Yamamoto *et al.*, 2008; Barresi, 2011). Entonces, ¿qué se podría hacer para lograr diagnosticar a los pacientes sin alteración hallada en el gen *DMD*? En principio, se debe ampliar la búsqueda de variantes a todos los genes asociados al desarrollo de distrofia muscular. Se llevó esto a cabo para los 36 pacientes sin alteración hallada y se logró identificar en 17 de ellos alteraciones patogénicas en otros genes. Esto permitió aumentar la tasa de detección de la secuenciación de exoma completo de un 77% a un 88%. A su vez, es importante destacar el hecho de que varios de los pacientes con biopsia compatible con Distrofinopatía y sin alteraciones en el gen *DMD*, presentaron alteraciones moleculares



**Figura 3:** Análisis de las variantes puntuales en el gen *DMD* reportadas en LOVD. **(A)** Distribución de las variantes de secuencia exónicas, clasificadas en base al tipo de alteración. Verde: delección-inserciones (indels); Naranja: delecciones; Violeta: inserciones; Azul: sustituciones; Gris: duplicaciones. **(B)** Distribución de las variantes de secuencia ubicadas en sitios consenso de splicing. Rojo: alteraciones en sitios dadores; Verde: alteraciones en sitios aceptores

en otros genes. ¿Por qué sucede que pacientes con sospecha de Distrofinopatía en realidad cursan la enfermedad de otra distrofia muscular? Esto sucede porque los síntomas clínicos de las Distrofinopatías y de otros tipos de distrofia muscular se solapan, dificultando el diagnóstico clínico. Por ello, es de suma importancia contar con un diagnóstico molecular que permita confirmar la sospecha clínica y así poder establecer los estándares de cuidado apropiados para cada paciente.

### ■ CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES PEQUEÑAS EN EL GEN *DMD*

Con este objetivo, se llevó a cabo un análisis de las pequeñas variantes de secuencia reportadas en la base de datos LOVD, dado el limitado número de alteraciones puntuales detectadas hasta el momento en nuestra población. Para ello, se analizó la frecuencia, la clase de alteración (sustitución, delección, inserción, duplicación y delección-inserción) y la localización de la misma (variantes exónicas o variantes localizadas en sitios consenso de *splicing*).

La página contó con un total de 3.060 reportes de alteraciones localizadas en regiones exónicas, entre las cuales se incluyen variantes de efecto patogénico confirmado, de probable efecto patogénico y variantes sin patogenicidad concluyente. El 70,6% (2.159/3.060) de las variantes correspondieron a sustituciones, le siguieron las delecciones (20,2%; 618/3.060) y las duplicaciones (6,6%; 203/3.060). Tanto las inserciones como las delección-inserciones presentaron las menores frecuencias, sumando entre ambas el 2,6% restante (Figura 3A). Dicha relación en las frecuencias coincide con la observada para las alteraciones patogénicas exónicas identificadas en los varones afectados de

nuestra cohorte, donde se halló que el 66,1% de las variantes fueron sustituciones, 21,2% delecciones, 10,2% duplicaciones y 2,5% inserciones y delección-inserciones.

¿Qué es un *hotspot* de alteraciones moleculares? Es la región del gen que es más propensa a sufrir eventos mutagénicos. Al analizar todas las variantes reportadas en LOVD, si bien no se evidencian *hotspots* de alteraciones puntuales en el gen *DMD*, se pueden destacar algunos exones debido a la ausencia o baja cantidad de eventos mutagénicos (exones: 50, 72, 73, 77, 78 y 79) (Figura 3A). Al contrario, también se pueden señalar exones con una elevada cantidad de variantes de secuencia (exones: 6, 20, 21, 23, 37, 48, 59 y 70). En particular, los exones 59 y 70 presentaron la mayor cantidad de variantes de secuencia (124/3.060 cada uno). El hallazgo realizado para el exón 70, apoya los resultados obtenidos en nuestra cohorte.

En cuanto a las alteraciones que afectan los sitios de *splicing*, la base de datos contó con un total de 374 reportes de sustituciones. Otras clases de alteraciones en estos sitios presentaban frecuencias despreciables, por lo que no fueron incluidas en el análisis. El 65,5% de las alteraciones afectó el sitio dador del proceso de *splicing* (Figura 3B). En cambio, el 34,5% restante se debieron a variantes en el sitio aceptor del *splicing*. En nuestra cohorte sólo se identificaron 25 variantes de secuencia que afectan el *splicing*, y las mismas no cumplen con el patrón evidenciado en la base de datos. El 44% de las variantes se localizaron en sitios dadores, mientras que el 56% corresponde a sitios aceptores.

Al igual que para las variantes exónicas, se pueden destacar intro- nes que no presentaron alteraciones

en los sitios de *splicing* (intrones: 23, 31, 35, 37, 39, 53, 72, 73, 74, 76, 77 y 78) (Figura 3B). Por otro lado, los intrones 1 y 70 mostraron el mayor número de eventos mutagénicos. Finalmente, también se pueden reconocer intrones que únicamente portaron alteraciones en sitios dadores (intrones: 14, 15, 16, 27, 29, 30, 34, 36, 41, 48, 51, 54, 59, 70 y 71) y otros que sólo presentaron alteraciones en los aceptores (intrones: 4, 9, 28, 38, 40, 42, 49, 57, 58, 59, 74 y 76).

Si bien el análisis de la base de datos LOVD no mostró existencia de *hotspots*, indicó que es poco probable para algunos exones y sitios consenso sufrir alteraciones moleculares puntuales. Estos exones se encuentran principalmente en el extremo 3' del gen, excluyendo el exón 70 el cual fue uno de los más afectados por esta clase de alteraciones (Figura 3). ¿Por qué sería importante conocer la existencia de *hotspots* en el gen? Porque de esa manera, la búsqueda de la alteración molecular se podría comenzar por las regiones del gen más propensas a sufrir eventos mutagénicos.

### ■ DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Para empezar, ¿qué es el desequilibrio de ligamiento? Se denomina desequilibrio de ligamiento a la asociación no azarosa de los alelos pertenecientes a 2 o más loci. Dicho desequilibrio explica por qué ciertas combinaciones de alelos se observan con mayor o menor frecuencia a la esperada para la formación al azar de los haplotipos, considerando las frecuencias alélicas de cada locus. El nivel de desequilibrio entre loci se encuentra influenciado por: la distancia relativa entre ambos, eventos de selección natural, la tasa de recombinación, la tasa de mutación, deriva génica, ausencia de panmixia

y la estructura poblacional (Chakraborty *et al.*, 2011). ¿Para qué sirve un análisis de desequilibrio de ligamiento? El mismo sirve para conocer la evolución del genoma o, al menos, una región de éste. Esto se debe a que los eventos demográficos, como ser el cambio en el tamaño poblacional y la migración, dan forma a los patrones genómicos de desequilibrio de ligamiento (McVean, 2002; Zavattari *et al.*, 2000).

Para la cohorte presentada anteriormente se analizó la presencia de desequilibrio de ligamiento entre las variantes de secuencia identificadas mediante la técnica de secuenciación de exoma completo. Fueron excluidas del análisis las alteraciones moleculares asignadas como causantes de patología y aquellas que sólo fueron halladas en un único individuo. Finalmente, se tuvieron en cuenta 67 variantes de

secuencia. Se implementó el programa Haploview 3.2 para establecer si los polimorfismos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, analizar la existencia de desequilibrio de ligamiento e identificar haplotipos que estén cosegregando en la población analizada (Barrett *et al.*, 2005). Entonces, se identificaron 4 bloques de cosegregación, 3 de ellos conformados por 2 variantes de secuencia y uno conformado por 4 variantes (Figura 4).

Con el fin de intentar establecer el origen evolutivo de los bloques hallados, se compararon los MAF (*Minor Allele Frequency*) observados en nuestra cohorte con los obtenidos por el consorcio 1000Genomas para las poblaciones CLM (colombianos de Medellín), PEL (peruanos de Lima), TSI (italianos de la Toscana) e IBS (ibéricos de España). Se seleccionaron las mencionadas po-

blaciones de modo de analizar los 3 orígenes evolutivos más probables para nuestra población (amerindio, italiana y española). Analizando la Tabla 1, al comparar las frecuencias de la población argentina con las mencionadas poblaciones se puede llegar a distintas conclusiones según el bloque que se analice. ¿Qué pasa con los bloques 1 y 2? Estos tienden a acercarse a la frecuencia de la población europea, específicamente el bloque 1 es más similar a la población española. Y en el bloque 3, ¿qué está pasando? En este bloque no se observa similitud alguna con ninguna de las poblaciones seleccionadas. ¿Y qué pasa con el bloque 4? Este bloque pareciera ser bastante característico de la población latina.

¿Qué se puede decir de todo esto? Que la similitud entre los MAF de nuestra población con las poblaciones IBS y TSI, señalaría que los



**Figura 4:** Análisis empleando el programa Haploview de las variantes de secuencia identificadas mediante secuenciación de exoma completo. El diagrama de desequilibrio de ligamiento se generó en base al  $D'$ . Los distintos colores del gráfico dependen del valor de  $D'$  y del estadístico LOD: rojo intenso ( $D'=1$ ,  $LOD \geq 2$ ), rosa/rojo claro ( $D' < 1$ ,  $LOD \geq 2$ ), blanco ( $D' < 1$ ,  $LOD < 2$ ) y azul ( $D'=1$ ,  $LOD < 2$ ). Los números dentro de los triángulos blancos corresponden al valor  $D'$  dividido 100. Los triángulos negros señalan los bloques que conforman los haplotipos identificados. En la esquina inferior derecha se detallan los haplotipos y sus frecuencias.

Tabla 1:

Comparación de los MAF para los loci involucrados en los bloques hallados.

Bloque	1		2		3		4			
Variante	c.9649+15T>C	c.9564-97C>T	c.1704+51T>C	c.1635A>G	c.1483-110G>A	c.1483-123G>T	c.960+166T>C	c.837G>A	c.832-53C>T	c.802T>C
MAF CLM	0,159	0,159	0,069	0,076	0,476	0,476	0,069	0,131	0,069	0,069
MAF PEL	0,039	0,039	0,008	0,016	0,527	0,527	0,078	0,093	0,078	0,078
MAF IBS	0,113	0,113	0,138	0,138	0,588	0,588	0	0,006	0	0
MAF TSI	0,168	0,161	0,143	0,149	0,59	0,59	0	0,006	0	0
MAF argentino	0,068	0,126	0,087	0,097	0,117	0,107	0,058	0,087	0,058	0,058

bloques 1 y 2 se habrían adquirido gracias a las sucesivas oleadas migratorias europeas, especialmente españolas e italianas, que han tenido lugar durante la historia de nuestro país. Pero, la falta de similitud de los bloques 3 y 4 con las poblaciones europeas demostraría que los mismos podrían provenir de los pueblos originarios argentinos. Es importante destacar que la comparación de los MAF podría no ser certera, en primer lugar, porque nuestra población no se encuentra representada en los consorcios internacionales de secuenciación. En segundo lugar, si bien las poblaciones CML y PEL son las más cercanas geográficamente, esto no necesariamente significa que tienen que ser genéticamente similares a la nuestra. ¿Qué destaca todo esto? La necesidad e importancia de contar con consorcios de secuenciación para la caracterización del genoma de cada país o región.

## COMENTARIOS FINALES

Nuestro equipo fue pionero en el uso de la técnica de secuenciación de exoma completo para la pesquisa de alteraciones pequeñas en el gen *DMD* en la cohorte argentina afectada con Distrofinopatías. Esta metodología demostró ser útil para alcanzar el diagnóstico diferencial entre las distintas distrofias musculares, determinar los estándares de cuidado adecuados para cada paciente e identificar candidatos para protocolos mutación-dependiente.

Asimismo, se logró llevar a cabo una caracterización de la diversidad de variantes de secuencia en el gen *DMD* en nuestra cohorte y en pacientes con Distrofinopatía reportados en la base de datos LOVD. También se identificó la existencia de desequilibrio de ligamiento entre 10 loci, los cuales demuestran el acervo genético de nuestra población. Finalmente, nuestro trabajo contribuye con la caracterización de la población argentina afectada con Distrofinopatías y conduce a una mayor comprensión de las alteraciones pequeñas que tienen lugar en el gen *DMD*.

## GLOSARIO

**Alteración de tipo sinónima:** Variante a nivel genómico que no produce un cambio de aminoácido a nivel de la proteína.

**Frameshift:** Variante que genera un corrimiento del marco de lectura de las bases del ADN.

**In-frame:** Variante que no genera un corrimiento del marco de lectura de las bases del ADN.

**Minor Allele Frequency (MAF):** Es la frecuencia a la cual aparece dentro de una población el alelo menos representado para un determinado locus (posición en el genoma).

**Missense:** Variante de ADN a nivel genómico que produce un cambio

de base que se manifiesta con un cambio de aminoácido en la proteína.

**Portadora/o obligada/o:** Persona portadora de una enfermedad genética con una certeza del 100% deducido de su historia familiar.

**Proteína wild-type:** Se refiere a la proteína "salvaje", es decir, a la secuencia aminoacídica de la proteína más representada en una población.

**Segregación de una variante:** Estudio de la transmisión de una variante en los integrantes de una familia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aartsma-Rus A., Ginjaar I.B., Bushby K. (2016) The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 53(3), 145-151.
- Barresi R. (2011) From proteins to genes: immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. *Skelet Muscle* 1, 24.
- Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2), 263-265.
- Blyth H., Pugh R.J. (1958) Muscular dystrophy in childhood: the genetic aspect: a field study in the Leeds region of clinical types and



- their inheritance. *Ann Hum Genet* 23, 127-163.
- Bushby K., *et al.* (2014) Ataluren treatment of patients with nonsense mutation Dystrophinopathy. *Muscle Nerve* 50(4), 477-487.
- Chakraborty S., Motsinger-Reif A. (2011) Linkage Disequilibrium between ABO and Rh Loci in Barak Valley Populations vis-à-vis a Few Exotic Populations. *Not Sci Biol* 3(2), 7-11.
- Emery A.E. (1977) Muscle histology and creatine kinase levels in the foetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 266, 472-473.
- Guiraud S., Aartsma-Rus A., Vieira N.M., Davies K.E., van Ommen G.J.B., Kunkel L.M. (2015) The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 16, 281-308.
- Haas M., *et al.* (2015) European Medicines Agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 25(1), 5-13.
- Helderman-van den Enden A.T., Madan K., Breuning M.H., van der Hout A.H., Bakker E., de Die-Smulders C.E.M., Ginjaar H.B. (2013) An urgent need for a change in policy revealed by a study on prenatal testing for Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* 21, 21-26.
- McVean G.A. (2002) A genealogical interpretation of linkage disequilibrium. *Genetics* 162, 987-991.
- Mercuri E., Muntoni F. (2013) Muscular dystrophies. *Lancet* 381(9869), 845-860.
- Monaco A., Bertelson C.J., Liechti-Gallati S., Moser H., Kunkel L.M. (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90-95.
- Muller U., Graeber M.B., Haberhausen G., Köhler A. (1994) Molecular basis and diagnosis of neurogenetic disorder. *J Neurol Sci* 124(2), 119-140.
- Ryder S, Leadley R.M., Armstrong N., Westwood M., de Kock S., Butt T., Jain M., Kleijnen J. (2017) The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12(1), 79.
- Schwartz M., Dunø M. (2004) Multiplex ligation-dependent probe amplification is superior for detecting deletions/duplications in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 67, 189-191.
- Yamamoto L.U., Velloso F.J., Lima B.L., Fogaça L.L.Q., de Paula F., Vieira N.M., Zatz M., Vainzof M. (2008) Muscle protein alterations in LGMD21 patients with different mutations in the Fukutin-related protein gene. *J Histochem Cytochem* 56(11), 995-1001.
- Zavattari P., Deidda E., Whalen M., Lampis R., Mulargia A., Loddo M., Eaves I., Mastio G., Todd J.A., Cucca F. (2000) Major factors influencing linkage disequilibrium by analysis of different chromosome regions in distinct populations: demography, chromosome recombination frequency and selection. *Hum Mol Genet* 9, 2947-2957.