

EJEMPLO PRÁCTICO

Se presenta el caso de un varón con sospecha de Distrofia Muscular de Becker (DMB), enfermedad está ligada al cromosoma X. Al paciente se le detectó la delección hemicigota de los exones 4, 5 y 6 del gen *DMD* (NM_004006.2) mediante análisis de delecciones/duplicaciones mediante MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*, SALSA P034-A2/P035-A2). Esta delección provocaría la ruptura de la fase de lectura del gen *DMD*, generando un codón de parada prematuro en el ARN mensajero resultante. Este hecho contradice el diagnóstico clínico, ya que la ruptura de la fase de lectura determinaría la forma severa de distrofinopatía, es decir, una Distrofia Muscular de Duchenne.

- Para determinar posibles alteraciones adicionales en el gen de la distrofina, se decidió el estudio mediante secuenciación masiva.
 - Se llevó a cabo el proceso de secuenciación, llevándose a cabo en primer lugar la generación de librerías y el enriquecimiento mediante el kit de captura *TruSight Inherited Disease (Illumina)*. La secuenciación ulterior fue mediante la modalidad paired-end de 2x151pb, utilizando el secuenciador *MiSeq (Illumina)*. En el proceso se generan pares de lecturas que comienzan en los extremos de cada fragmento de ADN amplificado, que a su vez pasan a formar parte de un archivo en formato *fastq*. Las lecturas presentes en este archivo se alinean contra el genoma de referencia en su versión hg19 utilizando el algoritmo *BWA*, obteniéndose un archivo BAM (resultante de un SAM), para a continuación generarse un archivo de variantes en formato *VCF*, empleando el software *GATK*. El análisis de cobertura se realizó mediante algoritmos propios y la predicción de variaciones en el número de copia (CNVs) mediante el software *Exome-Depth*. De todos los genes disponibles en el panel, se estudió el gen *DMD*, tal y como señalaba la petición.
 - El análisis de variantes dio como resultado una serie de variantes polimórficas no relevantes a nivel clínico y una delección de un nucleótido *NM_004006.2:c.183delA p.(Lys61Asnfs*14)* localizada en el exón 3 del gen. Esta variante no estaba descrita en ninguna base de datos consultada en la fecha de resolución del caso. Cabe destacar que esta variante fue detectada asociada a una alarma de baja cobertura en la posición.
 - El análisis de cobertura (es decir, cuántas lecturas cubren verticalmente por término medio las regiones analizadas) arrojó como resultado una cobertura media de 77,56X y un porcentaje de bases con cobertura mayor de 20X de un 89,69 %. Llamó la atención que las bases por encima de 20X no fueran el 100 %, pero esto se corresponde en realidad, y como era de esperar, a la existencia de la delección completa en hemicigosis de los exones 4, 5 y 6 previamente detectada mediante MLPA. A partir de los datos de alineamiento se puede evidenciar la delección observando que no existen lecturas en dichos exones (Figura 1).
-



Figura 1: Vista general de los exones 3, 4, 5, 6, 7 mediante el software *Integrative Genomic Viewer* (IGV). En la parte superior de la figura se observa la distribución de citobandas, y en rojo la localización de *DMD* en el cromosoma X. Las coordenadas genómicas se evidencian justo debajo de las citobandas.

Los exones se representan mediante cajas en azul, sobre las líneas horizontales azules, que serían los intrones. En gris las lecturas alineadas: a la izquierda las correspondientes al exón 7 y las de la derecha las del exón 3 (el gen *DMD* es reverso). No existen lecturas en los exones 4, 5 y 6.

- Mediante el predictor de CNVs ExomeDepth también se evidenciaron, de manera automatizada, las coordenadas de la región afectada por la delección (Figura 2).
- Observando con mayor nivel de detalle el alineamiento en la región donde se localizó la delección c.183delA, se evidenció una caída abrupta de cobertura en comparación con lo esperado, tal y como se muestra en la Figura 3.
- Más allá de la región donadora de splicing, no existe alineamiento de secuencias, cosa que sí ocurre en cualquier paciente no relacionado. La menor cantidad total de lecturas alineadas en el exón 3 explicaría el resultado del ExomeDepth.
- Este hallazgo hizo pensar que el punto de rotura debería de estar próximo a esta región, por lo que se decidió realizar una PCR con primers que hibridaran en los exones 7 y 3 y secuenciar el producto. De esta manera se delimitaron los puntos de rotura de la delección (chrX:32,829,234-32,867,835), estando ambos situados en regiones intrónicas, como era de esperar.

- Ambas deleciones en conjunto (la gran deleción y la de un nucleótido) dieron como resultado una deleción en fase, con la sustitución adicional de los dos últimos aminoácidos del exón 3, (Lys-Leu a Asn-Trp). La proteína resultante, por tanto, se generaría hasta el codón de parada original, tendría 2 cambios aminoacídicos y tendría ausentes los aminoácidos de los exones 4, 5 y 6. Este hecho sí sería compatible con el diagnóstico clínico de una DMB.

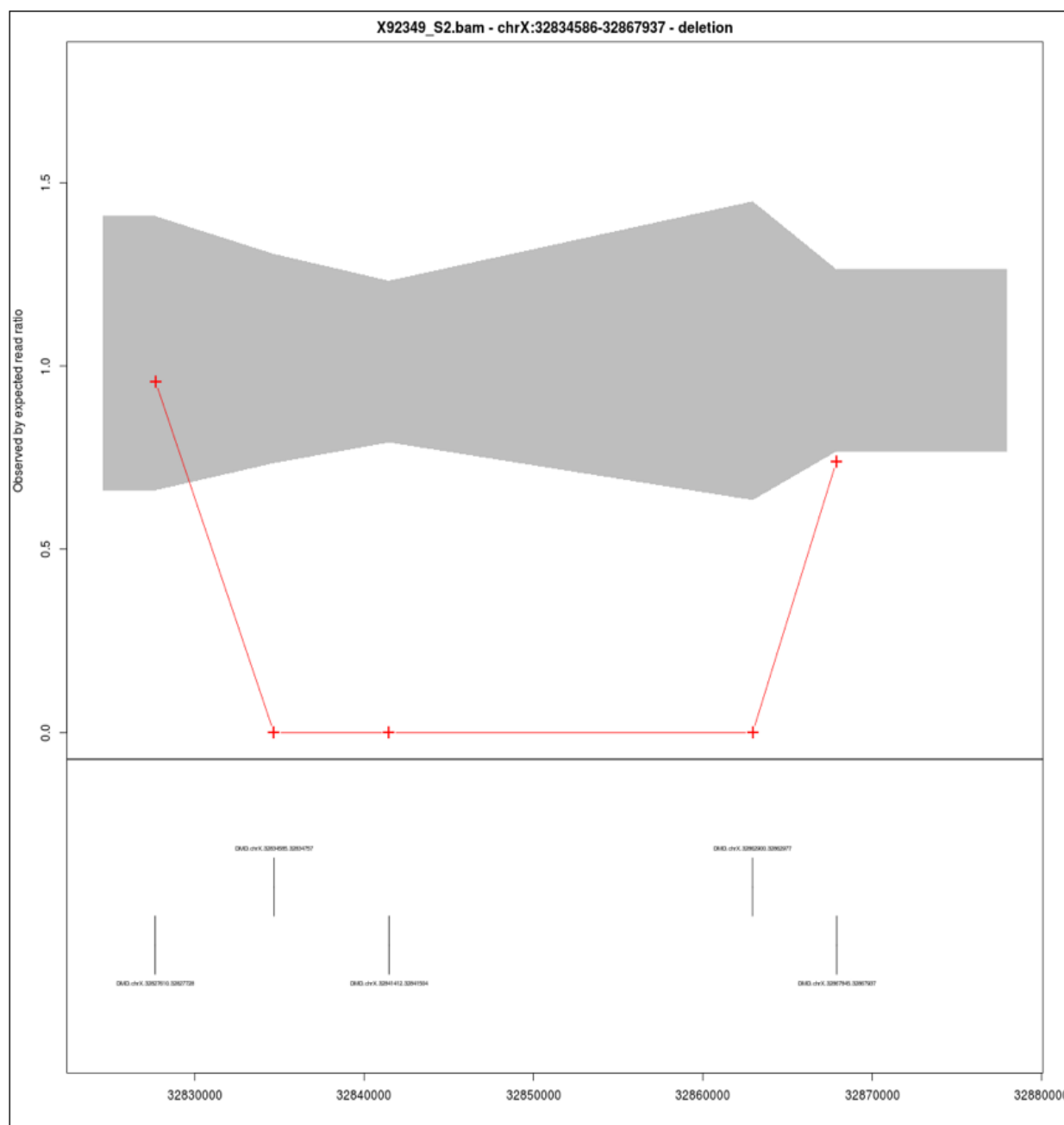


Figura 2: Representación gráfica del ratio de lecturas observadas/esperadas (eje Y) en los exones 7, 6, 5, 4 y 3 (eje X). La región gris corresponde a una no variación del número de copias (las lecturas observadas son las esperadas), mientras valores por debajo (como el caso de los exones 6, 5 y 4) corresponden a deleciones. El punto correspondiente al exón 3 queda algo por debajo de lo esperado para la normalidad. Más adelante se explicará este hallazgo.



Figura 3: Imagen superior: localización de la deleción NM_004006.2:c.183delA evidenciada en el VCF (rodeado de rojo). Las lecturas (en gris/azul oscuro) allí alineadas tienen ausente un nucleótido (el de la deleción). Imagen inferior: distribución normal de las lecturas en un paciente no relacionado, donde no se observa ningún cambio con respecto al genoma de referencia.

- Este caso clínico ilustra que mediante esta técnica de secuenciación masiva se pueden resolver casos molecularmente complejos, como este que nos ocupa, para filiar con exactitud un fenotipo a un genotipo. De otra manera, el caso podría haber quedado no resuelto (o resuelto en un tiempo mucho mayor) si análisis se limitara a otras técnicas convencionales.