

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**EVOLUCIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA Distrofia
FACIOESCAPULOHUMERAL:
LA HISTORIA (INACABADA) DE UNA COHORTE HISTÓRICA**

TESIS DOCTORAL

PILAR CAMAÑO GONZÁLEZ

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por
la Universidad del País Vasco

Director: Adolfo López de Munain Arregui

Donostia, 2021

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Neurogenética de la Unidad Experimental del Hospital Donostia y en el área de Neurociencias del Instituto de Investigación Biosanitaria BioDonostia bajo la dirección del Dr. Adolfo López de Munain Arregui, gracias a una beca predoctoral otorgada por la Fundación Ilundain, una beca predoctoral otorgada por la obra social de Kutxa (Kutzazabal), una beca asociada a proyectos de investigación del Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco (GV2008111011) y a las ayudas para la investigación recibidas del Centro Investigación Biomédica en Red para enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED).

A mis aïtas

A David

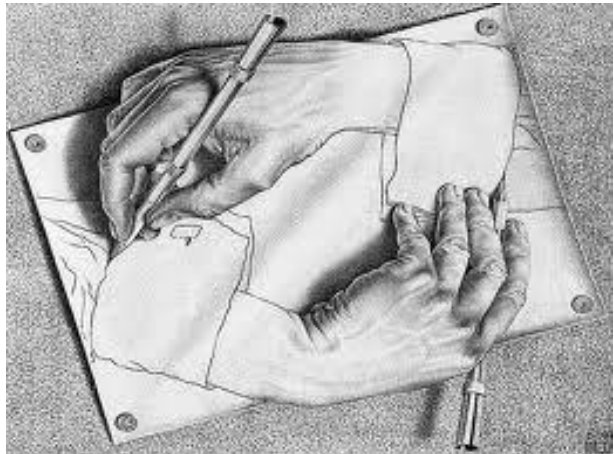
A nuestros hijos, Asier y Sara

“La vida sólo puede ser comprendida mirando hacia atrás,
pero ha de ser vivida mirando hacia adelante”.
Sören Aabye Kierkegaard

“Todo el mundo trata de realizar algo grande,
sin darse cuenta de que la vida se compone de cosas pequeñas”.
Frank A. Clark

“Las personas que triunfan son aquellas que
interpretan los errores como parte del éxito.
Muchas veces para triunfar hay que fracasar primero.
Es posible incluso que fracases varias veces,
pero ten en cuenta que con cada fracaso aprenderás
lo que es imposible de aprender si aciertas a la primera”.
Lair Ribeiro

ÍNDICE



ÍNDICE GENERAL DE MATERIAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	17
1. Nota histórica, diagnóstico diferencial y delimitación clínico-nosológica	19
2. Genética de la distrofia facioescapulohumeral	28
2.1. Introducción	28
2.2. Caracterización molecular de la delección en la DFEH1	29
2.2.1. Homología de la secuencia con la región 10q26	31
2.2.2. Translocaciones de D4Z4 entre 4q35 y 10q26	32
2.2.3. Variantes 4qA/4qB y asociación con 4qA. Haplotipos SSLP	34
2.2.4. Mosaicismo	36
2.3. DFEH2	40
2.3.1. Diagnóstico molecular de la DFEH2	42
2.4. Trayectoria histórica de modelos de fisiopatología molecular en la DFEH ligada al cromosoma 4	43
3. Aspectos clínico-genéticos.....	63
3.1. Patrón de herencia	63
3.1.1. Homocigotos y heterocigotos compuestos (efecto de dosis)	63
3.2. Penetrancia	64
3.3. Influencia del sexo en la presentación clínica	65
3.4. Anticipación	66
3.5. Correlación clínico-molecular	68
3.6. Estudios complementarios	71
HIPÓTESIS	75
OBJETIVOS	79
MATERIAL Y MÉTODOS	83
1. Origen de los pacientes y tipos de muestras	85
2. Recogida de datos	85
3. Estudio molecular de la distrofia facioescapulohumeral tipo 1 (DFEH1)	86
3.1. Extracción de ADN a partir de sangre periférica	86

3.2. Extracción de ADN a partir de vellosidad corial o líquido amniótico	86
3.3. Medida de la concentración de ADN	86
3.4. Estudio molecular mediante electroforesis horizontal estándar (LGE – Linear Gel Electrophoresis -)	87
3.4.1. Discriminación del fragmento patológico mediante triple digestión enzimática (EcoRI, EcoRI/BlnI, XapI)	87
3.4.2. Electroforesis horizontal (LGE)	87
3.4.3. Southern blot	87
3.4.4. Prehibridación	88
3.4.5. Marcaje radioactivo con fósforo 32 e hibridación	88
3.4.6. Lavados	88
3.4.7. Autoradiografía y revelado	88
3.5. Estudio molecular mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE)	92
3.5.1. Triple digestión enzimática (EcoRI/HindIII, EcoRI/BlnI, XapI)	95
3.5.2. Electroforesis de campo pulsante (PFGE)	95
3.5.3. Southern blot	95
3.5.4. Prehibridación	96
3.5.5. Marcaje radiactivo con fósforo 32 e hibridación	96
3.5.6. Lavados	96
3.5.7. Autorradiografía y revelado	96
3.6. Deleción de D4F104S1	97
4. Haplotipo SSLP	98
5. Estudio molecular de la distrofia facioescapulohumeral tipo 2 (DFEH2)	99
6. Estudio del nivel de metilación en la región D4Z4	100
7. Estudio de otros genes implicados en los síndromes escapuloperoneales: VCP y FHL1	102
8. Valoración clínica. Escala de Gardner-Medwin-Walton (GMW)	105
9. Cuantificación de la CPK	106
RESULTADOS	107
1. Aspectos demográficos, clínicos y genéticos de la muestra.....	109
1.1. Aspectos demográficos	109
1.2. Procedencia de las muestras	109
1.3. Síntomas de inicio	111
1.4. Grado de incapacidad: Escala de Gardner-Medwin y Walton (GMW)	112

1.5. Fenómeno de anticipación	113
1.6. CPK	115
2. Caracterización molecular de la muestra mediante electroforesis horizontal estándar (LGE)	116
2.1. Distribución de los pacientes por tamaño de fragmento y sexo	119
2.2. Transmisión del fragmento: Origen materno o paterno	120
2.3. Casos esporádicos y familiares con DFEH1	121
2.4. Edad de inicio de los síntomas en las DFEH1 familiar y <i>de novo</i> y correlación con el tamaño del fragmento residual	122
2.5. Pacientes asintomáticos con fragmentos en el rango patológico	124
2.6. Pacientes con un tamaño del fragmento en la zona gris	124
3. Caracterización molecular de la repetición D4Z4	125
3.1. Electroforesis de campo pulsante (PFGE). Variante 4qA o 4qB	125
3.2. Haplotipos SSLP (Simple sequence length polymorphism)	127
3.3. Contracciones inusuales	132
3.3.1. Translocaciones	132
3.3.2. Mosaicos	136
3.3.3. Heterocigotos compuestos	141
3.3.4. Fragmentos no patológicos en el rango ≤ 38 kb	142
4. Diagnósticos prenatales	144
5. Pacientes con clínica de DFEH pero sin la contracción de D4Z4	150
5.1. DFHE tipo 2. Estudio de metilación	150
5.2. Pacientes sin DFEH: Otros síndromes (Diagnóstico diferencial)	152
5.2.1. Gen VCP	153
5.2.2. Gen FHL1	154
DISCUSIÓN	155
1. Correlación fenotipo-genotipo	157
1.1. Correlación clínico-molecular.....	157
1.2. Características demográficas de nuestra serie	158
1.3. Edad de inicio y casos de novo.....	159
1.4. Origen del fragmento patológico	159
1.5. Gravedad de los síntomas	159
1.6. Anticipación	160
1.7. Síntomas de inicio	160

2. Problemas técnicos en el diagnóstico molecular de la DFEH	160
2.1. Necesidad de información clínica	161
2.2. Del revelado manual al escaneado	162
2.3. La importancia de las digestiones	163
2.4. ADN embebido en bloques de agarosa frente a ADN líquido	164
2.5. Deleción de la sonda (Falsos negativos)	165
2.6. Permisividad	166
2.7. Fragmentos híbridos y casos de mosaicismo	168
2.8. Heterocigotos compuestos	169
2.9. Portadores asintomáticos de fragmentos en el rango patológico	171
2.10. Hacia el modelo unificado de explicación de la enfermedad	174
3. Diagnóstico prenatal. Consideraciones y limitaciones	175
4. El proceso diagnóstico.....	177
5. Perspectivas futuras. Estrategias terapéuticas	186
CONCLUSIONES	193
CAPÍTULO DE LIBRO Y PUBLICACIONES RELACIONADOS CON LA TESIS	199
BIBLIOGRAFÍA	203
ANEXOS	233
Anexo 1. Extracción del ADN fetal	235
Anexo 2. Amplificación de la sonda p13E-11	236
Anexo 3. PFGE	237
Anexo 4. Amplificación de las sondas 4qA/4qB	239
Anexo 5. Estudio molecular indirecto basado en marcadores (prenatales)	240
Anexo 6. Variantes identificadas en los genes SMCHD1 y DNMT3B	243
Anexo 7. Variantes identificadas en el gen VCP	253

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paciente con DFEH dibujado por Duchenne de Boulogne (izda) y foto del paciente (dcha)	19
Figura 2. Louis Landouzy –izda- y Joseph Jules Déjérine –dcha-	20
Figura 3. Músculos afectados en la DFEH	24
Figura 4. Características clínicas de la DFEH	24
Figura 5. Debilidad de músculos pectorales, humeral y de la cintura escapular	25
Figura 6. La debilidad del orbicular de los ojos y de la boca	25
Figura 7. Atrofia del músculo pectoral mayor, pliegue axilar anterior horizontal y protrusión abdominal asimétrica (izda)	26
Figura 8. Debilidad de los músculos de las piernas en un paciente con DFEH	26
Figura 9. Defecto genético en la DFEH1	30
Figura 10. Triple análisis del ADN	32
Figura 11. Translocaciones homogéneas de todo el grupo de repeticiones entre los cromosomas 4 y 10	33
Figura 12. Composición de las variantes A y B	34
Figura 13. Variaciones específicas en la secuencia dentro de la región 4q35	35
Figura 14. Visión general de la prevalencia de haplotipos en población europea	36
Figura 15. Mutaciones <i>de novo</i>	49
Figura 16. Comparación de los mismos pacientes mediante LGE y PFGE	40
Figura 17. Diferentes modelos para explicar el mecanismo epigenético de la DFEH	45
Figura 18. Modelo para la base molecular de la DFEH en 2002	46
Figura 19. La genética y el mecanismo molecular de la DFEH	48
Figura 20. Diagrama de las tres últimas repeticiones D4Z4.....	49
Figura 21. Cascada de desregulación transcripcional en la DFEH	51
Figura 22. Factores implicados en la regulación de la expresión de DUX4.....	54
Figura 23. Esquema de los diferentes grados de compactación de la cromatina, desde los nucleosomas al cromosoma	55
Figura 24. Descondensación de la cromatina inducida por la acetilación de histonas	55
Figura 25. Modelo propuesto para la propagación del cambio epigenético en D4Z4 a otras regiones genómicas en la DFEH	57
Figura 26. Modelo de desrepresión en 4q35 mediada por DBE-T	58
Figura 27. Modificadores epigenéticos y modificaciones de histonas asociadas con las repeticiones D4Z4	59

Figura 28. Modelo que explica el papel del elemento D4Z4 como aislante y su implicación en la alteración epigenética de la DFEH	60
Figura 29. Modelo de la organización del locus 4q5 en individuos sanos y en pacientes con DFEH	61
Figura 30. Regulación epigenética en D4Z4 en células musculares sanas y con DFEH	62
Figura 31. Equipo Typhoon Trio, el Image Eraser y los chasis de exposición de pantallas...	89
Figura 32. Visualización del fragmento inespecífico perteneciente al cromosoma Y en dos membranas	91
Figura 33. Esquema del flujo de trabajo del diagnóstico de DFEH	92
Figura 34. Equipo de PFGE, esquema del funcionamiento e imagen de membrana....	93
Figura 35. Mapa genómico del locus de la DFEH que contiene los subtelómeros 4qA y 4qB	98
Figura 36. Mutaciones en SMCHD1	100
Figura 37. Gráfico de correlación entre el tamaño de fragmento y la escala de GMW	112
Figura 38. Gráfico de correlación entre la escala de GMW y la edad de inicio de los síntomas	113
Figura 39. Gráfico de correlación de la CPK con el tamaño del fragmento en DEFH1	116
Figura 40. Porcentaje de acierto en la confirmación molecular de la sospecha clínica a lo largo de estos 20 últimos años	119
Figura 41. Gráfico de cajas que muestra la distribución del tamaño del fragmento en ambos sexos	120
Figura 42. Gráfico de cajas mostrando la distribución del tamaño del fragmento entre casos <i>de novo</i> y familiares	122
Figura 43. Gráfico de correlación entre edad de inicio de los síntomas y el tamaño de fragmento para los casos <i>de novo</i> y los casos familiares	123
Figura 44. Gráfico de cajas mostrando la distribución de la edad media de inicio de síntomas en los casos <i>de novo</i> y los familiares	123
Figura 45. Intercambios subteloméricos homogéneos de todo el grupo de repeticiones del # 4 al 10 y viceversa	133
Figura 46. Configuraciones subteloméricas de repeticiones en la región D4Z4 entre los cromosomas 4 y 10	133
Figura 47. Configuraciones subteloméricas de repeticiones en la región D4Z4 entre los cromosomas 4 y 10 en nuestra serie de pacientes	135
Figura 48. Paciente mosaico visualizado mediante LGE	136

Figura 49. Ejemplos de algunas membranas de PFGE con distintos tipos de fragmentos	139
Figura 50. Membrana de PFGE con información completa de los alelos del # 4 y # 10 en 5 de nuestros pacientes	140
Figura 51. Membrana de LGE en la que se pueden ver la composición de los alelos del # 4 y # 10 en 5 de nuestros pacientes	141
Figura 52. Fragmentos del # 10 en el rango patológico en una de nuestras membranas ...	143
Figura 53. Estudio prenatal de DFEH1 de la familia C mediante marcadores proximales a la región D4Z4	149
Figura 54. Membrana de uno de nuestros blots con 6 individuos con hipometilación	150
Figura 55. Distribución del % metilación (<i>FseI</i>) en los 3 grupos: DFEH1, DFEH1 (zona gris) y DFEH2	152
Figura 56. Flujo de diagnóstico recomendado para la DFEH	182
Figura 57. Flujo de trabajo para el diagnóstico de un paciente con un fenotipo típico de DFEH	183
Figura 58. Algoritmo diagnóstico para la confirmación de la DFEH	184
Figura 59. Algoritmo diagnóstico (original)	185
Figura 60. Diferentes aproximaciones para un tratamiento dirigido en la DFEH	186
Figura 61. Estudio prenatal de DFEH1 con un evento de recombinación en el individuo II:3	242

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades dentro del diagnóstico diferencial de la DFEH	23
Tabla 2. Correlación del número de repeticiones con el tamaño del fragmento en kb	90
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar los exones de VCP y condiciones de PCR	103
Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar los exones de FHL1 y condiciones de PCR ...	104
Tabla 5. Distribución de la edad de los pacientes en el momento del estudio genético (por sexos)	109
Tabla 6. Procedencia de las muestras enviadas para el estudio de DFEH	110
Tabla 7. Síntomas de inicio en la DFEH1	111
Tabla 8. Síntomas de inicio en la DFEH2	111
Tabla 9. Edad de inicio en 3 generaciones de 18 familias con DFEH1	114
Tabla 10. Escala de GMW en 2 generaciones de 10 familias con DFEH1	115

Tabla 11. Distribución del tamaño del fragmento <i>EcoRI</i> en nuestra serie de pacientes	117
Tabla 12. Distribución de nuestra serie de pacientes en No DFEH, DFEH1 (zona gris), DFEH1 confirmados	117
Tabla 13. Distribución de los pacientes DFEH1 en función de los tamaños de fragmento <i>EcoRI</i>	118
Tabla 14. Distribución de los pacientes DFEH1 en función de los tamaños de fragmento <i>EcoRI</i> diferenciados por sexos	119
Tabla 15. Transmisiones de origen materno y paterno en casos familiares de DFEH1	120
Tabla 16. Patrón de transmisión del fragmento por rango de tamaños de fragmento	121
Tabla 17. Edad de inicio en los rangos de tamaño de fragmento en los distintos patrones de transmisión del fragmento	121
Tabla 18. Individuos asintomáticos portadores de un fragmento patológico	124
Tabla 19. Individuos en los casos familiares portadores de un fragmento en la zona gris	125
Tabla 20. Distribución de la variante A/B para los alelos del # 4 y # 10 en pacientes No DFEH	125
Tabla 21. Distribución de la variante A/B para los alelos del # 4 y # 10 en pacientes DFEH1 en la zona gris	126
Tabla 22. Distribución de la variante A/B para los alelos del # 4 y # 10 en pacientes DFEH1	126
Tabla 23. Distribución de alelos del # 4 en los individuos No DFEH1 (izda) y DFEH1 (dcha)	129
Tabla 24. Distribución de alelos del # 10 en los individuos No DFEH1 (izda) y DFEH1 (dcha)	130
Tabla 25. Distribución de los alelos del # 4 y # 10 en los individuos No DFEH1 (izda) y DFEH1 (dcha)	131
Tabla 26. Combinaciones de haplotipos más frecuentes de los alelos del # 4 y # 10 en los individuos No DFEH1 y DFEH1	132
Tabla 27. Porcentaje de reordenamientos subteloméricos del # 10 en el # 4 y viceversa en nuestra población	135
Tabla 28. Mosaicos detectados en nuestra serie de pacientes	137
Tabla 29. Sintomatología y tamaño de fragmento dentro de los casos mosaico	138
Tabla 30. Casos de heterocigotos compuestos en nuestra serie	141
Tabla 31. Fragmentos del # 10 menores de 38 kb en nuestra serie de pacientes No	

DFEH y DFEH1	143
Tabla 32. Resultados de los prenatales realizados de DFEH1	144
Tabla 33. Pacientes DFEH2 y DFEH1+DFEH2 en nuestra serie	150
Tabla 34. Estudio de metilación en pacientes No DFEH, en pacientes en la zona gris (no DFEH1+DFEH2) y en pacientes DFEH1	152
Tabla 35. Procedencia de las muestras estudiadas para VCP a nivel nacional e internacional	153
Tabla 36. Función de las distintas digestiones en el diagnóstico molecular de la DFEH	163
Tabla 37. Combinaciones más prevalentes de la variante A y del haplotipo SSLP en los pacientes DFEH1	168
Tabla 38. Mutaciones identificadas en SMCHD1 y DNT3B en nuestra serie, porcentaje de metilación asociado, tamaño de los fragmentos EcoRI de los alelos del # 4	244
Tabla 39. Mutaciones identificadas en SMCHD1 y DNMT3B en nuestra serie (cambios descritos y predicciones in silico de cambios no descritos en la literatura) y porcentaje de metilación asociado	248
Tabla 40. Mutaciones identificadas en VCP en nuestra serie (cambios descritos y predicciones in silico de cambios no descritos en la literatura)	254

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

"	Segundo
#	Cromosoma
'	Minuto
∞	Infinito
α ³² -dCTP	Alfa-P32, Desoxicitidina 5"-trifosfato
Ac	Acetilación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín Difosfato
AF	Antecedentes familiares
ALP (PDLIM3)	<i>Actinin-associated LIM protein</i>
ANT1	<i>Adenine Nucleotide Transporter 1 Gene</i>
aprox	Aproximadamente
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNds	ARN bicatenario (<i>double-stranded</i>)
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNmi	ARN micro, ARN pequeño no codificante
ARNsh	ARN de horquilla pequeña (<i>short hairpin</i>)
ARNsi	ARN pequeño de transferencia o ARN de silenciamiento (<i>small intertering</i>)
ARNr	ARN ribosómico
AT	Adenina y timina
ATP	Adenosín Trifosfato
BAMS	<i>Bosma arhinia microphthalmia syndrome</i>
BLAST	Programa informático de alineamiento local básico de secuencias (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAF1	<i>Chromatin assembly factor 1</i>
CBP	<i>cAMP response element-Binding Protein (CREB) binding protein</i>
cen	Centrómero
cM	Centimorgan
ClinVar	Archivo público de acceso libre sobre las relaciones entre las variantes genómicas y los fenotipos humanos (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)
cm	Centímetro

cols	Colaboradores
CPK	Proteína fosfoquinasa (<i>creatine phosphokinase</i>)
CRYM	<i>Crystallin, mu</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor (zinc finger protein)</i>
DFEH	Distrofia facio-escápulo-humeral
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>
dNTPs	Desoxinucleósido trifosfatos (<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>)
DTT	Ditiotreitol
DUX4	<i>Double homeobox 4</i>
DUX4c	<i>Double homeobox protein 4-like protein</i>
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMG	Electromiograma
EST	Marcador de secuencia expresada (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FHL1	<i>Four and a half LIM protein 1</i>
FRG1	<i>FSHD Region Gene 1</i>
FRG2	<i>FSHD Region Gene 2</i>
FSHD	<i>Facioscapulohumeral muscular dystrophy</i>
GC	Guanina y citosina
GMW	Escala de Gardner-Medwin-Walton
Gr	Gramo
h	Hora
HA	<i>Hyaluronic acid</i>
H ₂ O	Agua
H3Ac	Acetilación de la histona 3
H3K12me3	Trimetilación de la histona 3 en la lisina 12
H3K27me3	Trimetilación de la histona 3 en la lisina 27
H3K4me2	Dimetilación de la histona 3 en la lisina 4
H3K9	Histona 3, residuo Lisina 9
H3K9me3	Trimetilación de la histona H3 en la lisina 9
HCl	Ácido clorhídrico
HGMD	<i>Human Genome Mutation Database</i> (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)
HMGB2	<i>High-mobility group protein B2</i>

HP1	Proteína heterocromática 1 (<i>Heterochromatin Protein 1</i>)
IBMPFTD	Miopatía de cuerpos de inclusion, enfermedad de Paget y demencia frontotemporal (<i>Inclusion body myopathy-IBM-, Paget disease of bone –PDB- and frontotemporal dementia –FTD-</i>)
kb	Kilobase
LGE	Electroforesis horizontal estándar (<i>Linear Gel Electrophoresis</i>)
LGMD1A	Distrofia muscular de cinturas secundaria a mutaciones en el gen de miotilina (<i>Limb-girdle muscular dystrophy 1A</i>)
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i> (ARN largo no codificante)
LOVD	<i>Leiden Open Variation Database</i> (https://databases.lovd.nl/shared/genes)
LRIF1	<i>Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1</i>
LRP2BP	<i>LRP2 binding protein</i>
M	Molar
MBD	Dominio de unión al grupo metilo (<i>Metil Binding Domain</i>)
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMII	Miembros inferiores
MMSS	Miembros superiores
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
nt	Nucleótido
NuRD	<i>Nucleosome remodeling deacetylase</i>
O/N	Durante toda la noche (<i>Overnight</i>)
°C	Grado Celsius
ORF	Marco de lectura abierta (<i>Open reading frame</i>)
P32	Fósforo 32
pb	Pares de bases
PBLs	Linfocitos de sangre periférica (<i>Peripheral blood lymphocytes</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)

PFGE	Electroforesis de campo pulsante (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
PITX1	<i>Pituitary homeobox 1</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PRC2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
RAGE	Receptor para compuestos de glicosilación avanzada
RBM	Miopatía con cuerpos reductores (<i>Reducing body myopathy</i>)
RdDM	Metilación del ADN dirigida por ARN (<i>RNA-directed DNA Methylation</i>)
RFLPs	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RU	Unidad de repetición (Repeat Unit)
SDS	Sulfato de dodecil sódico (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
SE	Tampón que contiene NaCl y EDTA
sg	Segundo
SMCHD1	<i>Structural Maintenance Of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSC	Citrato de sodio (<i>Sodium citrate</i>)
SSLP	<i>Simple Sequence Length Polymorphism</i>
SUV39H1	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)</i> o <i>Histone H3-K9 methyltransferase 1</i>
TA	Temperatura ambiente
TAD	<i>Topologically associated chromatin domain</i>
TAE	Tampón que contiene Tris, ácido acético y EDTA (<i>Tris/Acetic acid/EDTA</i>)
TBE	Tampón que contiene Tris, ácido bórico y EDTA (<i>Tris/Borate/EDTA</i>)
TD	Programa de PCR "Touch Down"
TRIM43	<i>Tripartite Motif Containing 43</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TUBB4Q	<i>Tubulin, beta polypeptide 4, member Q</i>
V	Voltio
VCP	Proteína que codifica el gen valosina (<i>Valosin-containing protein</i>)
VNTR	Elemento polimórfico de repetición de número variable (<i>Variable Number Tandem Repeat</i>)
YY1	Represor transcripcional perteneciente a la clase GLI-Kruppel de proteínas con dedos de zinc
μl	Microlitro
ZSCAN4	Zinc finger and SCAN domain containing 4

RESUMEN

La distrofia facioescapulohumeral (DFEH1, OMIM 158900) es la tercera enfermedad neuromuscular más común, después de la distrofia de Duchenne y de la distrofia miotónica, (Padberg, 1982) cuya prevalencia se estima en 1:20.000 habitantes.

El patrón de debilidad muscular es bastante característico y afecta a la musculatura facial y a los músculos fijadores de la escápula, con un grado de afectación variable de la musculatura de brazos, tronco y extremidades inferiores (Fitzsimons y cols., 1999). Esta afectación es en general muy asimétrica y éste es un rasgo distintivo muy útil para diferenciarla de otros síndromes escapulohumerales o escapuloperoneales. El síntoma inicial más común es la dificultad para levantar los brazos por encima de la horizontal que aparece generalmente en la adolescencia o en los adultos jóvenes.

La DFEH1 es una enfermedad que se hereda de forma autosómico dominante y que presenta una alta penetrancia, con más de un 95% de individuos portadores del defecto genético mostrando síntomas de la enfermedad a los 20 años (Lunt PW y cols., 2000). El comienzo de la enfermedad y la expresión fenotípica es extremadamente variable, tanto intra como interfamiliar (Lunt PW y cols., 1995; Padberg GW y cols., 1995b) y existen un 10-30% de casos esporádicos. Estos pacientes sufren una delección del número de repeticiones en tándem denominadas D4Z4 de 3,3 kilobases (kb) dentro de un fragmento polimórfico *EcoRI* localizado en el locus 4q35. Un individuo control tiene más de 10 repeticiones o 38 kb y un individuo con DFEH1 tiene menos de 10 repeticiones o 38 kb (Wimpenja C y cols., 1992). Dentro de cada una de las repeticiones se encuentra un gen denominado DUX4 que en estado adulto se encuentra reprimido. Cuando esta delección de repeticiones se da en un entorno cromosómico “permissivo”, se produce hipometilación en esa región y el gen DUX4 de la última de las repeticiones se estabiliza y se transcribe siendo esto tóxico para el músculo (Lemmers RJ y cols., 2010).

Existe un 5% de pacientes clínicamente indistinguibles de los DFEH1 que son independientes de la contracción de repeticiones. En estos pacientes se producen mutaciones en genes modificadores de la cromatina que se encuentran reprimiendo físicamente el locus 4q35, aunque uno se encuentre en el cromosoma 18 (SMCHD1), otro en el cromosoma 20 (DNMT3B) y otro en el cromosoma 1 (LRF1), su función represora falla, se produce una hipometilación mucho más marcada que en los DFEH1, cuya consecuencia es la misma, la expresión del gen DUX4.

En el locus 10q26 existe un fragmento polimórfico *EcoRI* que es homólogo en un 98% al del locus 4q35 pero que no es patológico. A la hora del diagnóstico molecular este hecho y la misma patofisiología peculiar de la enfermedad nos plantea una serie de problemas técnicos que debemos solventar (fragmentos homogéneos translocados entre 4q35 y 10q26, fragmentos híbridos, mosaicismo, deleción de la región de la sonda utilizada en el diagnóstico, individuos con fragmentos próximos al límite patológico, etc).

Llevamos 20 años siendo centro de referencia en España para el diagnóstico clínico, pero sobre todo molecular de este tipo de distrofia muscular. A lo largo de este tiempo hemos estudiado una serie muy amplia de pacientes (más de 4.000) por lo que el objetivo de esta tesis ha sido revisar los avances que se han producido en el diagnóstico molecular de la DFEH a lo largo de estos 20 años y de paso revisar las características clínicas y moleculares en una muestra extensa de base poblacional.

INTRODUCCIÓN

1. Nota histórica, diagnóstico diferencial y delimitación clínico-nosológica.

Hacia finales del siglo XIX los neurólogos comenzaron a individualizar una serie de entidades nosológicas dentro de las miopatías, en las que la atrofia y la debilidad muscular eran características comunes siendo la distribución de ésta, la cronopatología y el patrón de herencia, los rasgos diferenciales entre ellas.

En 1868 Duchenne de Boulogne recogió en su *“Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique”* el caso de un hombre con un síndrome facioescapulohumeral severo, que representó la primera descripción de la distrofia facioescapulohumeral (DFEH) en la literatura médica, aunque no pudo individualizar esta entidad de otras distrofias musculares. (Figura 1)

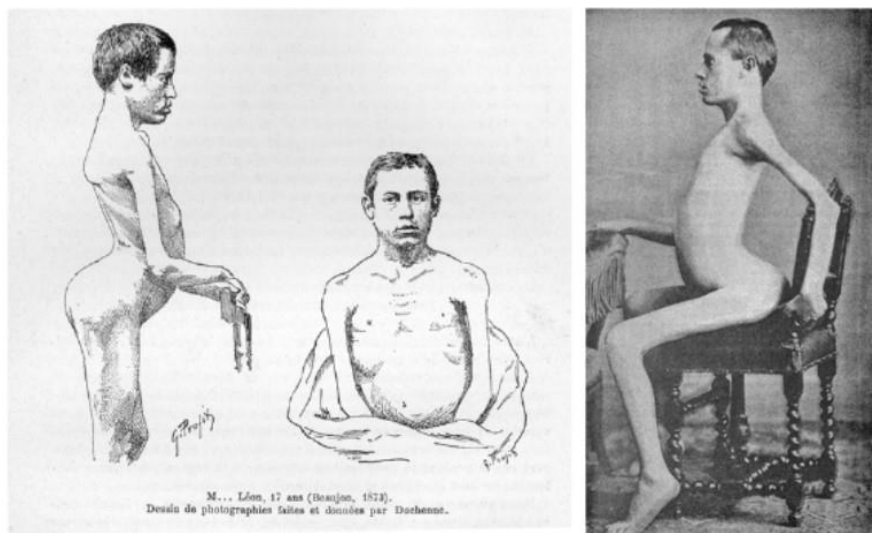


Figura 1. Paciente con DFEH dibujado por Duchenne de Boulogne (izda) y foto del paciente (dcha). (Ilustración tomada de Mikol J., 2011)

Mientras Duchenne se centró en los casos de distrofia con pseudohipertrofia individualizando la entidad que lleva su nombre y que se corresponden con las distrofinopatías graves, otros dos neurólogos franceses, **Louis Landouzy** y **Joseph Jules Déjérine** (Figura 2), presentaron en 1884 ante la Academia de las Ciencias de Paris, sus observaciones *“de la myopathie atrophique progressive, myopathie hereditaire debutant dans l’enfance par la face, sans alteration du systeme nerveux”*.

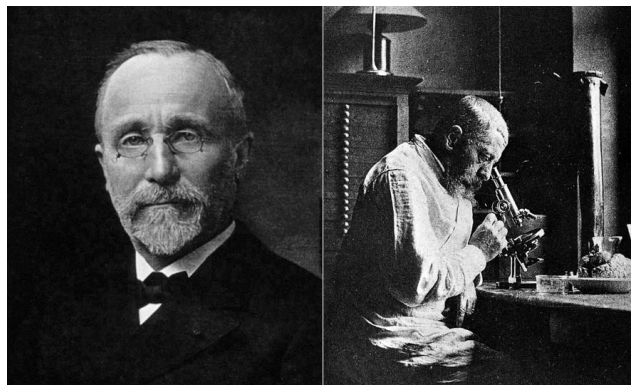


Figura 2. Louis Landouzy –izda- (tomada de https://en.wikipedia.org/wiki/Louis_Théophile_Joseph_Landouzy) y Joseph Jules Déjérine –dcha- (tomada de https://es.wikipedia.org/wiki/Joseph_Jules_Dejerine).

En este trabajo, los autores reconocieron las características claves de la DFEH: una pérdida muscular progresiva, que empezando en la niñez afectaba a la musculatura facial, era hereditaria y cursaba sin aparente afectación del sistema nervioso. Unos años antes, en 1874, Landouzy había publicado un informe preliminar en *Memoires de la Société de Biologie*, que fue seguido por una investigación más extensa finalmente publicada con Déjérine en 1885. En esta última publicación, Landouzy y Déjérine expusieron que “*la atrofia de los músculos de la cara comienza a los 3 años de edad, provocando una facies característica*”, en la que observaban como “*desde la edad de los 18 años poco a poco la atrofia alcanza las extremidades superiores, y después los demás músculos del cuerpo... no existiendo parálisis ni trastorno de naturaleza sensorial*”.

Determinaron la naturaleza hereditaria autosómica dominante de la DFEH al comprobar que el padre, el hermano y la hermana del caso propositus estaban afectados. También ilustraron la variabilidad clínica intrafamiliar característica de la DFEH al apreciar que sólo el padre, el hermano y la hermana tenían afectación facial. El estudio histológico mostró “*una atrofia simple de los músculos fasciculares primarios*” con los “*nervios intramusculares completamente normales, incluyendo nervios del músculo de la cara y de las extremidades, igualmente como los de las extremidades anteriores y del tronco facial*”. Esta presentación bastante breve contenía todos los elementos claves de la DFEH, por lo que esta entidad ha recibido durante mucho tiempo y con todo merecimiento el epónimo de ambos autores como sinónimo de DFEH.

Los casos infantiles de DFEH, generalmente esporádicos, fueron atribuidos a una variante recesiva de la enfermedad (Small RG, 1968; Hanson PA y Rowland LP, 1971; Brooke MH, 1977) hasta que los estudios moleculares posibles a partir de 1990 pusieron de manifiesto que eran casos *de novo* con la misma patología molecular subyacente que las formas clásicas de DFEH (Padberg GW y cols., 1995; Upadhyaya M y cols., 1995).

Diagnóstico Diferencial

Además de los cuadros típicos con afectación facial, se han ido acumulando casos familiares y esporádicos sin afectación facial y con una afectación acompañante en miembros inferiores que se agrupan dentro de los **síndromes escapulohumerales**; con un sustrato electromiográfico neurógeno en unos casos, en otros miogénico, y en otros con un patrón mixto de difícil interpretación.

El predominio de las formas miopáticas o distróficas dentro de los síndromes escapulohumerales fue establecida por Kazakov VM y cols. (1975) y poco después por Padberg GW (1982), cuyo trabajo clínico contribuyó a fijar las características clínicas de la DFEH.

Los síndromes escapuloperoneales, la **distrofia escapuloperoneal** (SPM; OMIM 181430) y la **distrofia muscular espinal escapuloperoneal** (SPSMA; OMIM 181405) tienen una presentación clínica similar a la DFEH, pero sin debilidad facial evidente.

Algunas de estas descripciones como la de Kaeser HE (1965) se correspondían con formas familiares transmitidas con herencia autosómico dominante de atrofia de distribución escapulohumeral. Se pudo confirmar que una parte de estos cuadros escapulohumerales de origen miopático se debían a una mutación recurrente en el gen DES (**Miopatía miofibrilar 1**, SCPNK; OMIM 181400) y que se caracterizan con una gran variabilidad fenotípica intrafamiliar con afectación variable de la musculatura facial o de las cinturas, así como degeneración miofibrilar en la biopsia muscular (Walter MC y cols., 2007).

Otros síndromes escapulohumerales con herencia dominante se asocian a una miopatía hialina, aunque en algunos casos estas inclusiones hialinas se corresponden con depósitos granulares que se tiñen con anticuerpos frente a la cadena de miosina lenta y antidesmina (Masuzugawa S y cols., 1997) o se trata de depósitos localizados a nivel centronuclear de algunas fibras que se tiñen con el tricrómico, anticuerpos antidesmina y antidistrofina (Wilhelmsen KC y cols., 1996) . Algunas de estas familias presentaron un ligamiento inicial con el cromosoma 12 (Isozumi K y cols., 1996; Wilhelmsen KC y cols., 1996), pero análisis posteriores demostraron la exclusión de esta región en estas familias cuyo debut clínico y patrón de debilidad eran diferentes a la DFEH clásica (Tim RW y cols., 2001).

En 2008, Quinzii C y cols. ampliaron el estudio anterior (Wilhelmsen KC y cols., 1996) en una familia con afectación escapuloperoneal y localizaron una mutación en el gen FHL1 (*four and a half LIM protein 1*) localizado en el cromosoma Xq26 como causante de este fenotipo (SPM; OMIM 300695). Posteriormente se han identificado más de 25 mutaciones diferentes en este gen como responsables de cuatro enfermedades distintas del músculo

esquelético (Cowling BS y cols., 2011): **miopatía con cuerpos reductores** (*Reducing body myopathy –RBM-*) (Schessl J y cols., 2008, 2009, 2010; Shalaby S y cols., 2009) (RBMX1B; OMIM 300718), **miopatía ligada al cromosoma X** (*X-linked myopathy –XMPMA-*) (Windpassinger C y cols., 2008; Chen DH y cols., 2010) (XMPMA; OMIM 300696), **miopatía escapulooperoneal** (*scapulooperoneal myopathy –SPM-*) (Quinzii CM y cols., 2008; Chen DH y cols., 2010) y **distrofia muscular Emery-Dreifuss** (*Emery–Dreifuss muscular dystrophy –EDMD-*) (Gueneau L y cols., 2009) (EDMD6; OMIM 300696).

Otros autores describieron síndromes escapulo-humerales asociados a diferentes condiciones como la enfermedad de Paget (McBride TI, 1966; Tucker WSJ y cols., 1982, Le Ber I y cols., 2004) y cuyo correlato patológico es una miopatía con cuerpos de inclusión ubiquitina-positivos tubulofilamentosos que se transmite con herencia dominante. La asociación de la enfermedad de Paget con otras enfermedades neuromusculares como la distrofia muscular no específica (McBride TI, 1966), la distrofia miotónica (Caughey JE y cols., 1957), o la esclerosis lateral amiotrófica (Tucker WSJ y cols., 1982), ya era conocida, pero mientras en esos casos puede considerarse circunstancial dada la frecuencia de la enfermedad de Paget en la población general, en las familias con síndrome escapulo-humeral y enfermedad de Paget se pudo determinar que ambos rasgos cosegregaban y ligaban con la región cromosómica 9p13.3-p12.

En 2004, Watts GD y cols., estudiando 13 familias con **IBMPFTD** (*Inclusion Body Myopathy –IBM-, Paget disease of bone –PDB- and Frontotemporal Dementia –FTD-*) (OMIM 167320) o miopatía hereditaria de cuerpos de inclusión (IBM) asociada con la enfermedad de Paget (PDB) y demencia frontotemporal (DFT), localizaron 6 mutaciones en el gen que codifica para VCP (*valosin-containing protein*) que segregaban con los individuos afectados de esas familias, estructurando un síndrome clínico que incluía además un subtipo de demencia frontotemporal caracterizada por inclusiones ubiquitina-positivas conteniendo la proteína TDP-43 y que se presenta en el 32% de los pacientes (Watts GD y cols., 2004). Posteriormente se han descrito nuevas mutaciones en el gen VCP (Watts GD y cols., 2004; Haubenberger D y cols., 2005; Schroder R y cols., 2005; Guyant-Marechal L y cols., 2006; Watts GD y cols., 2007; Bersano A y cols., 2009; Stojkovic T y cols., 2009; Peyer AK y cols., 2013). Por tanto, el síndrome IBMPFD es un desorden autosómico dominante relacionado con mutaciones en el gen VCP y en algunos pacientes con este síndrome se da un fenotipo similar a la DFEH, con debilidad muscular proximal de los músculos de las extremidades con debilidad distal o escápulas aladas (Kovach MJ y cols., 2001).

Otro tipo de miopatía de topografía proximal que puede recordar un síndrome escapulohumeral y se transmite con herencia dominante es la distrofia muscular secundaria a mutaciones en el gen MYOT (miotilina) localizado en 5p31.2 (**Miopatía miofibrilar 3**, LGMD1A; OMIM609200) (Hauser MA y cols., 2000).

Otras entidades que pudieran compartir una clínica similar a la DFEH y que se encuadran dentro del diagnóstico diferencial de esta enfermedad y que hay que valorar además de las que hemos comentado anteriormente son, la **distrofia de cinturas tipo 2A** con mutaciones en el gen CAPN3 (calpaína) localizado en 15q15.1 (LGMDR1; OMIM 253600) y la **enfermedad de Pompe del adulto** con mutaciones en el gen GAA (deficiencia de maltasa ácida), localizado en 17q25.3 (OMIM 232300), ambas con herencia autosómico recesiva.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA DFEH
Síndromes escapuloperoneales y síndrome escapulohumeral: <ul style="list-style-type: none"> - Distrofia escapuloperoneal (SPM; OMIM 181430) - Distrofia muscular espinal escapuloperoneal (SPSMA; OMIM 181405) - Síndrome escapuloperoneal neurógeno, tipo Kaeser (SCPNK; OMIM 181400) - Miopatía miofibrilar 1 (MFM1; OMIM 601419) - Miopatía miofibrilar 3 (MFM3 -LGMD1A-; OMIM609200) - Miopatía con cuerpos reductores (RBMX1B; OMIM 300718) - Miopatía ligada al cromosoma X (XMPMA; OMIM 300696) - Distrofia muscular Emery-Dreifuss (EDMD6; OMIM 300696)
Distrofia muscular de cinturas –calpaínas- (LGMDR1; OMIM 253600)
Distrofia miotónica tipo 1 y 2
Glucogenosis juvenil y en edad adulta por deficiencia de maltasa ácida (Enfermedad de Pompe)
Miopatía de cuerpos de inclusión con enfermedad ósea de Paget y demencia frontotemporal (IBMPFTD)
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)
Miopatías congénitas (nemalínica)
Miopatías mitocondriales
Dermatomiositis / polimiositis
Miopatías endocrinas hereditarias
Neuropatías proximales
Polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
Síndrome de Moebius

Tabla 1. Enfermedades dentro del diagnóstico diferencial de la DFEH.

Delimitación clínico-nosológica

Más allá de esta revisión nosológica, la DFEH podría definirse desde un punto de vista clínico como un trastorno mayoritariamente muscular, que se transmite de forma autosómica dominante caracterizado por una debilidad progresiva de los músculos, que incluye atrofia de los músculos de la cara, de la parte superior de los brazos y de la cintura escapular (Fitzsimons RB, 1999). La afectación es en general muy asimétrica y éste es un rasgo distintivo útil para diferenciarla de otros síndromes escapulohumerales o escapuloperoneales (Tawil R y cols., 2014). La debilidad general de la musculatura y la atrofia pueden incluir eventualmente la musculatura de la cintura pélvica, la musculatura abdominal y el extensor del pie (Upadhyaya M y Cooper DN, 2002; Padberg PW, 2004). (Figura 3 y Figura 4)

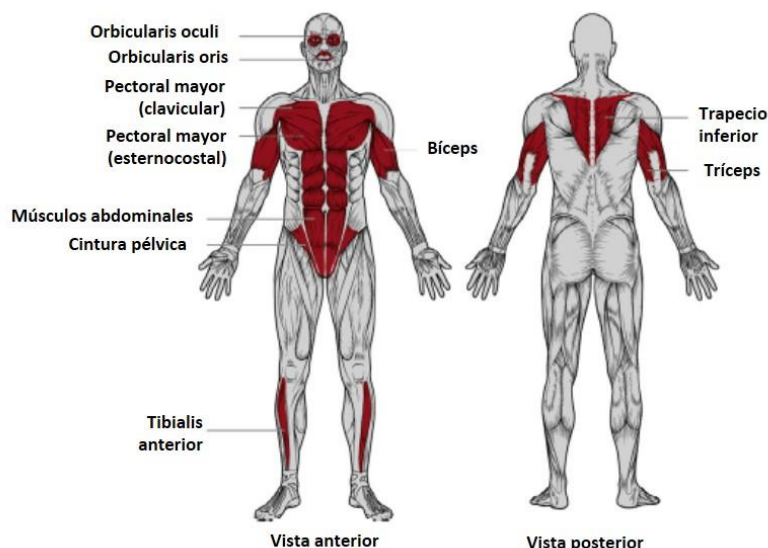


Figura 3. Músculos afectados en la DFEH (ilustración modificada de Lek A y cols., 2015).

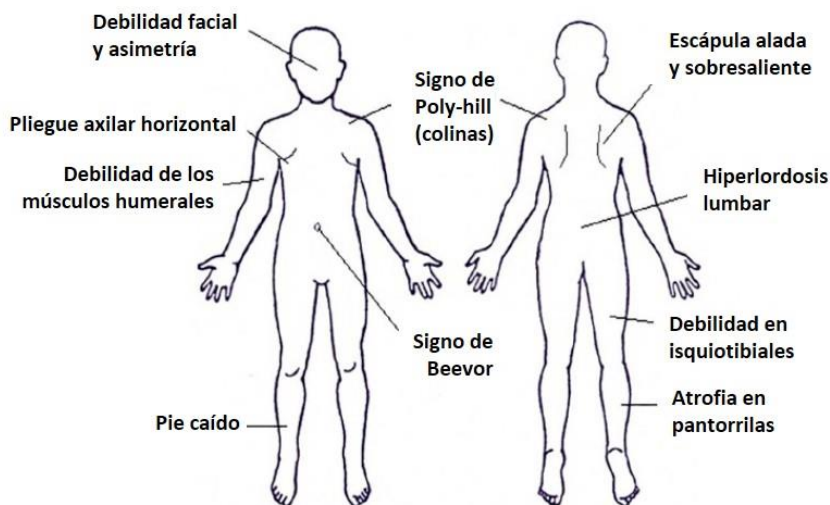


Figura 4. Características clínicas de la DFEH (ilustración modificada de Mul K y cols., 2016).

La debilidad facial inicial a menudo pasa desapercibida, siendo los problemas que se detectan primeramente en la adolescencia o en adultos jóvenes los que afectan a la musculatura escapular (fijadores de la escápula y deltoides), cuando los pacientes experimentan dificultad al elevar sus brazos por encima de la horizontal. En ese momento se pone de manifiesto en la exploración una escápula alada generalmente asimétrica. El bíceps y el tríceps están involucrados de manera selectiva, produciendo una atrofia de la parte superior del brazo y una disminución de los músculos del antebrazo, dando una semejanza a los “brazos de Popeye”. El *pectum excavatum* se puede encontrar entre el 5-16% de los casos y ocasionalmente puede ser muy llamativo (Padberg PW, 1982). (Figura 5)



Figura 5. En la imagen se puede apreciar una pérdida de músculos pectorales, humeral (brazo de Popeye) y de la cintura escapular (Imagen tomada de Mul K y cols., 2016).

La exploración también pone de manifiesto una debilidad facial de los músculos faciales (orbiculares de los párpados y de la musculatura peribuca) que generalmente ha pasado desapercibida para el paciente y que es más pronunciada en los músculos inferiores (con una sonrisa invertida o boca de “tapir”) que en los superiores (Figura 6). La musculatura ocular extrínseca y la bulbar están preservadas, pero a pesar de ello, la debilidad facial presenta un problema para los pacientes ya que disminuye en gran medida su expresividad facial.



Figura 6. La debilidad del músculo *orbicularis oculi* resulta en dificultad o incapacidad para cerrar ambos ojos (A) y un “signe de cils” (C). (B) La boca es asimétrica en su posición de reposo. (D) La debilidad del orbicular de la boca provoca dificultad para fruncir los labios (D) (Imagen tomada de Mul K y cols., 2016).

La musculatura abdominal también se ve afectada produciendo una protrusión abdominal típica que produce secundariamente una lordosis lumbar exagerada (hiperlordosis). Los músculos abdominales inferiores están involucrados selectivamente, lo que da como resultado el signo de Beevor (desplazamiento hacia arriba del ombligo al flexionarse el cuello en posición supina). (Figura 7)



Figura 7. Atrofia del músculo pectoral mayor, pliegue axilar anterior horizontal y protrusión abdominal asimétrica (izda). Escápula alada marcada en flexión o abducción activa del hombro (dcha). (Imagen tomada de Pandya S y cols., 2008).



La enfermedad puede afectar también a la musculatura pélvica produciendo debilidad para caminar, así como a la musculatura distal de los miembros inferiores (afectación peroneal) y dorsiflexores del pie lo que provoca su caída y puede dar lugar a un estepaje uni o bilateral (Orrel RW 2011). (Figura 8)

Figura 8. En la imagen se puede apreciar debilidad de los músculos de las piernas en un paciente con DFEH (Imagen tomada de Orrell R 2011).

La progresión de la enfermedad suele ser relativamente lenta, con individuos afectados que experimentan periodos de remisión bastante largos intercalados de periodos de deterioro muscular repentino acompañado de dolor. A pesar de que la progresión es muy variable con casos ambulantes más allá de los 70 años y otros que pierden la capacidad de andar a los 20 años, en general la DFEH sólo causa discapacidad grave (necesidad de silla de ruedas) en el 15-20% de los individuos afectados.

Las manifestaciones extramusculares más frecuentes son la hipoacusia (Fitzsimons RB y cols., 1987; Padberg GW y cols., 1995), y las telangiectasias retinianas (generalmente subclínicas) en el 75 y el 60% de los casos, respectivamente (Fitzsimons RB 2011). En casos más graves, las anomalías en la vascularización retiniana pueden provocar exudados y un desprendimiento (síndrome de Coats) (Statland JM y cols., 2013).

Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes incluyen la insuficiencia respiratoria (Wohlgemuth M y cols., 2006; Moreira S y cols., 2017) y defectos en la conducción cardíaca que suelen ocurrir en un 5% de los casos y se limita a arritmias atriales que raramente precisan tratamiento (Laforêt P y cols., 1998; Pietro Trevisan C y cols., 2006). Algunos pacientes tienen alteraciones en la morfología de la arteria basilar (dolicoectasia). El retraso mental y la epilepsia se han comunicado de forma anecdótica (Funakoshi M y cols., 1998; Saito Y y cols., 2007), pero a favor de una afectación sutil en el SNC se han hallado pruebas de un menor rendimiento cognitivo en pacientes con mayor defecto molecular (Sistiaga A y cols., 2009). El dolor crónico es una queja frecuente con una prevalencia tan alta como el 77% (Bushby KM y cols., 1998; Jensen MP y cols., 2008).

La edad media de aparición de la enfermedad suele ser entre los 10-20 años aunque un 5% de los pacientes presenta una aparición precoz de la enfermedad antes de los 10 años, que está asociada normalmente con el desarrollo de las formas más graves con una significativa debilidad facial (Lunt PW y cols., 1995 Hum Mol Genet; Padberg GW y cols., 1995) y que se corresponde con casos generalmente esporádicos secundarios a mutaciones *de novo*. La mayoría de los pacientes sólo desarrollan los síntomas más tarde, durante la segunda y la tercera década de vida (Lunt PW y cols., 1989).

Nota epidemiológica

La DFEH tipo 1 (FSHD1, OMIM 158900) es la tercera enfermedad neuromuscular más común, después de la distrofia de Duchenne y la distrofia miotónica tipo 1 con una incidencia comunicada en Holanda de 5 casos/10⁵ habitantes (Padberg GW, 1982) aunque su prevalencia puede estar infraestimada. En un estudio realizado hace casi 20 años que recoge la prevalencia de la enfermedad a lo largo del mundo, esta oscilaba entre 0.2 y 6.69 casos/10⁵ habitantes (Emery AE, 1991).

Estudios más recientes arrojan una prevalencia de 3.95 casos/10⁵ habitantes en el Norte de Inglaterra (Norwood FL y cols., 2009), de 4.4 casos/10⁵ habitantes en Padua, Italia (Mostacciolo ML y cols., 2009), o de 12 casos/10⁵ habitantes en Holanda (Deenen JCW y cols., 2014).

Hasta la fecha no se ha realizado un estudio epidemiológico que nos permita tener una idea de la epidemiología de esta enfermedad en nuestro país.

Una limitación metodológica de los estudios epidemiológicos es la diversidad de procedimientos de selección de los casos, bien a través de los rasgos clínicos o a través de los estudios moleculares.

2. *Genética de la distrofia facioescapulohumeral*

2.1. *Introducción*

En la década de los 90 del siglo pasado se consiguió caracterizar el sustrato molecular de la DFEH, lo que supuso un hito en el conocimiento de la enfermedad, uniéndose a la revolución que la genética molecular estaba provocando en el campo de las distrofias musculares a nivel de diagnóstico y de nosología.

Se confirmó que la gran mayoría de los pacientes (hasta un 95%) presentaban un ligamiento con la región cromosómica 4q35 en la que se encuentra un fragmento polimórfico denominado *EcoRI* compuesto por unidades que se repiten en tándem de 3,3 kilobases (kb) cada una, denominadas D4Z4. Estas repeticiones en población control se repiten más de 10 veces (con un tamaño mayor a las 38 kb) mientras que en los pacientes este fragmento sufre una contracción y su tamaño pasa a tener menos de 10 repeticiones y por tanto menor a 38 Kb, y es lo que denominamos fragmento patológico. Este fue el inicio de la caracterización genética de la enfermedad, aunque como veremos más adelante, los mecanismos moleculares y genéticos causantes de la DFEH son realmente complejos. La DFEH causada por esta delección se ha pasado a denominar **DFEH1**.

Sin embargo, pese a tener una clínica indistinguible, existe un 5% de pacientes que no están ligados a ese fragmento delecionado (Wijmenga C y cols., 1991; Mathews KD y cols., 1992; Sarfarazi M y cols., 1992; Upadhyaya M y cols., 1992; Iqbal I y cols., 1992; Gilbert JR y cols., 1992, 1993, 1995; Bakker E y cols., 1995; Tim RW y cols., 2001; de Greef JC y cols., 2010), y que se designaron como DFEH tipo 2 cuando se estableció su sustrato molecular con mutaciones en el gen SMCHD1 en el 2012 (**DFEH2**) (FSHD2; OMIM 158901) (Lemmers RJ y cols., Nat Genet 2012), o con mutaciones en el gen DNMT3B (van den Boogaard ML y cols., 2016) o con mutaciones en el gen LRIF1 (Hamanaka K y cols., 2020).

2.2. Caracterización molecular de la delección en la DFEH1

A inicios de la década de los 90, Wijmenga C y cols. (1990, 1991) utilizando primero marcadores RFLP, y diez polimorfismos microsatélite, localizaron la región de ligamiento con la DFEH en el cromosoma 4 (# 4), siendo refinado por Upadhyaya M y cols. (1990), más concretamente en la región 4q (se encontró ligamiento entre el marcador D4S171 y la enfermedad).

Mediante análisis de ligamiento posteriores se refinó la región hasta caracterizar el locus de la DFEH (locus designado como DFEH1A) en la región cromosómica 4q35 (Mathews KD y cols., 1992; Sarfarazi M y cols., 1992; Upadhyaya M y cols., 1992), dentro de una region de 2-6 cM distal al grupo de ligamiento cen-D4S171-F11-D4S163-D4S139, pero no encontraron marcadores polimórficos en la zona distal al locus de la DFEH.

Después de un amplio subclonaje llevado a cabo por Wijmenga C y Hewitt JE, se aisló el clon tipo cósmido 13E, que se encontraba distal al resto de los clones anteriores y, por tanto, era la sonda más telomérica de la que se disponía para el estudio, **p13E-11** (Wijmenga C y cols., 1992). Esta sonda reconocía mediante diferentes enzimas de restricción y por Southern blot un fragmento polimórfico *EcoRI* que puede variar entre las 10 y 300 kb en el locus D4F104S1.

Tras el estudio de varias familias se confirmó que la gran mayoría de los pacientes (hasta un 95%) presentaban un ligamiento con la región cromosómica 4q35 y los individuos afectados portaban, en al menos uno de los alelos del # 4, un fragmento *EcoRI* delecionado con menos de 10 repeticiones en tándem D4Z4, que como ya se ha comentado es el defecto genético relacionado con la DFEH1. Para la detección molecular del fragmento polimórfico se utilizó la sonda p13E-11 tras una digestión del ADN con el enzima de restricción *EcoRI* y mediante Southern blot.

Esta sonda p13E-11 identifica una secuencia de copia única localizada inmediatamente en la zona proximal a este grupo de repeticiones D4Z4. El fragmento polimórfico *EcoRI* viene definido por dos sitios de restricción específicos *EcoRI*, uno de ellos localizado proximalmente a la secuencia homóloga de la sonda p13E-11 y el otro situado inmediatamente distal al grupo de repeticiones en tándem. Por lo tanto, la variación de tamaño observada en el locus D4F104S1 ligada a la enfermedad está causada por la pérdida de unidades individuales de D4Z4 y no incluye deleciones internas dentro del cuerpo de la repetición en sí misma (Hewitt JE y cols., 1994). (Figura 9).

Por lo tanto, los tamaños de los fragmentos vistos en los Southern blots que contienen ADN genómico de alto peso molecular digerido con *EcoRI* e hibridados con la sonda p13E-11,

en individuos control están comprendidos en un rango de tamaño de >38 kb hasta más de 300 kb (representa desde 11 a 150 repeticiones D4Z4) mientras que en pacientes DFEH, se encuentran en un rango de entre 10 a <38 kb (desde 1 a 10 repeticiones).

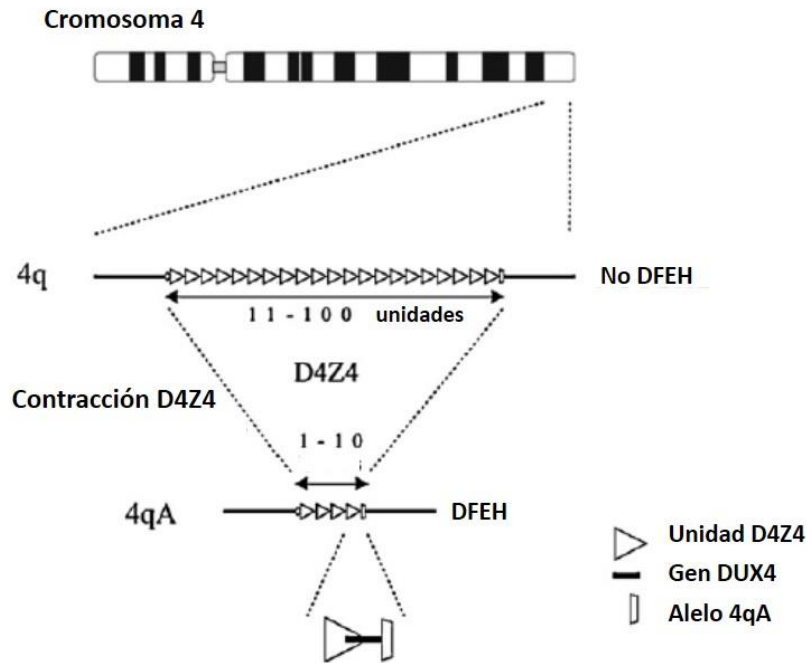


Figura 9. Defecto genético en la DFEH1 (Ilustración modificada de Attarian S y cols., 2012).

Si la posesión de un alelo D4F104S1 delecionado es suficiente para conferir el fenotipo de DFEH, entonces debemos inferir que la pérdida completa de uno de los alelos dará lugar a un fenotipo todavía más grave. Sin embargo, se han encontrado casos que portan deleciones pequeñas que incluyen específicamente la región 4q y, como resultado, son monosómicos para el locus D4F104S1 (4q35) y sorprendentemente, ninguno de estos individuos mostró ninguna evidencia de un desorden parecido a DFEH y son fenotípicamente normales (Tupler R y cols., 1996). Estos hallazgos indican que lo más probable es que la DFEH resulte de un mecanismo mutacional dominante negativo (una ganancia de función) más que de la pérdida total o parcial de un producto génico (haploinsuficiencia) dentro de la región 4q delecionada (Tupler R y cols., 1996). Estas observaciones sirvieron para enfocar de nuevo la búsqueda del gen DFEH dentro del mismo locus D4F104S1, y en particular dentro de las repeticiones D4Z4.

El análisis de estas repeticiones en tándem mostró que cada unidad repetida D4Z4 contenía dos dominios homeobox, que son idénticos en un 70% a nivel nucleotídico y que están contenidos dentro de una pauta de lectura abierta (ORF) (Hewitt JE y cols., 1994; Lee JH y cols., 1995).

Por lo tanto, se pensó que estas zonas podrían codificar para una proteína, sin embargo, su secuenciación no reveló ninguna mutación y los estudios de ARN sugirieron que esos genes estaban inactivos tanto en pacientes como en controles (Lyle R y cols., 1995; Gabriels J y cols., 1999).

En 2004 se identificó el gen funcional DUX4 (*Double Homeobox, Chromosome 4*) dentro de las mismas repeticiones D4Z4 (Belayew A y cols., 2004) pero no fue hasta el año 2007 en que pudieron confirmar la expresión del gen DUX4 tanto a nivel de ARNm como de proteína en mioblastos primarios de pacientes DFEH (Kowaljow V y cols., 2007; Dixit M y cols., 2007) y demostraron que la secuencia pLAM inmediatamente distal al grupo de repeticiones D4Z4 proporciona un intrón y una señal de poliadenilación (PAS) para que el ARNm del gen DUX4 del último elemento D4Z4 del grupo de repeticiones se transcriba (Dixit M y cols., 2007).

A pesar de haber identificado y asociado este fragmento polimórfico *EcoRI* a los pacientes con DFEH en 1993 (Wijmenga C y cols.), a lo largo de los años se han ido descubriendo otra serie de requerimientos complementarios para el desarrollo de la enfermedad y de algunas peculiaridades que hay que tener en cuenta porque pueden plantear problemas a la hora de realizar el diagnóstico molecular de la enfermedad.

2.2.1. Homología de la secuencia con la región 10q26

La unidad de repetición D4Z4 es un miembro de una gran familia de repeticiones en tándem de 3,3 kb localizadas en distintos *loci* en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, las regiones pericentroméricas (especialmente en el # 1), el # Y, y en las regiones teloméricas de los brazos largos de los cromosomas 4 y 10 (Hewitt JE y cols., 1994; Winokur ST y cols., 1994).

Concretamente en el # 10, en el locus 10q26, existe una región polimórfica reconocida por la sonda p13E-11 que es homóloga en un 98% a la región del # 4. El tamaño de los alelos 10q26 también varía entre 10 y 300 kb, y el 10% de esos alelos son más pequeños de 35 kb (Bakker E y cols., 1995, 1996). Cada unidad repetida tiene un tamaño de 3,3 kb y ha sido designada D4Z4, sin reparar en si la repetición está localizada dentro del grupo derivado de 4q35 o del derivado de 10q26. Un análisis detallado del locus 10q26 indica un ordenamiento similar de repeticiones en tándem de 3,3 kb y secuencias flanqueantes (Deidda G y cols., 1995). Sin embargo, fragmentos potencialmente patológicos (<38 kb) en el # 10 no están asociados con la DFEH o con otra enfermedad. La posible implicación de este locus, muy importante en el diagnóstico de la DFEH por su gran homología con 4q35, se estudió en un trabajo posterior en

las familias no ligadas a 4q, y fue excluido por análisis de ligamiento por diversos grupos (Bakker E y cols., 1995; Speer MC y cols., 1997).

La fiabilidad del diagnóstico molecular de la DFEH mejoró significativamente con la identificación de un único sitio de restricción para el enzima *BlnI* presente sólo en las repeticiones del # 10q26, permitiendo la discriminación entre los alelos 4q y 10q y visualizando en la doble digestión del ADN con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BlnI* solamente los fragmentos derivados del # 4 (fragmentos *BlnI*-resistentes) (Deidda G y cols., 1995, 1996). En apoyo a este sistema de diferenciación entre el # 4 y el 10, se ha visto que con el enzima de restricción *XapI* se digieren diferencialmente las repeticiones del # 4q35 visualizándose solamente los fragmentos derivados del # 10 (*BlnI*-sensibles) (Lemmers RJ y cols., 2001). (Figura 10). Actualmente está extendida la realización de la triple digestión en el estudio molecular de la DFEH1 (*EcoRI*, *EcoRI/BlnI*, *XapI*).

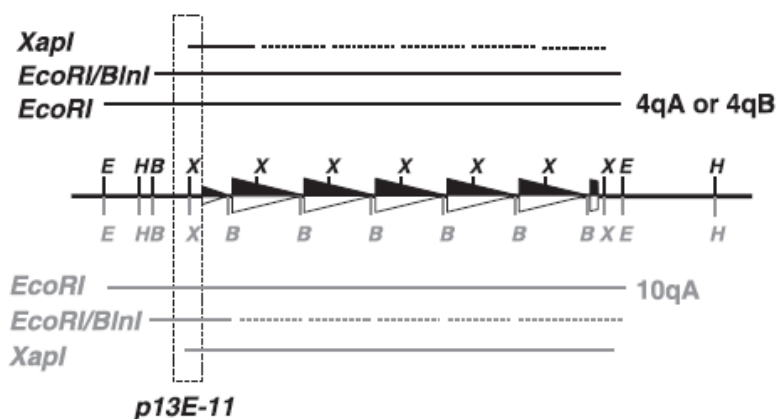


Figura 10. Triple análisis del ADN (Ilustración tomada de Lemmers RJ y cols., 2001)

2.2.2. Translocaciones de D4Z4 entre 4q35 y 10q26.

La situación más común es encontrarnos dos alelos del # 4 y dos alelos del # 10 (disomía). Sin embargo, se han observado eventos de recombinación entre los subtelómeros 4q y 10q. El alto grado de homología puede ser responsable de los intercambios intercromosómicos observados entre estos dos loci. Durante esos intercambios subteloméricos, grupos de repeticiones completos –homogéneos- (o bien de repeticiones D4Z4 *BlnI*-resistentes derivadas de 4q35, o de repeticiones *BlnI*-sensibles derivadas de 10q26) son transferidos de una localización cromosómica a la otra. En esos casos, los resultados del Southern blot indican la presencia de sólo un fragmento del # 4q35 (monosómicos, ya que todo el grupo de repeticiones de un alelo del # 4 se transloca al # 10) o de tres (trisómicos, ya

que el grupo de todas las repeticiones de un alelo del # 10 se transloca al # 4). También pueden darse los casos de nulisomía (ausencia de fragmento 4q35 ya que todas las repeticiones de los dos cromosomas 4 se translocan al # 10) o de tetrasomía (presencia de 4 fragmentos del # 4q35 porque los dos grupos de repeticiones del # 10 se translocan al # 4) (van Deutekom JCT y cols., 1996 *Hum Mol Genet*; van Overveld PG y cols., 2000). (Figura 11)

Estos intercambios subtelo méricos dinámicos no parecen estar implicados de ninguna manera con la expresión del fenotipo de DFEH. La existencia de grupos de repeticiones específicas del # 4q35 en el # 10q26 y viceversa, es aparentemente bastante común, con al menos un 21% de individuos en la población caucásica con este tipo de reordenamientos; un 12% del tipo de traslocaciones del 4 en el 10 y un 9% del 10 en el 4 (van Deutekom JCT y cols., 1996; Overveld PG y cols., 2000). Se han encontrado frecuencias comparables en poblaciones con otros orígenes étnicos (Matsumura T y cols., 2002; Wang N y cols., 2003).

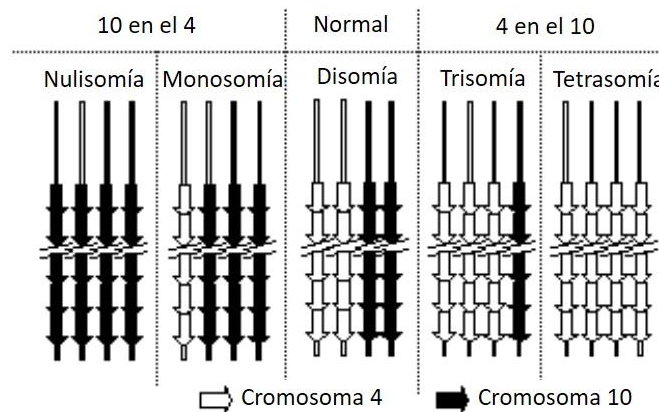


Figura 11. Translocaciones homogéneas de todos los grupos de repeticiones entre los cromosomas 4 y 10 (Ilustración modificada de Matsumura T y cols., 2002).

Para complicar más el análisis molecular, también se identificaron fragmentos híbridos (heterogéneos), consistentes en repeticiones de ambos tipos, del # 4 y del 10 (sensibles y resistentes a *BlnI*). Podemos visualizar dos tipos: los que comienzan por repeticiones del # 10 seguidas por repeticiones del # 4 (híbridos H1) y fragmentos que comienzan por repeticiones del # 4 seguidas por repeticiones del # 10 (híbridos H2).

Estudiando todos los alelos en individuos con grupos de repeticiones translocados se observó que los grupos del tipo del # 10 en el # 4 eran más heterogéneos que los del tipo del # 4 en el # 10. En los grupos de repeticiones del tipo del # 10 translocados al # 4, un 17% estaban compuestos por grupos de repeticiones homogéneos del tipo del # 10, mientras que un 33% eran grupos de repeticiones híbridas, que consistían en grupos de repeticiones del # 4 y del 10. Por el contrario, en los grupos de repeticiones del # 4 translocados al # 10, un 44% de los # 10

portaban grupos de repeticiones homogéneas sólo del # 4, mientras que un 10% eran fragmentos híbridos (de unidades del tipo del # 4 y del 10). También se ha podido estimar que existe un doble intercambio de alelos (un grupo homogéneo de repeticiones del # 10 en el # 4 por un grupo homogéneo de repeticiones del # 4 en el # 10) en el 1% de la población, dando una falsa imagen de individuo disómico a pesar de que dos de sus alelos están intercambiados (“falsos disómicos”) (van Overveld PG y cols., 2000).

Es importante subrayar que sólo están asociados con la DFEH1 los grupos de repeticiones <38 kb en el # 4 (tanto si su origen deriva del # 4q35, del # 10q26 o si son fragmentos híbridos) (Cacurri S y cols., 1998; Lemmers RJ y cols., 1998).

2.2.3. Variantes 4qA/4qB y asociación con 4qA. Haplotipos SSLP.

En 2002 van Geel M y cols. publicaron la existencia de un segmento polimórfico de 10 kb distal a D4Z4, con las variantes alélicas denominadas 4qA y 4qB (van Geel M y cols., 2002). Un examen de la población holandesa evidenció la importancia de estos hallazgos para el diagnóstico de la DFEH, al observar que mientras en individuos control la proporción de alelos 4qA y 4qB era casi igual (42% y 58% respectivamente), el alelo patológico de la DFEH estaba exclusivamente ligado al haplotipo 4qA (Lemmers RJ y cols., 2002). Por lo tanto, debe existir una diferencia funcional entre los alelos 4qA y 4qB.

Dentro de 4qA hay una región de 8 kb distal a D4Z4 compuesta por una secuencia de 260 pb (pLAM) seguida de una repetición β-satélite de 6,2 kb, y adyacente a esto hay un grupo de repeticiones de 1 kb del tipo (TTAGGG)n. Ninguna de estas regiones está presente dentro de la secuencia 4qB.

La localización de la unión entre el grupo de repeticiones D4Z4 y la secuencia subtelomérica adyacente también varía. En 4qB, la repetición terminal de 3,3 kb contiene sólo las primeras 570 pb de una unidad completa, mientras en 4qA la repetición terminal de 3,3 kb es una repetición de 3,3 kb divergente (pLAM) (van Geel M y cols., 2002).

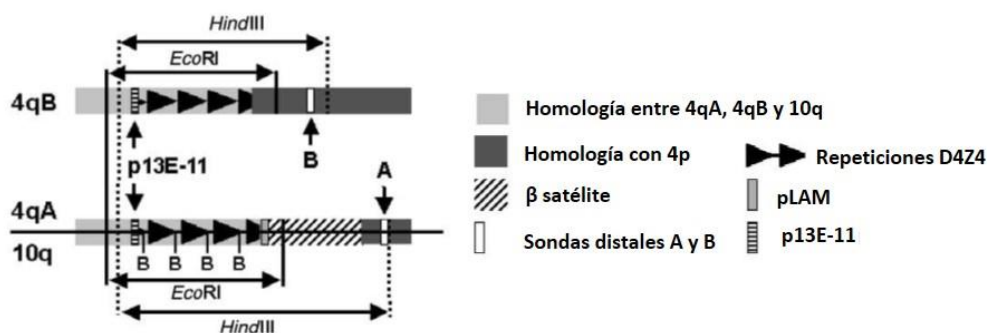


Figura 12. Composición de las variantes A y B (Ilustración modificada de Lemmers RJ y cols., 2002).

Después de un completo haplotipado de los alelos 4qA, 4qB y 10q, se determinaron 9 haplotipos distintos (SSLP, *Simple sequence length polymorphism*), 3 de ellos (4q) asociados con tamaños compatibles con la DFEH (4qA161, 4qA166, 4qB163). De estos 3 haplotipos se demostró que sólo el haplotipo 4qA161 (haplotipo permisivo) estaba asociado con la DFEH. (Figura 13).

Por lo tanto, las condiciones conocidas para desarrollar DFEH1 en el año 2007, además de tener un fragmento *EcoRI* <38 kb localizado en el # 4q35 y ser variante 4qA (“entorno cromosómico permisivo”), el fragmento debe ir asociado a un haplotipo específico 4qA161 (Lemmers RJ y cols., 2007).

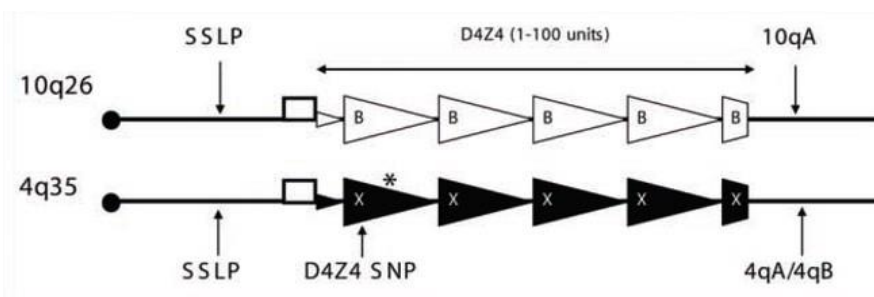


Figura 13. Variaciones específicas en la secuencia dentro de la región 4q35 que están asociadas con la DFEH: el haplotipo SSLP, 3.5 kb proximal a las repeticiones D4Z4; el SNP en D4Z4; la variación en el tamaño de las repeticiones D4Z4; y la variación distal A/B (Ilustración tomada de Lemmers RJ y cols., 2007).

Lemmers RJ y cols. (Am J Hum Genet, 2010) realizaron un genotipado detallado del locus D4Z4 en muestras de ADN de población europea, asiática y africana. El análisis de la secuencia de 4 marcadores polimórficos amplió el número de haplotipos subteloméricos conocidos, el de 4q a 17 y el de 10q a 8. (Figura 14). También identificaron una nueva variante del # 4q con una variación distal desconocida, no reconocida por las sondas distales 4qA y 4qB, y a la cual han definido provisionalmente como variante C. Esta variante distal C sólo se ha detectado en cromosomas híbridos 4C166H, que son abundantes en población africana (14,2%). Thomas NS y cols. en 2007 identificaron en dos casos con DFEH otro subtipo del # 4q desconocido (ni 4qA ni 4qB) y seguramente esta variación C coincide con la que encontraron Thomas NS y cols. en 2007.

Chromosome 4			Chromosome 10		
haplotype	%	Genbank Acc. Nr.	haplotype	%	Genbank Acc. Nr.
0 (deletion)	0.2	-	0 (deletion)	0.9	-
4A159	0.1	GU480773	10B161T	4.6	GU480777, GU480778
4A161	39.2	GU480774, GU480775	10A162	0.2	GU480801
4B161	0.7	GU480803	10A164	4.4	GU480799, GU480800
4B162	1.8	GU480791, GU480792	10A166	86.1	GU480802, GU480784, GU480785
4B163	32.9	GU480776	10A166H	0.6	GU480781, GU480782, GU480783
4A163	0.9	-	10A176T	2.5	GU480779
4A166	4.4	GU480786	10A180T	0.5	GU480780
4A166H	3.9	GU480787, GU480788, GU480789	other	0.2	-
4B166	1.0	-			
4B168	13.2	GU480793, GU480794			
4A168	0.3	GU480797, GU480798			
4A170	0.2	-			
4B170	0.5	GU480795			
4A172	0.2	-			
4B172	0.2	GU480796			
4B174	0.2	-			

Figura 14. Visión general de la prevalencia de haplotipos en población europea (basado en un estudio de 444 controles europeos independientes: Lemmers RJ AJHG 2010).

En 2010, Lemmers RJ y cols. (Science, 2010) analizaron otras variantes permisivas del # 4: 4A161L previamente descrita (van Deutekom JC y cols., 1993; Lemmers RJ y cols., *Am J Hum Genet* 2010), mientras que 4A159, 4A168 y 4A166H se han descubierto como nuevas variantes permisivas poco comunes en un estudio de más de 300 pacientes independientes con DFEH. Además, estudiaron más de 2000 individuos control e identificaron otras variantes cromosómicas no permisivas: 4B168, 10A164, and 10B161T.

Por lo tanto, las contracciones en los cromosomas permisivos **4A161, 4A161L, 4A159, 4A168 y 4A166H son patogénicas** y las contracciones en los cromosomas no permisivos 4B163, 4B168, 10A166, 10A164, 10B161T, and 10A176T son no patogénicas. También observaron que el haplotipo 4A166 a pesar de ser variante A no estaba asociado a la DFEH.

2.2.4. Mosaicismo

El mosaicismo es una alteración genética en la que, en un mismo individuo, coexisten dos a más poblaciones de células con distinto genotipo, y originadas de un mismo cigoto. El mosaicismo puede afectar a cualquier tejido del organismo (Figura 15).

En la DFEH1 existen dos tipos de mosaicismo dependiendo de si la nueva contracción del fragmento *EcoRI* se detecta en la línea germinal o durante la embriogénesis dando lugar a:

1. Mosaicismo germinal en el que la mutación afecta a una parte de los gametos (óvulos o espermatozoides). La mutación puede transmitirse a la descendencia.
2. Mosaicismo somático en el que coexisten células normales y con el defecto molecular dentro de un mismo organismo (puede afectar o no a la línea germinal). Si sólo afecta a células somáticas se debe a que la mutación tiene lugar después de la formación de las células germinales. Si afectan a células somáticas y células germinales, se denominan mosaicos gonosomales. La mutación no puede ser transmitida a la descendencia a menos que algunas células de la línea germinal estén afectadas.

El mosaicismo somático fue descrito en la DFEH1 por Upadhyaya M y cols., 1995. Aunque la DFEH1 se hereda de forma autosómico dominante, por lo menos un 10-30% de los casos no tienen historia familiar y son el resultado de mutaciones *de novo* (Padberg GW y cols., 1995; Zatz M y cols., 1995; Lunt PW, 1998; van der Maarel SM y cols., 2000). Las mutaciones *de novo* ocurren temprano en la vida embrionaria e incluyen a las células somáticas y a la línea germinal.

Según Kohler J y cols. (1996), lo más probable en algunas familias en las que hay más de un hijo con DFEH1 pero no hay antecedentes hereditarios, es que un progenitor tenga mosaicismo en la línea germinal y que los hijos afectados fueran concebidos con células del óvulo o esperma que acarreaban el defecto de la DFEH1. En estas situaciones, los progenitores no tienen síntomas y, si se examinan sus células sanguíneas, no muestran la mutación. La mutación existe únicamente en las células del óvulo o esperma. Este mosaicismo parece ocurrir predominantemente en las células gonadales femeninas.

Una alta proporción de esos casos *de novo* de DFEH resultan de reordenamientos que tienen lugar en las primeras fases de la embriogénesis resultando en mosaicismo somático para el alelo de la enfermedad en el paciente o en su progenitor asintomático. A menudo una mutación nueva aparece en primer lugar en forma mosaico, generalmente en una persona clínicamente normal, quien después tiene un hijo afecto.

En un estudio de 35 familias con DFEH *de novo*, van der Maarel SM y cols. (2000) detectaron mosaicismo somático en el 40% de los casos (en el 14% se detectó el fragmento deleciónado *EcoRI* en uno de los progenitores no afectados y 26% se detectó dicho fragmento en los mismos pacientes con DFEH *de novo* en cuyos progenitores no se había detectado). Dentro del 14% de los casos de mosaicismo parental, encontraron un predominio de mujeres portadoras mosaico coincidiendo con resultados de estudios anteriores y que atribuían esto a un mayor índice de mutación en mujeres que en hombres (Kohler J y cols., 1996; Lunt PW, 1998; Zatz M y cols., 1998), mientras que en la generación de los mismos pacientes con DFEH

de novo en que no se había encontrado el fragmento deleciónado en sus progenitores (26%), el número de hombres era mayor que el de mujeres. Las mujeres toleran mejor la proporción de células mutadas con el alelo contraído. Los varones mosaico con una pequeña proporción de células portando el alelo patológico pueden tener un fenotipo moderado, mientras que mujeres con una proporción comparable de células afectas y similar tamaño de fragmento pueden estar poco afectas o asintomáticas.

Los pacientes que son mosaicos somáticos y cuyo mosaicismo está también presente en las células germinales, tienen una menor probabilidad de tener descendencia afectada que los pacientes con DFEH que no son mosaico, ya que menos del 50% de esas células portan el alelo con el tamaño característico de DFEH. Esto hay que tenerlo en cuenta en el consejo genético. Por otro lado, la descendencia de un paciente mosaico va a estar más gravemente afectada ya que habrá heredado el defecto genético en el 100% de sus células (van der Maarel SM y cols., 2000).

En resumen, podemos distinguir 3 tipos distintos de mosaicismo que conllevan un riesgo de recurrencia distinto de transmitir el fragmento corto *EcoRI* a la descendencia:

- A) Un miembro parental con mosaicismo sólo germinal: no hay síntomas clínicos, no se detecta un fragmento corto *EcoRI* en otros tejidos que no sean las células gonadales y el riesgo de recurrencia para la descendencia es alto.
- B) Un miembro parental con mosaicismo somático y en la línea germinal: los síntomas clínicos pueden estar presentes o ausentes, se puede detectar en sangre y/u otros tejidos un fragmento deleciónado *EcoRI* y el riesgo de recurrencia para la descendencia es alto.
- C) Un miembro parental con mosaicismo sólo somático: los síntomas clínicos pueden estar presentes o ausentes, se puede detectar en sangre y/u otros tejidos un fragmento deleciónado *EcoRI* pero no en células gonadales por lo que el riesgo de recurrencia para la descendencia es menor.

Mutación de novo: en la línea germinal**Mutación de novo: mosaico somático**

Figura 15. Mutaciones *de novo*: el 60% en la línea germinal (no mosaicos) y el 40% mosaicismo somático (Imagen modificada de van der Maarel SM y cols., 2000).

Se ha establecido una relación entre la gravedad clínica de la enfermedad y una combinación de (1) el porcentaje de células sanguíneas portando el alelo de la enfermedad y (2) el tamaño de las repeticiones D4Z4 del alelo patológico. En este estudio, la proporción de células que portan el alelo deleciónado varió entre el 15 y el 95% basándose en la intensidad de señal de los distintos alelos (van der Maarel SM y cols., 2000). Dependiendo de la proporción de células sanguíneas que portan el alelo D4Z4 con un tamaño patológico los pacientes pueden presentar un mayor o menor fenotipo de DFEH, aunque como hemos visto antes hay que tener en cuenta el sexo.

En general, cuando menos del 40% de las células del individuo portan el alelo D4Z4 deleciónado puede no llegar a presentar síntomas clínicos o pasar casi desapercibidos, mientras que cuando más del 40% de sus células porta el alelo D4Z4 deleciónado presenta más síntomas clínicos aunque no como los que correspondería a una persona que no sea mosaico con el mismo tamaño de fragmento.

A la hora de realizar el diagnóstico molecular mediante Southern blot, si se utiliza la electroforesis horizontal (LGE) (resolución de 8-38 kb) puede que no se detecten los casos mosaico, sobre todo en los casos en que el individuo mosaico tiene el defecto en más del 40% de sus células (puede confundirse con un paciente con un fragmento patológico en el 100% de sus células). Es más fácil detectar a un individuo mosaico portador (con el defecto en menos del 40% de sus células) ya que la intensidad de la banda va a ser más débil que lo normal. Lemmers RJ y cols. (2004), publicaron que no se detectaron un 90% de los casos mosaico

mediante LGE y por ello recomendaron que se utilice la electroforesis de campo pulsante (PFGE) con la que se podrán detectar 5 fragmentos en lugar de 4 (dos pertenecientes a los dos alelos del # 10, uno perteneciente a un alelo del # 4 y el otro alelo que sufre normalmente una contracción y un fragmento de tamaño grande se contrae y aparece un fragmento en el rango patológico). Estos dos fragmentos (el de tamaño original y de tamaño contraído *de novo*) tendrán intensidades diferentes ya que cada uno de ellos estará en un porcentaje diferente de las células del individuo mosaico (Lemmers RJ y cols., 2004).

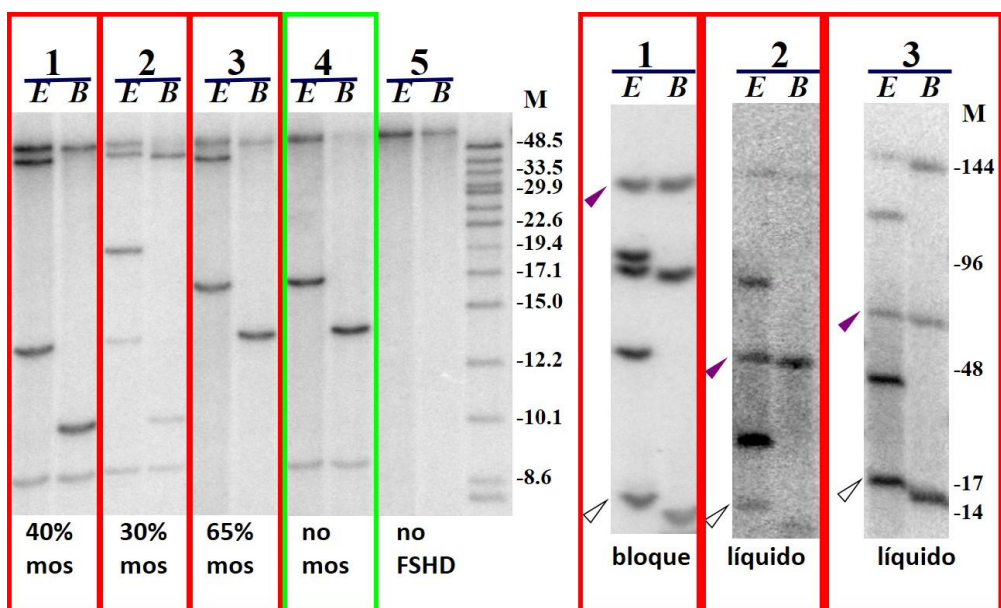


Figura 16. Comparación de los mismos pacientes mediante LGE (izda) y PFGE (dcha) (Imagen modificada de Lemmers RJ y cols., 2004).

2.3. DFEH2

Pese a tener una clínica indistinguible de los casos con DFEH1 confirmada, existe un 5% de pacientes con un fenotipo típico de DFEH que no están ligados al fragmento deleciónado del # 4 (Wijmenga C y cols., 1991; Mathews KD y cols., 1992; Sarfarazi M y cols., 1992; Upadhyaya M y cols., 1992; Iqbal I y cols., 1992; Gilbert JR y cols., 1992, 1993, 1995; Bakker E y cols., 1995; Tim RW y cols., 2001; de Greef JC y cols., 2010) que hemos definido como causante de la DFEH1.

Tras una búsqueda de genes o locus candidatos para explicar este grupo, no fue hasta el año 2012 en que determinaron que mutaciones en el gen SMCHD1 localizado en el # 18 causaban DFEH2 (OMIM 158901) (Lemmers RJ y cols., 2012). La proteína sintetizada se

encuentra físicamente en contacto con las repeticiones D4Z4 en el # 4 ejerciendo un papel represor sobre ellas.

SMCHD1 pertenece a la familia de proteínas SMC que participan en el mantenimiento estructural de los cromosomas (como la cohesina y condensina) y comparten una organización del dominio similar que afecta a la conformación de la cromatina. Esta proteína tiene dos dominios cruciales para su función, el dominio ATPasa y el dominio bisagra, que son cruciales para saber cómo SMCHD1 se une y regula la estructura de la cromatina, y la localización de las mutaciones puede contribuir a la DFEH. SMCHD1 es un modificador de la cromatina necesario para el establecimiento y mantenimiento de la metilación CpG del cromosoma X inactivo y de elementos repetidos específicos (Gendrel AV y cols., 2012). Los individuos con DFEH2 tienen una unión de la proteína SMCHD1 a las repeticiones D4Z4 reducida en sus dos alelos del # 4 y sus dos alelos del # 10 sugiriendo un mecanismo de haploinsuficiencia (Lemmers RJ y cols., 2012). Al igual que en la DFEH1 se han descrito casos familiares y esporádicos.

El 85% de estos pacientes con DFEH2 se explicaron con mutaciones en el gen SMCHD1 (Lemmers RJ y cols., 2012), pero el 15% restante de pacientes no tenían mutación en este gen.

Más recientemente se han descrito otros genes que pueden explicar también la DFEH2 como son el gen DNMT3B (locus 20q11.21) (van den Boogaard ML y cols., *Am J Hum Genet* 2016) y el gen LRIF1 (locus 1p13.3) (Hamanaka K y cols., *Neurology* 2020).

En el caso de la DFEH2, algunos se transmiten con herencia dominante que implica que un único alelo mutado es suficiente para producir la patología, en el gen SMCHD1 o en el gen DNMT3B, mientras que en el caso del gen LRIF1 se necesitan 2 alelos mutados (Hamanaka K y cols., 2020). En todos estos casos y como es preceptivo en la DFEH1, el paciente debe tener al menos un alelo 4qA para que se desarrolle la enfermedad además de la mutación o mutaciones en alguno de estos tres genes.

Las mutaciones en estos tres genes producen una relajación en la cromatina en la región D4Z4 y la expresión inapropiada del gen DUX4 en el músculo esquelético (Hamanaka K y cols., 2020).

Otro síndrome que comparte mutaciones en el mismo gen SMCHD1, regulador epigenético en la DFEH2, es el síndrome de microftalmia arrinia de Bosma (BAMS) (OMIN: 603457). Los pacientes con BAMS tienen ausencia de la nariz y pueden tener o no defectos oculares, pero no tienen signos de distrofia muscular. En la DFEH2, las mutaciones sin sentido o de fallo en los sitios de empalme o mutaciones truncadas en SMCHD1 son de pérdida de función y se han descrito a lo largo de toda la secuencia del gen mientras que en BAMS, las mutaciones son de ganancia de función y se encuentran sobre todo de los exones 3 al 13, que

abarca un dominio ATPasa y la región asociada inmediatamente C terminal a él. Aunque existe cierta controversia sobre si las mutaciones de cambio de sentido en BAMS son de pérdida o de ganancia de función, la arrinia ha sido asociada a un incremento de la actividad ATPasa (Shaw ND y cols., 2017; Gordon CT y cols., 2017; Gurzau AD y cols., 2018). Curiosamente, la hipometilación de D4Z4 se observa en ambas enfermedades y las células de los pacientes con BAMS son permisivas para la transcripción de DUX4, lo que indica que las mutaciones de pérdida o ganancia de función están asociadas con los mismos cambios epigenéticos en la región D4Z4, pero con resultados fenotípicos completamente diferentes.

En pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF) también se encontraron niveles bajos de metilación en la región D4Z4 (Kondo T y cols., 2000). Estos pacientes presentan anomalías cromosómicas que involucran los dominios juxtacentroméricos de los cromosomas 1, 9 y 16 y las repeticiones macrosatélite D4Z4 y NBL2 se encuentran hipometiladas. Estos pacientes al igual que los pacientes con DFEH2 poseen mutaciones en la DNA metiltransferasa DNMT3B, de forma dominante en los pacientes con DFEH2 y de forma recesiva en los pacientes con el síndrome ICF (OMIM:242860). Los pacientes con ICF tienen infecciones respiratorias y gastrointestinales recurrentes como resultado de una reducción en los niveles de inmunoglobulina sérica determinando normalmente una baja esperanza de vida, pero no presentan síntomas musculares típicos de la DFEH2, por lo que no compartirían un defecto en la misma ruta molecular (de Greef JC y cols., 2007).

También existen individuos que tienen el síndrome de delección del # 18p (18p-) que incluye la zona donde se encuentra el gen SMCHD1 y tienen sólo una copia de SMCHD1 como los casos de DFEH2. En un estudio determinaron que aproximadamente un 12,6% de estos individuos pueden estar en riesgo de desarrollar DFEH2, pero para ello tienen que tener un haplotipo permisivo 4qA que permita la transcripción de DUX4 y un tamaño del fragmento D4Z4 no muy largo que sea más sensible a la hemicigosidad de SMCHD1 que los fragmentos muy largos (Lemmers RJ y cols., 2015).

2.3.1. Diagnóstico molecular de la DFEH2

Los casos de DFEH2 tienen una herencia digénica, tienen que tener una mutación en el gen SMCHD1, DNMT3B o dos mutaciones en LRIF1, y además tienen que tener un haplotipo permisivo en al menos uno de los alelos (>38 kb), y las dos condiciones segregan de forma independiente.

El riesgo de recurrencia está entre el 25%-50% porque un paciente afectado tiene 1 copia modificada de SMCHD1, pero puede tener 1 o 2 copias del haplotipo permisivo 4q35, al igual que su pareja. Por lo tanto, el riesgo para los miembros de la familia de un caso de DFEH2 pueden clasificarse como:

Progenitores de un probando – DFEH2

- Cada progenitor tiene una variante patógena SMCHD1 o un alelo DUX4 permisivo DFEH por lo que son heterocigotos asintomáticos.

Hermanos de un probando – DFEH2

- En la concepción, cada hermano tiene un 25% de posibilidades de tener DFEH2, una probabilidad del 50% de tener una variante patogénica en SMCHD1 o un alelo permisivo para DUX4, y una probabilidad del 25% de no verse afectada y no tener ni una variante patogénica en SMCHD1 ni un alelo permisivo para DUX4. Los individuos portadores de una de las dos condiciones son asintomáticos.

- Una vez que se sabe que un hermano en riesgo no se ve afectado, la posibilidad de que tenga una variante patogénica SMCHD1 o un alelo DUX4 permisivo para DFEH es 2/3.

Descendiente de un probando – DFEH2

Suponiendo que la pareja reproductiva del probando no esté afectada y no sea portadora de una variante patógena SMCHD1 o un alelo DUX4 permisivo DFEH, cada niño de un individuo afectado tiene un 25% de posibilidades de estar afectado, una probabilidad del 50% de ser un portador asintomático, y un 25% de posibilidades de no estar afectado y no ser portador.

Otros miembros de la familia de un probando – DFEH2

Cada hermano de un heterocigoto obligado tiene una posibilidad del 50% de tener una variante patogénica en SMCHD1 o un alelo permisivo DFEH.

2.4. Trayectoria histórica de modelos de fisiopatología molecular en la DFEH ligada al cromosoma 4

Desde el descubrimiento de la localización del locus 4q35 asociado con la DFEH se han propuesto, fruto de una intensa labor investigadora, diferentes mecanismos patogénicos tanto en *cis* (desregulación local de genes en 4qter) (Hewitt JE y cols., 1994; Winokur ST y cols., 1994; Gabellini D y cols., 2002) como en *trans* (organización nuclear) para explicar la fisiopatología de la DFEH (Masny PS y cols., 2004; Petrov A y cols., 2006 y 2008; Pirozhkova I y cols., 2008; Bodega B y cols., 2009). (Figura 17)

- A) En el modelo de propagación de la expresión en cis (*cis-spreading model*), el grupo de repeticiones largo del alelo normal (>38 kb) y las secuencias cercanas comparten características de heterocromatina. El acortamiento de repeticiones resulta en una pérdida de heterocromatinización en D4Z4 que se extiende proximalmente y causa la sobrerregulación transcripcional de genes proximales de una manera dependiente de la distancia (efecto posicional), posiblemente a través de la acción del complejo de represión de D4Z4 (Gabellini D y cols., 2002).
- B) En el modelo aislante (*insulator model*), D4Z4 actúa como un espaciador entre secuencias heterocromáticas distales a las repeticiones D4Z4 y secuencias eucromáticas proximales. Tras la contracción, esta función aislante es incompleta permitiendo la heterocromatinización de secuencias proximales y la subregulación transcripcional de genes dentro de esta región (silenciamiento) (Ottaviani A y cols., et al., 2009).
- C) El modelo de bucle en cis (*cis-looping model*) postula que normalmente los bucles dentro del grupo de repeticiones cuando hay más de 10 unidades previenen la interacción de D4Z4 con genes en cis a largas distancias. Tras la contracción, la disrupción de esta interacción puede causar la expresión inapropiada de genes mediante interacciones de largo alcance con D4Z4 (Petrov A y cols., 2006).
- D) Finalmente, el modelo de organización nuclear (*nuclear organization model*) predice que la interacción de 4qter con la lamina nuclear donde la cromatina y los factores de transcripción está anclados está interrumpida en la DFEH. Esta alteración a su vez, puede dar lugar a un desequilibrio de la cromatina y de los factores de transcripción en 4qter y loci relacionados (Masny PS y cols., 2004; Petrov A y cols., 2006 y 2008; Pirozhkova I y cols., 2008; Bodega B y cols., 2009).

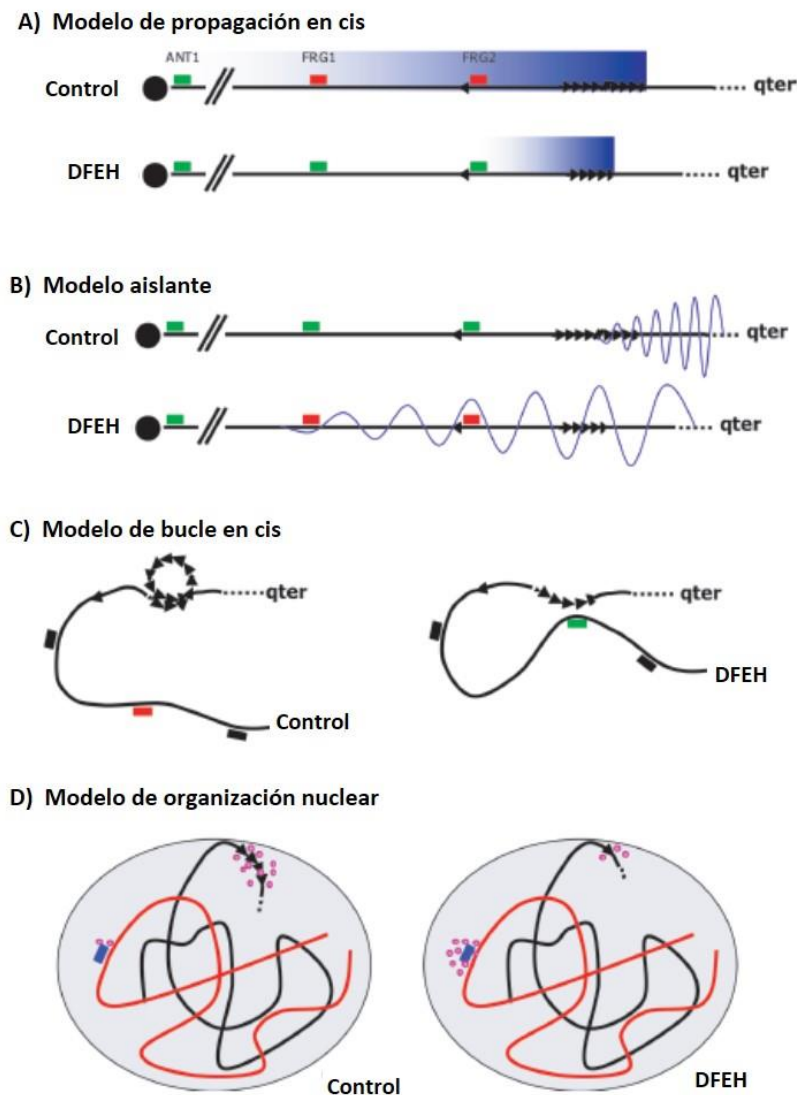


Figura 17. Diferentes modelos para explicar el mecanismo epigenético de la DFEH (Imagen modificada de van der Maarel SM y cols., 2005).

En relación a estos modelos, el primero es el que obtuvo mayor atención hace 20 años. El 45% de la región subtelomérica 4q35 proximal a las repeticiones 4q35 está compuesta de secuencias repetitivas. Se descubrieron 5 genes en la región de 150 kb más distal del # 4q: FRG1, TUBB4Q, DUX4c, FRG2 y DUX4 (van Geel M y cols., 1999). En la búsqueda de pistas como posible mecanismo molecular responsable para la DFEH, compararon patrones de expresión de ARNm presentes en músculo esquelético de pacientes con DFEH y controles normales (Tupler R y cols., 1999) y encontraron una alteración marcada en los niveles de expresión de genes, revelando una evidencia de subexpresión o sobreexpresión de un número específico de transcritos de genes en el músculo con DFEH.

Gabellini y cols. (2002) demostraron, *in vitro* e *in vivo*, que un complejo de proteínas represoras llamado DRC (D4Z4 Recognition Complex) compuesto por YY1 (represor transcripcional), HMGB2 (proteína 2 del grupo de alta movilidad con función estructural) y nucleolina (localizada en el nucleolo, está involucrada en la formación de la estructura de la cromatina, transcripción y maduración del ARNr, ensamblaje del ribosoma y transporte nucleocitoplásmico), se une a una secuencia de ADN de 27 pb denominada DBE (*D4Z4 binding element*) que está contenida en cada una de las repeticiones D4Z4 y que esa unión se pierde parcialmente en pacientes con DFEH. Este complejo sirve para reprimir la expresión de genes localizados proximalmente al grupo de repeticiones. La delección de repeticiones D4Z4 daría lugar por tanto a una inapropiada desrepresión transcripcional de estos genes musculares (FRG2, FRG1 y ANT1) produciendo la enfermedad. (Figura 18).

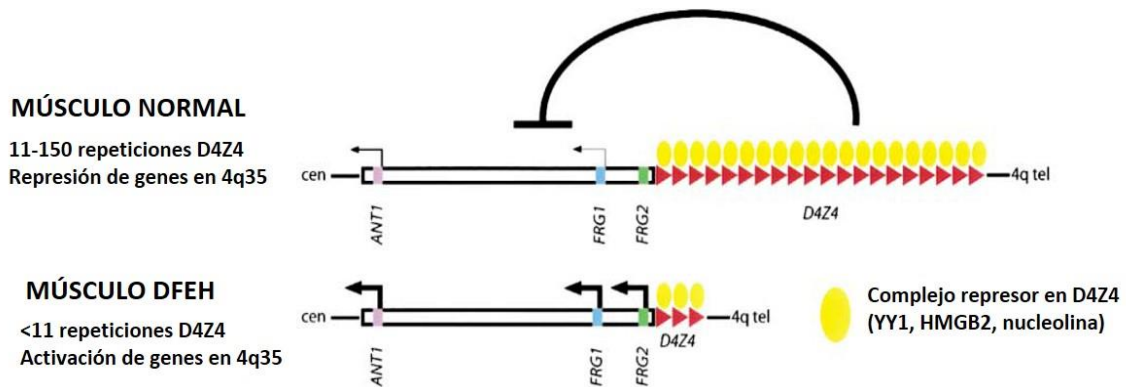


Figura 18. Modelo para la base molecular de la DFEH en 2002 (Ilustración modificada de Gabellini D y cols., 2002).

Se diseñaron experimentos para analizar el efecto de disminuir los niveles intracelulares de este componente de 27 pb y demostraron que la reducción de YY1, HMGB2 o nucleolina resultaba en la sobreexpresión del gen FRG2 localizado en 4q35 el cual no se expresaba en células normales y tejidos (Gabellini D y cols., 2003) pero hubo controversia en publicaciones posteriores respecto a la sobreexpresión de estos tres genes debido a que no se replicaron esos resultados por otros grupos (Jiang G y cols., 2003; Winokur ST y cols., 2003; Rijkers y cols., 2004). En otro análisis de expresión observaron que varios genes desregulados en el músculo de pacientes con DFEH están específicamente involucrados en miogénesis, diferenciación celular, en la respuesta inmune, en el estrés oxidativo y en control del ciclo celular (Winokur ST y cols., 2003).

Después de tanta controversia en relación a la expresión de genes, la cuestión quedó aparentemente resuelta cuando Klooster R y cols. (2009) estudiaron la expresión de los distintos genes candidatos FRG1, FRG2, ANT1, ALP (PDLIM3) y LRP2BP, así como otros genes posteriormente publicados PITX1 y CRYM (Dixit M y cols., 2007; Reed PW y cols., 2007), a nivel

de ARNm y a nivel de proteína en mioblastos primarios, miotubos y cuádriceps procesados idénticamente y no encontraron cambios considerables entre las diferentes muestras, a excepción de un aumento selectivo en la expresión de ARNm de FRG2 en miotubos con DFEH.

En 2010, tras en un gran esfuerzo colaborativo de varios grupos, incluido el nuestro, se publicó un modelo que unificaba todas las teorías identificando al gen DUX4 expresado en la última de las repeticiones D4Z4 como el desencadenante de la clínica en la DFEH, como consecuencia de una pérdida de represión de la cromatina en un entorno permisivo (Lemmers RJ y cols., 2010).

Expresión de DUX4 como desencadenante de la DFEH

Algunos grupos de repeticiones macrosatélite no centroméricos, incluyendo a D4Z4, son extremadamente ricos en GC, convirtiéndolos en candidatos atractivos para la metilación del ADN. Mientras que el contenido medio de GC a lo largo del genoma es del 42%, cada repetición D4Z4 contiene un 73% de GC (Tsumagari K y cols., 2008). Además, en D4Z4, la frecuencia de los dinucleótidos CpG es del 10% comparado con el 1% de media en el genoma humano. Cada repetición D4Z4 contiene dos clases de secuencias ricas en GC, denominadas repeticiones de baja copia hhspm3 y LSau. Este tipo de ADN repetitivo se encuentra principalmente en regiones heterocromáticas del genoma (Hewitt JE y cols., 1994; de Greef JC y cols., 2008). D4Z4, además de ser muy rico en GC, tiene características de una isla CpG.

Cuando estudiaron dos dinucleótidos CpG diferentes, discriminando entre # 4 y # 10, observaron que la metilación del ADN de la repetición D4Z4 más proximal en el alelo contraído estaba significativamente reducida en pacientes con DFEH1, tanto en ADN aislado de linfocitos de sangre periférica (PBLs) como de músculo (van Overveld PG y cols., 2003). Además, en el grupo de pacientes con DFEH2 también observaron hipometilación del ADN (van Overveld PG y cols., 2005). Los pacientes con DFEH2 a diferencia de los DFEH1, muestran hipometilación no sólo en el alelo contraído del # 4, si no en ambos # 4 y y en ambos # 10, por eso tienen una hipometilación mucho más marcada que los pacientes con DFEH1 (de Greef JC y cols., 2009). Por tanto, la observación de que los alelos de la DFEH estuvieran hipometilados en D4Z4 corroboraba un cambio en la conformación local de la cromatina y el hecho de que ambos tipos, DFEH1 y DFEH2 compartiesen los cambios epigenéticos en el locus de la DFEH sugería que el mecanismo de esta enfermedad estaba mediado a través de D4Z4 en ambas variantes de DFEH (van Overveld PG y cols., 2003; de Greef JC y cols., 2007).

Finalmente se encontró que el efecto molecular subyacente, tanto en la DFEH1 como en la DFEH2 se debe a la expresión del gen DUX4 que se encuentra en cada una de las repeticiones D4Z4 pero que sólo se expresa el que se encuentra en la última repetición D4Z4, cuando se dan una serie de condiciones determinadas (“entorno permisivo”) (Lemmers RJ y cols., 2010).

El gen DUX4 es un retrogen (gen retrotranspuesto usualmente carente de intrones originado por transcripción inversa de un ARN vírico –retrovirus- e incorporado al ADN genómico de la célula huésped) que se expresa normalmente sólo en tejido de la línea germinal y que luego se encuentra reprimido epigenéticamente en tejidos maduros debido a un aumento de la metilación en esa región.

En la DFEH tiene lugar un fallo de esa represión, que permite la expresión del mRNA de DUX4; en el caso de la DFEH1 se reduce el número de repeticiones D4Z4 por debajo de 10, lo que produce una relajación de la cromatina que permite la expresión del del gen mientras que en el caso de la DFEH2 se debe a mutaciones, principalmente en el gen SMCHD1, que hacen que pierda su función represora sobre las repeticiones (Brideau NJ y cols., 2015). La consecuencia, por dos mecanismos diferentes, es la hipometilación de la región D4Z4 y la expresión del gen DUX4 en células somáticas, especialmente en miocitos (Figura 19).

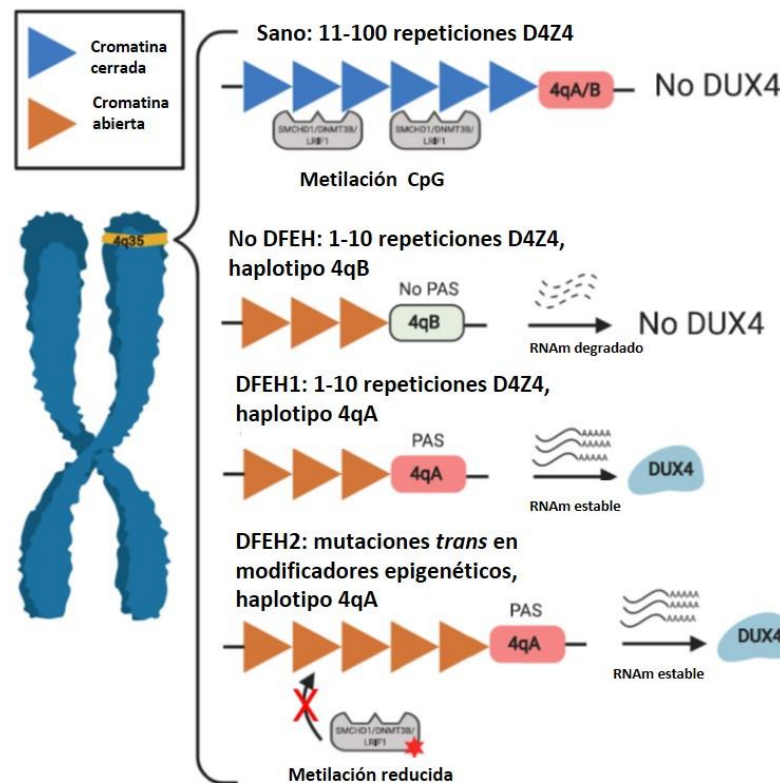


Figura 19. La genética y el mecanismo molecular de la DFEH (ilustración modificada de Cohen J y cols., 2021).

El gen DUX4 está compuesto por tres exones, el exón 1 y 2 presentes en cada una de las repeticiones D4Z4, mientras que el exón 3 está localizado fuera de las repeticiones y es el que presenta una señal de poliadenilación pLAM en la última repetición parcial D4Z4 que contiene el gen DUX4 (Dixit M y cols., 2007). En un trabajo llevado a cabo por Snider L y cols. (2009) se estudiaron los transcritos provenientes de D4Z4 en células de pacientes y de controles en busca de nuevos candidatos para tratar la patofisiología de la DFEH y se caracterizaron dos isoformas diferentes de ARNm codificadas por el gen DUX4 a través del ensamblaje alternativo: una forma corta de función desconocida que codifica sólo la porción amino terminal de DUX4 (DUX4-s; s de *short* en inglés) que puede detectarse en células somáticas sanas, y una forma larga que codifica la totalidad de la proteína DUX4 (DUX4-fl; fl de *full length* en inglés) que se expresa en las fases tempranas del desarrollo y está generalmente silenciada en tejidos somáticos adultos sanos.

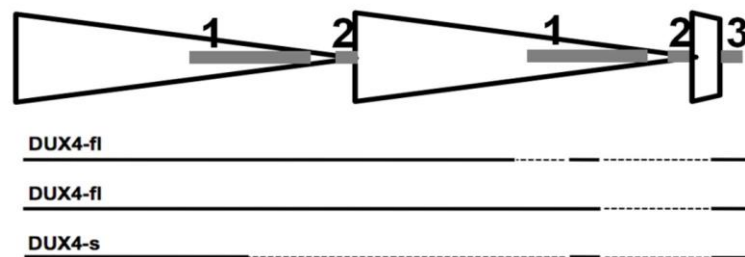


Figura 20. Diagrama de las dos últimas repeticiones D4Z4 completas, la última repetición parcial, y la secuencia adyacente pLAM que contiene el exón 3. Las rayas continuas representan las regiones de los exones y discontinuas representan a los intrones, en el transcrito corto (DUX4-s) y el transcrito largo de DUX4 con el ORF (DUX4-fl), el cual tiene dos isoformas alternativas de ensamblaje en la región 3' sin traducir.

DUX4-fl codifica un factor de transcripción con un doble dominio *homeobox* que normalmente realiza un papel principal en la activación de un programa de expresión génica en la fase de las primeras divisiones celulares del desarrollo embrionario, tras lo que se silencia epigenéticamente en el resto del desarrollo embrionario y en la mayoría de los tejidos somáticos adultos (Hendrickson PG y cols., 2017). DUX4 se expresa normalmente en la línea germinal de los testículos, donde utiliza una señal de poliadenilación en el exón 7 (Snider L y cols., 2010), y por tanto es expresado por todos los varones independientemente de que tengan un haplotipo 4qA. Se mantiene la expresión de ciertas isoformas en los testículos y en el timo. La contracción de repeticiones D4Z4 en la DFEH resulta en una supresión menos eficiente del mRNA DUX4-fl en células del músculo esquelético. El músculo control produce

pequeñas cantidades de la isoforma DUX4-s y el músculo con DFEH produce pequeñas cantidades la isoforma DUX4-fl. El hecho de que se encontrara poca abundancia del transcrito DUX4-fl en las células musculares tanto de pacientes con DFEH1 como con DFEH2 podría reflejar un nivel de expresión uniforme en todos los núcleos o una expresión alta de ARNm y proteína de DUX4 en un número limitado de núcleos. Se estimó que aproximadamente 1 de cada 1000 mioblastos eran positivos en mRNA de DUX4 (Snider L y cols., 2010) surgiendo la pregunta de por qué un gen que se expresa en niveles tan bajos puede ser tóxico. La presencia de la proteína DUX4 endógena en núcleos consecutivos de los miotubos formaba un gradiente de intensidad, sugiriendo una difusión de la proteína resultante en los núcleos de los miotubos próximos, extendiendo así la expresión génica aberrante (Ferreboeuf M y cols., 2014). El gen DUX4 es activado de forma estocástica en un pequeño número de mionúcleos de DFEH (como ráfagas) (Rickard AM y cols., 2015), el mRNA resultante se traduce en el citoplasma alrededor del núcleo activado y las proteínas DUX4 difunden a los núcleos adyacentes donde activan otros genes diana y se inicia una desregulación transcripcional en cascada iniciada por DUX4 (Tassin A y cols., 2013). Se han descrito 3 tipos de exón 3: los exones 3a y 3b que se transcriben en los alelos 4qA161L y el exón 3 que se transcribe en el alelo 4qA161S. El exón 3 lleva la señal de poliadenilación. Se han caracterizado 5 isoformas de DUX4, las cuatro que dan lugar a la proteína completa (DUX4-fl) son patogénicas, mientras que la que da lugar a la proteína truncada (DUX4-s) no es patogénica (Sidlauskaitė E y cols., 2020).

Además de la pérdida de metilación que posibilite la expresión de DUX4, el segundo requerimiento es que debe existir un entorno cromosómico permisivo, para que tenga lugar el procesamiento alternativo del exón 3 localizado en la región pLAM creando una señal de poliadenilación (PAS) que permite que el transcrito del gen DUX4 se establezca y se exprese (Lemmers RJ y cols., 2010).

La proteína DUX4 codificada por el gen es tóxica para los miocitos y da lugar a la muerte celular y a la atrofia muscular característica de estos pacientes. Incluso niveles bajos de DUX4-fl son altamente citotóxicos cuando se expresan en células somáticas adultas o durante el curso del desarrollo de vertebrados (Bosnakovski D y cols., 2008; Kowaljow V y cols., 2007; Mitsuhashi H y cols., 2013; Wallace LM y cols., 2011; Wuebbles RD y cols., 2010).

Una vez expresado de forma inadecuada en el músculo esquelético de DFEH, DUX4-fl activa genes que normalmente no se expresan en este tejido (p. ej., genes de la línea germinal, mediadores inmunitarios y retroelementos) (Geng LN y cols., 2012; Young JM y cols., 2013), altera el ARN y el metabolismo de las proteínas (Fen Q y cols., 2015; Homma S y cols., 2015), altera la miogénesis (Bosnakovski D y cols., 2017; Dmitriev P y cols., 2016; Knopp P y cols.,

En oposición se han publicado varios inhibidores de DUX4, sugiriendo que las dianas de los inhibidores pueden desempeñar un papel en la expresión de DUX4. Se demostró que la activación de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina redujo la expresión de DUX4 mientras que la eliminación de los componentes de la vía de señalización la activaban (Block, GJ y cols., 2013). Probablemente, el mecanismo de regulación de DUX4 por Wnt/ β -catenina es independiente de la unión directa de β -catenina en D4Z4.

Las vías de BET (*Bromodomain and Extra-Terminal*) y la mediada a través del receptor adrenérgico β 2 también se han asociado con la regulación de la expresión de DUX4. Utilizando inhibidores de todas las proteínas de la familia BET, se silenciaron DUX4 y todas sus dianas en células musculares con DFEH (Campbell AE y cols., 2017) viendo que reprimían eficientemente la transcripción de DUX4 por desacetilación de la lisina, pero no por la metilación del ADN. Del mismo modo, agonistas de los receptores adrenérgicos β 2 activan vías de señalización conocidas por inducir a la remodelación de la cromatina. La expresión de DUX4 y de sus dianas fue reprimida después del tratamiento con agonistas de los receptores adrenérgicos β 2, lo que apunta claramente al papel de las vías de señalización de BET y el receptor β 2 adrenérgico en la expresión de DUX4 en los pacientes con DFEH (Campbell AE y cols., 2017). La importancia del receptor adrenérgico β 2 se ha confirmado en estudios adicionales (Cruz JM y cols., 2018), y las rutas aguas abajo han sido centro de atención para identificar dianas terapéuticas. El hallazgo de que los agonistas de β 2AR reducen la expresión de DUX4 en miotubos de pacientes con DFEH es sorprendente, ya que se han realizado tres ensayos clínicos aleatorizados, a doble ciego y controlados con placebo que investigaron el efecto del fármaco aprobado agonista de β 2AR, el albuterol (salbutamol), y se comprobó la ausencia de eficacia en pacientes con DFEH (van der Kooi EL y cols., 2004; Kissel JT y cols., 2001; Payan CA y cols., 2009). Puede que la falta de eficacia en esos estudios se debiera a las dosis usadas (a pesar de que el albuterol está aprobado como droga por la FDA, los ensayos clínicos están limitados a dosis previamente aprobadas como seguras y eficaces en ensayos clínicos). Sin embargo, los últimos resultados que demuestran que los agonistas de β 2AR disminuyen la expresión de DUX4, hacen atractiva esta aproximación de tratamiento (Cruz JM y cols., 2018).

Una de las potenciales dianas terapéuticas, es la proteína quinasa p38 activada por mitógenos (MAPK) que es activada por la ruta de señalización del receptor adrenérgico β 2 (Yamauchi J y cols., 1997). En células musculares de DFEH o en un modelo de xenoinjerto de DFEH, la inhibición farmacológica o mediada por ARNsi (*RNA small interference*) de p38 induce una reducción de los niveles de ARNm de DUX4 (Oliva J y cols., 2019). Esto sugiere que la

expresión de DUX4 mediada por el agonista del receptor adrenérgico $\beta 2$ es una consecuencia de la activación de la quinasa p38.

Las fosfodiesterasas (PDEs), que son responsables de la regulación del AMPc disponible en la célula, se han identificado como reguladoras de la expresión de DUX4 reduciendo los niveles tanto de DUX4 como de sus genes diana, ZSCAN4 y TRIM43 (Cruz JM y cols., 2018).

El receptor adrenérgico $\beta 2$ y las PDEs están implicados en el ciclo mediado por AMPc que a su vez regula la ruta de señalización de la proteína quinasa A (PKA). Ambas, la PKA activa catalítica y el AMPc permeable en la célula, son suficientes para reducir la expresión de los niveles de ARNm de DUX4 y de ZSCAN4 y TRIM43 en células musculares primarias de pacientes con DFEH (Cruz JM y cols., 2018).

En el caso de la DFEH2, la expresión de DUX4 está incrementada durante la diferenciación muscular, lo que correlaciona con niveles bajos de proteína SMCHD1 en la región D4Z4 (Balog J y cols., 2015). Además, la interacción de SMCHD1 con la cromatina es facilitada por el factor LRIF1, el cual se une a las repeticiones D4Z4 (Hamanaka K y cols., 2020). Mutaciones en LRIF1 dan lugar a una relajación de la cromatina y una desrepresión de DUX4 generando un fenotipo de DFEH.

Se observa también una hipometilación de la región D4Z4 en otras enfermedades relacionadas con mutaciones en SMCHD1 (BAMS), DNMT3B (ICF) o con una delección del locus 18p que contiene el gen SMCHD1, pero después de haber realizado el estudio de la metilación de CpG por varios grupos y de distintas formas, no hay una teoría clara y unificadora sobre la base “epigenética” de la DFEH. De hecho, el estado de la metilación de D4Z4 no refleja la expresión clínica de la enfermedad. La hipometilación es necesaria pero no suficiente para desarrollar DFEH ya que la podemos encontrar en individuos sanos (con contracción en un haplotipo no permisivo o con un fragmento contraído en el # 10), o en otras enfermedades que no presentan un fenotipo de DFEH. Por lo tanto, la cuantificación de esta marca epigenética debe interpretarse con precaución ya que debe interpretarse como marca diagnóstica pero no como un marcador de la función de D4Z4 en la DFEH (Salsi V y cols., 2020) ya que hay otras marcas epigenéticas a tener en cuenta (modificación de histonas).

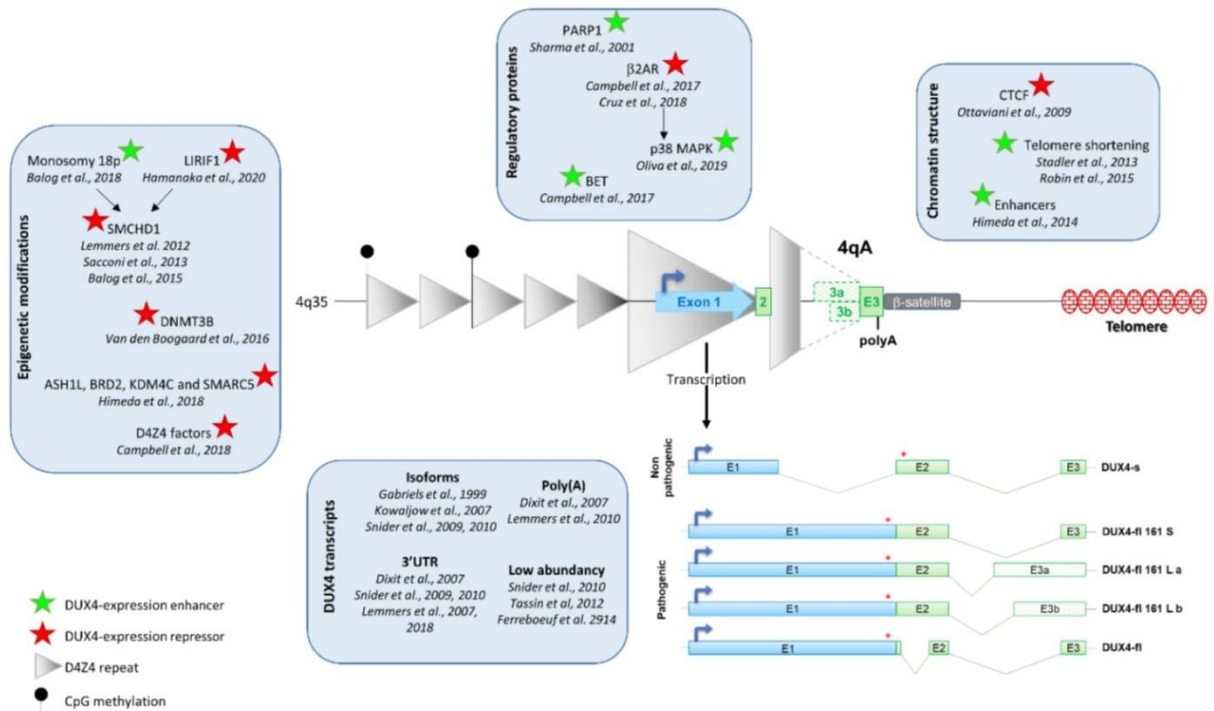


Figura 22. Factores implicados en la regulación de la expresión de DUX4 (Tomada de Sidlauskaitė E y cols., 2020)

Epigenética en la DFEH

La cromatina es el ensamblaje del ADN, de unas proteínas nucleares llamadas histonas y de otras proteínas cromosómicas formando una estructura como las cuentas de un collar (Figura 23). La principal función de la cromatina es acomodar el empaquetamiento del ADN en el núcleo. La unidad estructural más pequeña es el nucleosoma que consiste en 146 pb de ADN envuelto alrededor de ocho histonas principales. Las histonas pueden experimentar varias modificaciones post-translacionales, como acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación (Bhaumik SR y cols., 2007) que sirven para regular el mantenimiento y la expresión de la información genética. Actualmente, prevalecen dos modelos que explican la función de esas modificaciones de las histonas. Por un lado, las modificaciones de las histonas pueden afectar directamente a la estructura de la cromatina previniendo la unión de factores de transcripción, alterando las interacciones entre nucleosomas o cambiando las interacciones de las colas de las histonas con el ADN en el nucleosoma (Peterson CL y Laniel MA, 2004). Por otro lado, las modificaciones de las histonas pueden servir como lugar de reclutamiento para proteínas asociadas a la cromatina que reconocen un código específico de histona. Como consecuencia de esto, pueden ocurrir eventos *a posteriori* que generen un particular estado en la cromatina (Strahl BD y Allis CD, 2000).

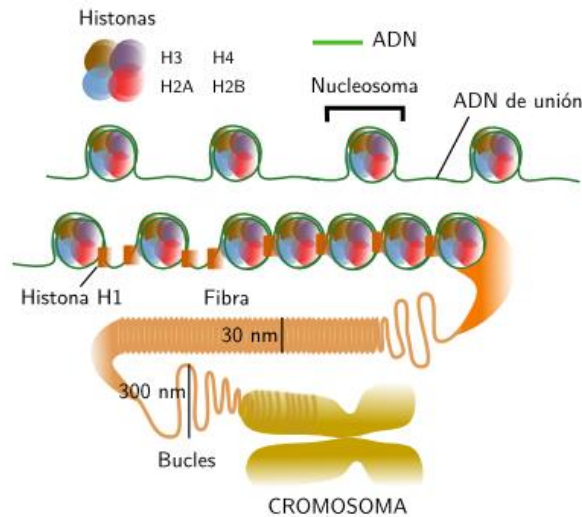


Figura 23. Esquema de los diferentes grados de compactación de la cromatina, desde los nucleosomas al cromosoma (imagen tomada de <https://mmebias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/8-cromosomas.php>)

Las modificaciones específicas de las histonas parecen estar asociadas con su activación o represión transcripcional. La metilación de los residuos lisina 4, 36 y 79 de la histona H3 ha sido correlacionada con la activación transcripcional. La acetilación de los residuos arginina de las histonas H3 y H4 es también característica de la eucromatina y la activación génica (Eberharter A y Becker PB, 2002). Por el contrario, la metilación de los residuos lisina 9 y 27 de la histona H3 y del residuo lisina 20 de la histona H4 se han relacionado con la heterocromatina y la inactivación génica (Fischle W y cols., 2003; Lachner M y O’Sullivan RJ, 2003).

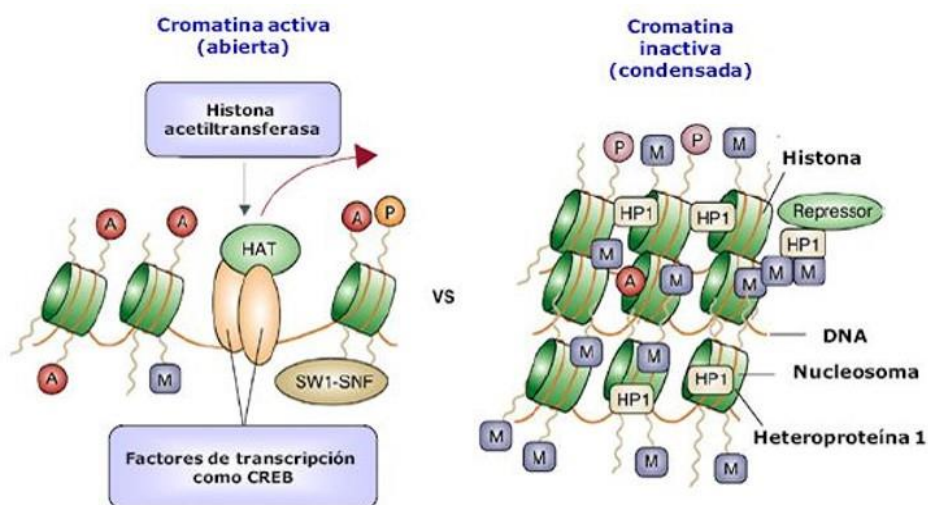


Figura 24. Descondensación de la cromatina inducida por la acetilación de histonas (Modificada de McClung y Nestler, 2008). A: acetilación, M: metilación y P: fosforilación

La alteración epigenética de la cromatina se basa en la metilación del ADN y en las modificaciones de las colas de histonas en los nucleosomas, que en conjunto determinan la denominada "firma epigenética" de una región específica.

Además, la metilación reducida de D4Z4 en la DFEH coincide con cambios de varias otras modificaciones de la cromatina en D4Z4 (Balog J y cols., 2012; Zeng W y cols., 2009), como la marca de compactación de cromatina (la relación entre las modificaciones de la histona 3, H3K9me3 y H3K4me2 en D4Z4), que difiere significativamente entre controles y la DFEH2, y entre controles y la DFEH1 (Balog J y cols., 2012). Estas modificaciones de histonas en 4qter eran también un argumento en contra de un modelo de propagación en *cis* (Jiang G y cols., 2003).

El alelo D4Z4 contraído en pacientes con DFEH1 experimenta cambios considerables en la estructura de su cromatina, que además de incluir la pérdida de la metilación del ADN (van Overveld PG y cols., 2003) incluye la pérdida de la trimetilación de la H3K9 (Histona 3 en el residuo Lisina 9) no sólo en el alelo D4Z4 contraído del # 4, sino que también ocurre en los alelos D4Z4 genéticamente intactos de ambos cromosomas (pacientes con DFEH2), 4q y 10q, proporcionando la primera evidencia de que el cambio genético (la contracción) de uno de los alelos D4Z4 del # 4 extiende su efecto a otras regiones genómicas. Estos cambios en la cromatina se observan tanto en pacientes con DFEH tipo 1 como tipo 2, pero no en otras distrofias musculares (de Greef JC y cols., 2007).

La metilación del ADN y la metilación heterocromática de las histonas están a menudo correguladas (Jones PA y Baylin SB, 2007). Aunque la metilación del ADN es más frecuentemente una consecuencia posterior a la metilación de H3K9 (Lachner M y Jenuwein T, 2002), en algunas ocasiones se ha visto que precede a la H3K9me3 (Sarraf SA y Stancheva I, 2004). En el estudio de Zeng W y cols. (2009) se demuestra que la metilación del ADN no se requiere para la pérdida de H3K9me3 en D4Z4, implicando que esta pérdida, está causalmente involucrada en la DFEH, más que la hipometilación del ADN.

Aunque se pensaba que D4Z4 era un dominio transcripcionalmente represivo en su totalidad (Gabellini D y cols., 2002; van Overveld PG y cols., 2005), Zeng W y cols. encuentran que las regiones D4Z4 contienen una mezcla de modificaciones de histonas eucromáticas y heterocromáticas; específicamente, H3K4me2 y H3Ac así como H3K9me3 y H3K27me3. Estas modificaciones están presentes en distintos dominios dentro de los grupos de repeticiones D4Z4 con la primera repetición (la más proximal) siendo eucromática. Es interesante el hecho de que sólo se pierde la H3K9me3 de la región heterocromática (pero no se pierde H3K12me3).

Por lo tanto, el cambio de la cromatina en la DFEH no es una pérdida total de heterocromatina transcripcionalmente represiva. Zeng W y cols. demuestran que la proteína de unión a heterocromatina, HP1 γ , y la cohesina son reclutadas por D4Z4 de una manera dependiente de H3K9me3 y específica del tipo celular, cuyo reclutamiento es interrumpido en la DFEH. Los resultados indican que la cohesina juega un papel activo en el reclutamiento de HP1 y que está implicada en la regulación de la cromatina de D4Z4 de una forma específica del tipo celular. La cohesina es reclutada por CTCF y contribuye al aislamiento, organización topológica del ADN y el proceso regulatorio de expresión de genes. Por tanto, la pérdida de H3K9me3 y de la unión de HP1 γ /cohesina a D4Z4 (estructura de cromatina más relajada) son un marcador fiel para explicar el fenotipo de DFEH (en pacientes con DFEH1 y 2) proponiéndose un nuevo modelo en el cual el cambio epigenético iniciado en las repeticiones D4Z4 en el # 4q extiende su efecto a otras regiones genómicas, lo cual compromete la regulación génica específica del músculo dando lugar a la patogénesis de la DFEH (Zeng W y cols., 2009).

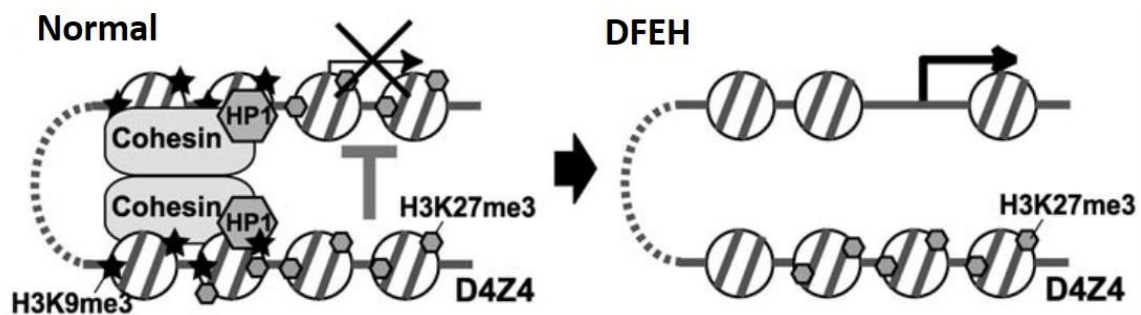


Figura 25. Modelo propuesto para la propagación del cambio epigenético en D4Z4 a otras regiones genómicas en la DFEH. HP1c y cohesina pueden contribuir a las interacciones físicas de la región heterocromática D4Z4 con otras regiones genómicas que conducen a la propagación del efecto silenciador a supuestos genes diana en células normales. En la DFEH, la pérdida de H3K9me3 (pero no de H3K27me3), HP1c y cohesina en D4Z4 da como resultado la pérdida de la interacción de la cromatina y la desrepresión de estos genes dando lugar a la distrofia muscular (Ilustración tomada de Zeng W y cols., 2009).

La metilación del ADN es solo uno de los numerosos indicadores de la estructura de la cromatina en D4Z4 y varios grupos de investigación informaron que las alteraciones de la estructura de la cromatina se reflejan en las modificaciones postraduccionales de histonas (de Greef JC y cols., 2007; Zeng W y cols., 2009 y 2014; Jiang G y cols., 2003), mediante la unión de varias proteínas y ARN en la región de repeticiones D4Z4 (Gabellini D y cols., 2002; Cabianca DS y cols., 2012; Ottaviani A y cols., 2009), y por la formación de estructuras de cromatina de orden superior (Bodega B y cols., 2009; Cortesi A y cols., 2019; Petrov A y cols., 2006). Se ha

informado que la región D4Z4 contiene trimetilación de histona H3 Lisina 9 (H3K9me3), una marca represiva asociada con la formación de heterocromatina, junto con H3K27me3, una marca de cromatina represiva asociada con el silenciamiento del elemento represor Polycomb (van Overveld PGM y cols., 2003; Cabianca DS y cols., 2012; Zeng W y cols., 2009). La pérdida de las marcas de histonas represivas no es una consecuencia directa de la hipometilación del ADN, ya que el enriquecimiento de H3K9me3 en D4Z4 no se alteró en el síndrome de ICF, que muestra una hipometilación grave del ADN en el locus 4q35 (de Greef JC y cols., 2007; Zeng W y cols., 2009). Además, la presencia de H3K27 en D4Z4 no mostró ningún cambio entre células del músculo control comparado con el de DFEH (Cabianca DS y cols., 2012; Bodega B y cols., 2009).

Otras observaciones abogan por un papel de las proteínas Polycomb en la regulación epigenética en D4Z4. Así Cabianca DS y cols. (2012) demostraron que la metiltransferasa EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*), una histona metiltransferasa que forma parte del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) responsable de la trimetilación de H3K27, se redujo en las células musculares con DFEH, mientras que ASH1L (*ASH1 Like Histone Lysine Methyltransferase*), un miembro del complejo Trithorax asociado con la cromatina transcripcionalmente activa, se reclutaba específicamente para D4Z4 en células con DFEH. El reclutamiento de ASH1L depende de la expresión del ARN no codificante DBE-T, transcrito por a la unidad D4Z4 más proximal en células con DFEH y facilita la dimetilación de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me2). Ésta es una marca de histona importante asociada con la activación transcripcional, que conduce a la remodelación de la cromatina y la transcripción del gen DUX4 en 4q35 (Cabianca DS y cols., 2012).

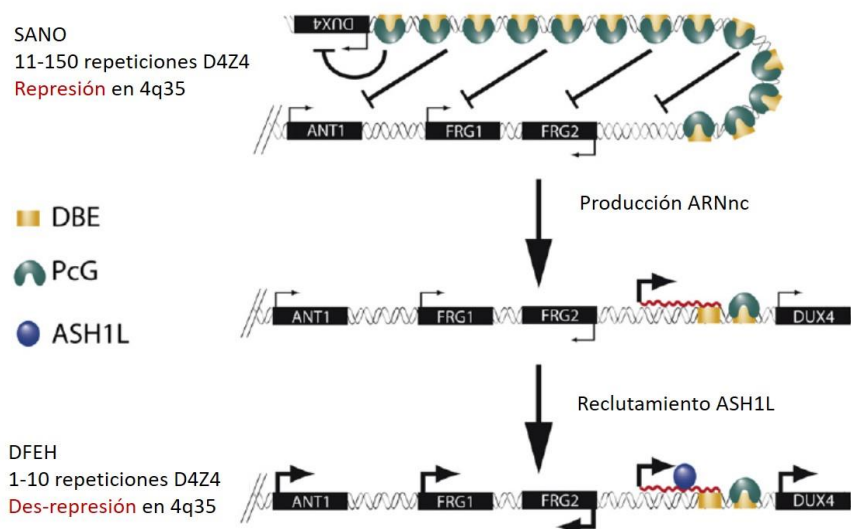


Figura 26. Modelo de desrepresión en 4q35 mediada por DBE-T. DBE, lncARN; PcG, Polycomb; ASH1L (*ASH1 Like Histone Lysine Methyltransferase*) (Ilustración modificada de Cabianca DS y cols., 2012).

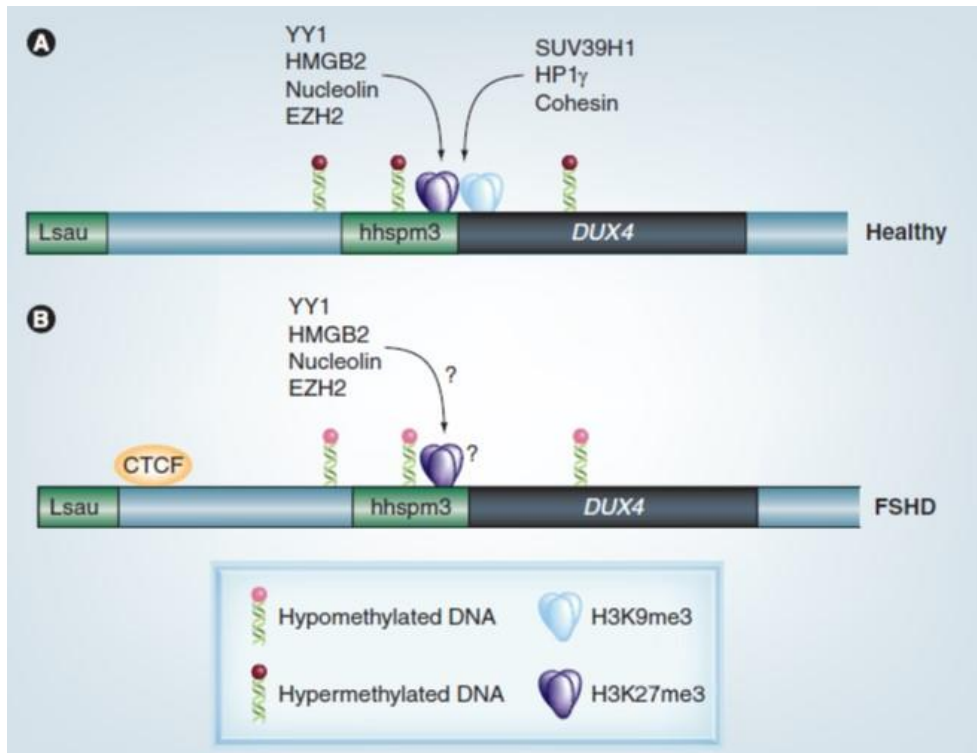


Figura 27. Modificadores epigenéticos y modificaciones de histonas asociadas con las repeticiones D4Z4 en sujetos sanos o pacientes con DFEH (Ilustración tomada de Neguembor NW y cols., 2010).

- (A) En sujetos sanos, los reguladores epigenéticos YY1, HMGB2, nucleolina, EZH2 (responsable de H3K27me3), supresor de variegación 39 homólogo 1 (SUV39H1; responsable de H3K9me3), HP1g y cohesina están asociados a las repeticiones D4Z4 que están hipermetiladas. La proteína de unión a ADN específica de secuencia YY1 podría ser responsable del reclutamiento de estas proteínas a D4Z4.
- (B) En pacientes con DFEH, se pierden SUV39H1, HP1g, cohesina y H3K9me3, mientras que YY1, HMGB2, nucleolina, EZH2 y H3K27me3 se reducen. Finalmente, las unidades D4Z4 están hipometiladas, lo que permite la unión de CTCF a la repetición.

CTCF: factor de unión a CCCTC; EZH: potenciador del homólogo zeste; FSHD: DFEH; HMGB: proteína de alta movilidad con función estructural; HP: proteína heterocromática; SUV39H: Supresor del homólogo de variegación 39; YY: Yin Yang.

Dentro de la región de repeticiones D4Z4, se encuentran dos sitios de unión de CTCF, que muestran hipometilación en presencia de alelos con un número reducido de repeticiones D4Z4 (Roche S y cols., 2019; Ottaviani A y cols., 2009; Huichalaf C y cols., 2014; Hartweck LM y cols., 2013). La unión de CTCF a 4q35 muestra una correlación inversa con el número de copias de D4Z4 y funciona como un aislante de cromatina dependiente de las laminas A/C (proteínas de la membrana nuclear de la célula muscular), protegiendo a D4Z4 del silenciamiento epigenético por las regiones heterocromáticas circundantes, y manteniendo abierta la cromatina D4Z4 principalmente en alelos con un número reducido de repeticiones (<10)

(Bodega B y cols., 2009). Dado que también se ha demostrado que el CTCF media en la formación de bucles de cromatina y genera dominios de cromatina asociados topológicamente (TADs) (Hartweck LM y cols., 2013; Petrov A y cols. 2008; Gaszner M y cols., 2006; Ghirlando R y cols., 2016), el aumento de la unión de CTCF a D4Z4 en DFEH puede producir una alteración de la organización nuclear y de la cromatina. Proponen que la contracción del grupo de repeticiones D4Z4 contribuye a la fisiopatología de la DFEH actuando como un elemento aislante dependiente de CTCF y de las laminas A/C en los pacientes (Ottaviani A y cols., 2009).

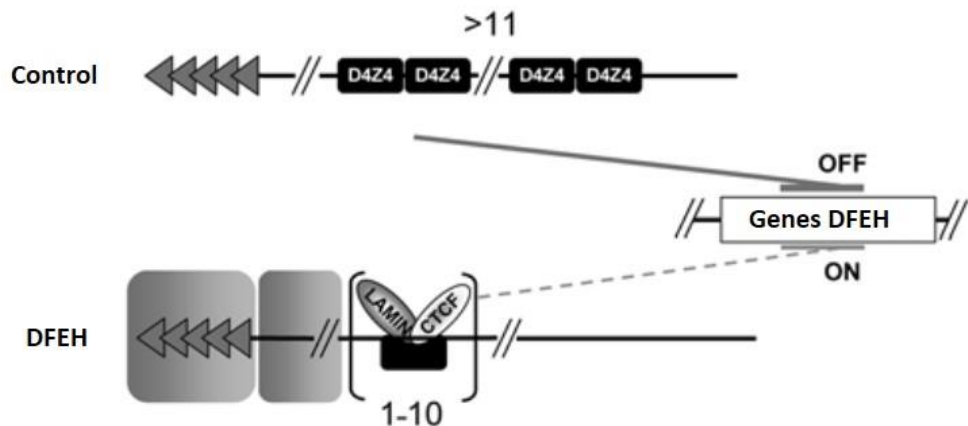


Figura 28. Modelo que explica el papel del elemento D4Z4 como aislante y su implicación en la alteración epigenética de la DFEH (Ilustración modificada de Ottaviani A y cols., 2009).

También se ha descrito D4Z4 como un aislante que protege del efecto posicional telomérico (TPE, *Telomeric Position Effect* en inglés). Los telómeros pueden regular la expresión génica atrapando la heterocromatina adyacente. Demostraron que el acortamiento de los telómeros conducía a la expresión de DUX4 como resultado de una disminución de la heterocromatina en 4q35 (Stadler G y cols., 2013 a y b).

Se ha postulado una relación entre la DFEH y la envuelta nuclear. En contraste con la mayoría de los telómeros, la región 4q35 relacionada con la DFEH se localiza en la periferia nuclear. La proteína nuclear lamina A/C es requerida para la localización de la cromatina de la región de la DFEH en la envuelta nuclear.

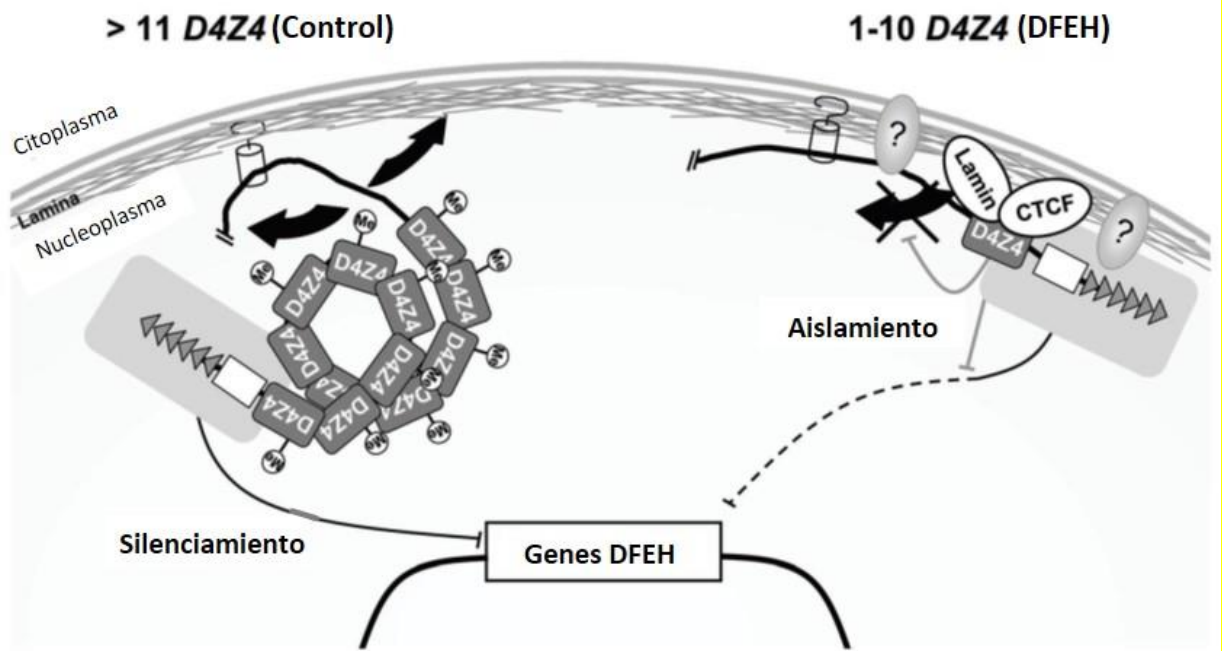


Figura 29. Modelo de la organización del locus 4q5 en individuos sanos y en pacientes con DFEH (Ilustración modificada de Ottaviani A y cols., 2010).

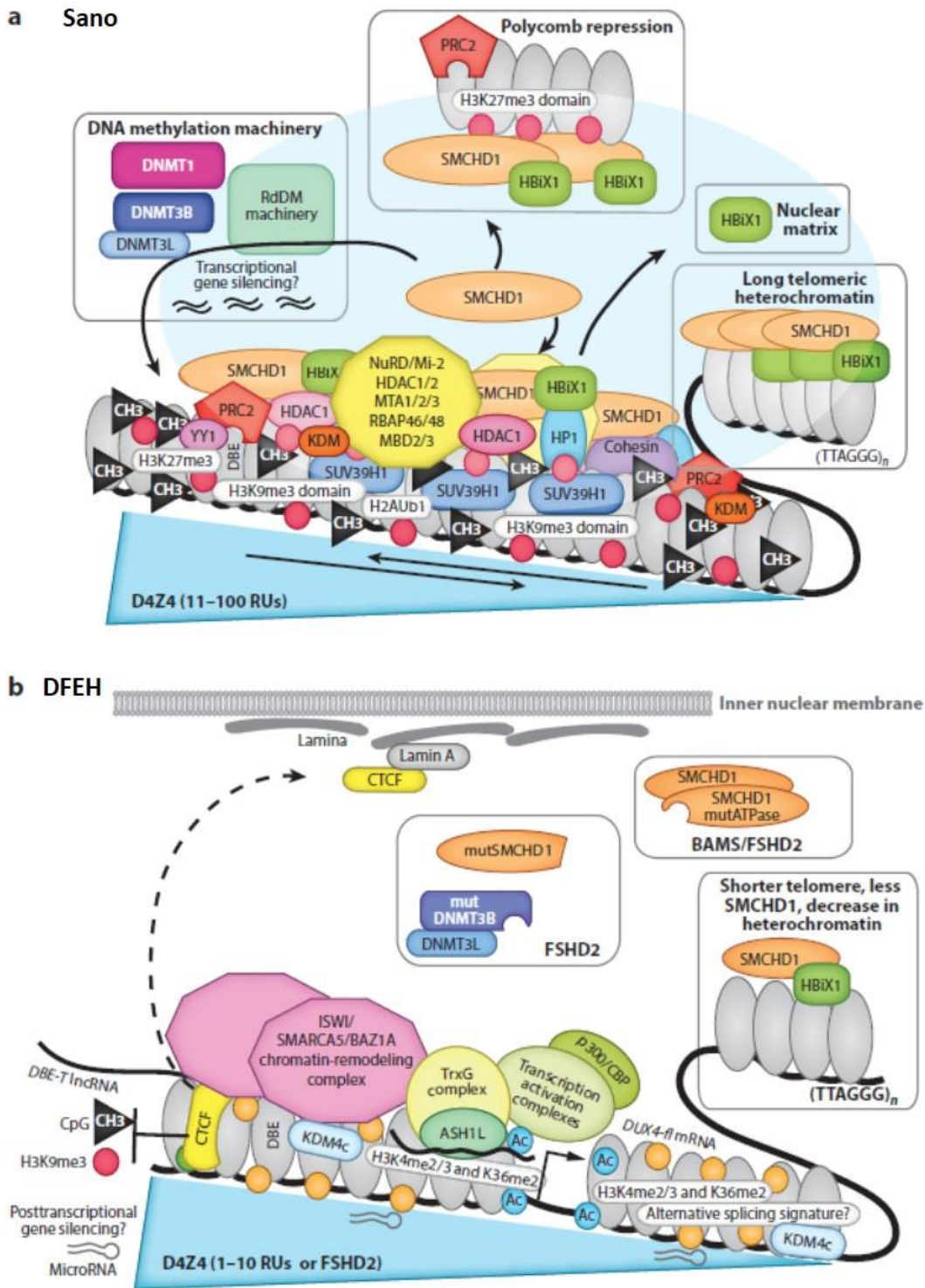


Figura 30. Regulación epigenética en D4Z4 en células musculares sanas y con DFEH. a) Los mecanismos normales de represión epigenética en la región de repeticiones D4Z4 está desregulada en miocitos con DFEH. b) En la DFEH, hay un reclutamiento alterado de factores que median el silenciamiento, la represión/activación transcripcional, las interacciones de largo alcance, la localización de la matriz nuclear, y la regulación telomérica. Abreviaturas adicionales: Ac, acetilación; BAMS, síndrome de microftalmia arrinia de Bosma; lncRNA, ARN largo no codificante; RdDM, metilación dirigida por ARN; RU, unidad de repetición (Ilustración tomada de Himeda CL y cols., 2019).

3. Aspectos clínico-genéticos

3.1. Patrón de herencia

En 1950, antes del descubrimiento de las causas moleculares de la DFEH, Tyler y Stephens concluyeron que la DFEH exhibía “un patrón de herencia mendeliano dominante típico”. Actualmente se acepta que la DFEH se hereda de forma autosómico dominante, aunque por lo menos un 10-30% de los casos no tienen historia familiar y son el resultado de mutaciones *de novo* (Padberg GW y cols., 1995; Zatz M y cols., 1995; Lunt PW, 1998; van der Maarel SM y cols., 2000). El hecho de que en familias con progenitores no afectados o muy levemente afectados se de más de un hijo afecto con DFEH, indica que la causa más probable de esto sea el mosaicismo parental en la línea germinal, y no una distrofia muscular diferente de la DFEH heredada de forma autonómica recesiva como sugería Moser H y cols. (1966). Como hemos visto en el punto anterior, la genética de la DFEH1 dista de ser sencilla y se deben heredar de manera conjunta la delección y el alelo permisivo. Dada la distancia corta entre estas regiones, la herencia se da de manera conjunta y se comportan como una herencia mendeliana dominante.

En el caso de la DFEH2 la herencia es digénica, ya que las mutaciones en el gen SMCHD1 y el alelo permisivo segregan independientemente, y esto permite la expresión del gen DUX4 en la última de las repeticiones D4Z4 del # 4.

3.1.1. Homocigotos y heterocigotos compuestos (efecto de dosis)

Aunque la mayoría de pacientes con DFEH portan un solo alelo con la enfermedad de acuerdo con el patrón de herencia dominante, se debatía sobre la existencia de si la aparente ausencia de pacientes con los dos alelos delecionados se debía a la rareza de la enfermedad o a la letalidad de esa constitución alélica.

Al aumentar el número de casos estudiados, se describieron dos casos de pacientes no relacionados heterocigotos compuestos para los alelos que transmiten la enfermedad en ambos cromosomas 4q (Wohlgemuth M y cols., 2003). Normalmente el alelo de mayor tamaño suele ser una variante 4qB y el de menor tamaño, 4qA. En este artículo se describe también que 2 fragmentos en el rango patológico no tienen por qué generar una mayor expresividad clínica en el paciente ya que puede ocurrir un efecto de dosage genético y la penetrancia de los alelos ser incompleta. En un estudio realizado en más de 1100 casos, se encontraron un 2.7% de casos de heterocigotos compuestos, y el 0.5% de estos casos tenía un haplotipo

permissivo 4qA en los dos alelos (Scionti I y cols., 2012). También se ha descrito un caso de homocigosidad en un paciente que portaba dos fragmentos 4qA de 24 kb con un fenotipo clásico y no más grave de lo que se podía esperar (Tonini MM y cols., 2004).

En el caso de las DFEH2 se han descrito 3 familias cuyo caso propositus era portador de dos variantes patológicas en el gen SMCHD1 (van der Boogaard ML y cols., 2015). Este estudio demuestra que tener dos mutaciones que afectan a la función del gen es compatible con la vida (Blewitt ME y cols., 2008).

Recientemente, se ha identificado una mutación en homocigosis en el exón 2 del gen LRIF1 (*Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1*) en un paciente con un fenotipo de DFEH (Hamanaka K y cols., 2020). Esta mutación resulta en la ausencia de la isoforma larga de la proteína LRIF1, la relajación de la cromatina en D4Z4, y la expresión de DUX4 y sus genes diana en los núcleos de los miocitos, sellos moleculares y epigenéticos de la DFEH. Se ha visto que la proteína codificada por el gen SMCHD1 está implicada en la compactación de la cromatina del cromosoma X inactivo (Xi) a través de la interacción con la proteína codificada por el gen LRIF1 (*Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1*). Los dos genes junto con la proteína heterocromática HP1 (*heterochromatin protein 1*), unen los dominios de las histonas H3K9me3 y XIST-H3K27me3 para organizar la estructura de la cromatina del # Xi (Norwood FL y cols., 2009). Por lo tanto, el gen LRIF1 es también un modificador epigenético de la región D4Z4 y gen responsable de la DFEH2 idiopática (Hamanaka K y cols., 2020).

3.2. Penetrancia

Una de las características de la DFEH entre los pacientes siempre ha sido la gran variabilidad en la gravedad clínica y en la edad de comienzo. En 1982, utilizando curvas de regresión, Padberg GW calculó que el 94,3% estaban clínicamente afectados a la edad de 20 años, aunque el 2,5% de los portadores podría no haber expresado el desorden a los 57 años de edad. En 1989, Lunt PW y cols. estimaron una penetrancia de menos del 5% para edades entre 0-4 años, del 21% para 10 años, del 58% para 15 años, del 86% para 20 años y del 95% por encima de los 20 años.

Gracias a las pruebas moleculares en los familiares sanos “en riesgo” se pudo confirmar molecularmente a los portadores del fragmento deleciónado en 4q35. En 1998 Zatz M y cols. en una primera serie de 52 familias brasileñas con DFEH, observaron que 19 de 131 individuos portadores del fragmento deleciónado permanecían asintomáticos y sugirieron una diferencia significativa entre varones y mujeres, encontrando una penetrancia del 95% para varones de 30 años, pero sólo del 69% para mujeres, dando una penetrancia combinada del

83% a la edad de 30 años. Posteriormente, Ricci E y cols. (1999) publicaron 7 casos no penetrantes con edades desde los 20 a los 69 años entre 220 individuos a riesgo no afectos, todos ellos con fragmentos en el rango de 21-27 kb. Teniendo esto en consideración, hay que ser cautos a la hora de definir a una persona como asintomática, ya que especialmente aquellas mayores de 30 años podrían presentar síntomas con un exámen clínico más detallado.

A pesar de encontrar portadores asintomáticos en aproximadamente el 30% de las 106 familias estudiadas con DFEH (506 individuos), algunas familias concentraron más casos no penetrantes con otros factores genéticos que seguramente contribuyen a la gravedad de la presentación clínica (Tonini MMO y cols., 2004). Un 20% de familiares de los 238 probandos que eran portadores de un fragmento reducido permanecían asintomáticos o mínimamente afectos.

Un 1% de los casos de pacientes portadores de fragmentos <38 kb, pueden explicarse por translocaciones homogéneas 4:10 en las cuales el grupo de repeticiones del # 4 reside en el # 10 y estos casos no son patológicos porque el origen del fragmento es el # 10 (posibles falsos positivos, tienen otra patología diferente a la DFEH1). Por otro lado, tenemos casos con fragmentos D4Z4 <38 kb que pueden confundir un alelo híbrido H1 (compuesto de repeticiones del # 10 seguidas de repeticiones del #4) en el # 4 y por tanto patológico, con un fragmento del # 10, no patológico, que tuviera el mismo patrón en la primera y tercera digestión (diferencia de 6 kb entre las dos digestiones) (casos de falso negativos).

En 2012, Lemmers RJ y cols., describieron mutaciones en el gen SMCHD1 que influyen en la penetrancia de la enfermedad en los pacientes con DFEH1 (Sacconi S y cols., 2013; Balog J y cols., 2015; Larsen M y cols., 2015). En el caso de la DFEH2 se encuentra un porcentaje similar de casos asintomáticos a la DFEH1 (Lemmers RJ y cols., 2012).

Estas observaciones sugieren que aún no conocemos completamente la complejidad genética que da lugar a la DFEH y que queda mucho por saber sobre el contexto genético que puede modular la presentación de la enfermedad.

3.3. *Influencia del sexo en la presentación clínica*

Los primeros estudios no distinguieron cambios entre la edad de comienzo, la gravedad o la penetrancia relacionados con el género, hasta que Becker PE en 1953 estableció una diferencia en gravedad de pacientes mujeres y, en otro trabajo Chung CS y Morton NE (1959) encontraron diferencias de género en la edad de comienzo de la clínica.

Se han descrito en varios trabajos antiguos una influencia específica de género en el grado, edad de comienzo y velocidad de la progresión de la enfermedad en la DFEH (Padberg

GW, 1982; Lunt PW y cols., 1989; Lunt PW y Harper PS, 1991; Padberg GW 1998; Zatz M y cols., 1998; Tonini MM y cols., 2004). Se ha propuesto que la edad de comienzo de la enfermedad es invariablemente más tardía en mujeres y que además presentan una forma de la enfermedad menos grave (Tonini MMO y cols., 2004). Algunos trabajos proponen que esto puede estar relacionado con el estatus hormonal que de alguna manera confiere un efecto protector leve (Zatz M y cols., 1998). En concordancia con este punto de vista, la progresión de la enfermedad en mujeres se ve considerablemente acelerada después de la menopausia (disminución de estrógenos). También ha sido observado que la proporción de mujeres mosaico es significativamente mayor que la de varones mosaico (Zatz M y cols. 1998, Van der Maarel SM y cols., 2000) aunque los varones con mosaicismo presentan síntomas con más frecuencia que las mujeres con mosaicismo, y que para un determinado tamaño de mutación, los varones requieren un porcentaje considerablemente menor de células mutadas que las mujeres para manifestar los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, los varones con mosaicismo tienden a presentarse como el caso índice de mutación *de novo*, mientras que las mujeres mosaico tienden más a encontrarse como progenitor asintomático de un aparentemente caso *de novo* no mosaico, pero generalmente severo, en una familia (van der Maarel SM y cols., 2000).

La investigación de la posible correlación del nivel de metilación con la gravedad de la enfermedad (Balog J y cols., 2012) reveló que los varones predominaban en el grupo con un curso más grave de la enfermedad y una mayor hipometilación de la región de repeticiones D4Z4. Sin embargo, de acuerdo con el trabajo de Lemmers RJ y cols., en 2015 en una muestra de más de 500 pacientes, los niveles de metilación no diferían estadísticamente entre los dos sexos, por lo que la controversia sobre la relación del sexo y el fenotipo de DFEH y sus bases moleculares todavía se mantiene.

3.4. Anticipación

Definimos la anticipación clínica en la DFEH como el comienzo más temprano de la enfermedad en sucesivas generaciones (Zatz y cols., 1995). La anticipación clínica fue confirmada por otros autores en distintas poblaciones (Zatz M y cols., 1995; Goto K y cols., 1995; Lunt PW y cols., 1995 Muscle Nerve; Tawil R y cols., 1996). Aunque la mutación permanezca igual en todos los casos dentro de una familia (Lemmers RJ y cols., 1998), a veces el problema inherente en estos análisis es que el dato de la edad de inicio de síntomas clínicos no siempre es exacto y como consecuencia las conclusiones pueden no ser fiables. Además, algunos portadores asintomáticos o mínimamente afectados no son conocedores de que tienen

alguna debilidad. El grupo de Zatz M y cols. ha reevaluado los datos con un número grande de familias con muchos pacientes de comienzo tardío que han sido seguidos durante más de 20 años. En esa muestra se estudiaron las diferencias de la edad de comienzo en tres generaciones, siendo estadísticamente significativas las diferencias entre las generaciones I y II pero no entre la II y III, sugiriendo la presencia de anticipación clínica sólo entre las dos primeras generaciones lo que puede sugerir un sesgo de memoria (cuando hay conciencia de enfermedad en la familia no hay anticipación). Es importante señalar que en la generación I hay una mayor proporción de individuos asintomáticos o mínimamente afectados mientras que en la generación II, la mayoría de los casos tienen una presentación clínica clásica. Una hipótesis especulativa es que el fenotipo podría ser más estable (entre 2 generaciones) entre individuos con el fenotipo clásico que entre los asintomáticos o mínimamente afectados los cuales tendrían una mayor posibilidad de tener una descendencia sintomática más que asintomática. Esto podría explicar por qué no se encuentra anticipación en algunas genealogías donde hay muchos individuos con la forma clásica de DFEH (Ricci G y cols., 2013).

Zatz M y cols. (1998) también observaron que entre la descendencia de 27 descendientes nacidos de 15 madres asintomáticas, había significativamente más hijos afectados (20) que hijas (7). Este hallazgo suscitó la pregunta de si la anticipación clínica no sólo difería entre hijos sino si estaba también influenciada por la transmisión parental y/o el género de la descendencia. Para testar esta hipótesis en una gran muestra, compararon cuatro posibles transmisiones: madre-hijo con una frecuencia de anticipación del 84,4%, transmisión madre-hija (67,7%), transmisión padre-hijo (50%) y transmisión padre-hija (68,4%). Por lo tanto, aunque ocurre en todos los grupos, la anticipación clínica parece significativamente más frecuente para transmisiones madre-hijo, con posibles implicaciones en el consejo genético.

El 40% de los casos *de novo* de deben a un mosaicismo somático y normalmente presentan una clínica más leve, lo que nos puede llevar a estimar una anticipación aparente ya que su descendencia va a estar más precoz y gravemente afectada (van der Maarel SM y cols., 2000). Cuando fueron analizadas las edades de comienzo y la valoración fue hecha dentro de cada familia, se observó que la anticipación clínica ocurría en el 70% de las familias y en el 63,7% cuando los portadores mosaico asintomáticos eran excluidos.

Actualmente, no hay disponible una explicación satisfactoria para la posible anticipación y se necesitan estudios a mayor escala con una buena caracterización clínica para confirmar o rechazar la existencia de anticipación en la DFEH (Zernov N y Skoblov M, 2019).

3.5. Correlación clínico-molecular

Como ha quedado visto, el diagnóstico clínico de la DFEH es a menudo difícil ya que el comienzo de la enfermedad y la expresión fenotípica es extremadamente variable, tanto dentro de una misma familia como entre familias (Lunt PW y cols., 1995 Hum Mol Genet; Padberg GW y cols., 1995). Unos miembros de una familia pueden mostrar una grave incapacidad con afectación de otros órganos además del músculo esquelético (retina, oído), mientras otros familiares portadores permanecen casi asintomáticos.

Como marcadores clínicos de la enfermedad en las diferentes poblaciones estudiadas por todo el mundo (Jardine PE y cols., 1994; Lunt PW y cols., 1995 Hum Mol Genet; Lunt PW y cols., 1995 Muscle Nerve; Zatz M y cols., 1995; Tawil R y cols., 1996; Padberg GW, 1998), se han utilizado la edad de comienzo, la edad en la que se requirió silla de ruedas, o directamente la gravedad clínica medida mediante diferentes escalas.

A pesar de la relación que existe entre el defecto genético y el fenotipo clínico en los pacientes con DFEH, no es posible predecir la gravedad de la expresión de la enfermedad en un individuo concreto debido a la alta variabilidad intrafamiliar observada (Butz M y cols., 2003; Tonini MM y cols., 2004) teniendo en cuenta el hecho de que todos los miembros afectados de la familia exhiben el mismo tamaño de fragmento patológico *EcoRI* (Wijmenga C y cols., 1992; Upadhyaya M y cols., 1993; Wijmenga C y cols., 1993 *Neuromusc Disord*). Esto hace que con la información actual no se pueda dar un consejo adecuado sobre la evolución de la enfermedad a un paciente en función de su patología molecular.

A pesar de estas limitaciones, al estudiar las grandes series sí se establece una relación inversa entre el tamaño del fragmento y la severidad y progresión de la DEFH1 (Lunt PW *et al.*, 1995). Los pacientes con DFEH1 que tienen un menor número de repeticiones D4Z4 (1-3 unidades) a menudo están más severamente afectados (Tawil R y cols., 1996). Esta correlación se da en el rango de fragmentos pequeños (de 10-18 kb, mientras que en rangos intermedios (18-30 kb) y próximos al límite patológico (mayores de 30 kb) existen dificultades crecientes para establecer una correlación genotipo-fenotipo debido a esa gran variabilidad en el grado de debilidad muscular observada en estos pacientes (Lunt PW y cols., 1995; Butz M y cols., 2003).

En el rango superior de tamaño del fragmento que se puede asociar con síntomas clínicos (es decir, 9-11 repeticiones o 35-42 kb), parece probable que la población con DFEH y la población control compartan estos rangos por lo que se le ha denominado zona gris, en la que la asignación de causalidad de la enfermedad al fragmento requiere de más estudios. No se han publicado mutaciones *de novo* para fragmentos en este rango, donde la penetrancia es muy baja (Lunt PW y cols., 1995 Muscle Nerve; Busse K y cols., 2000; Lunt PW, 2000; Tonini

MM y cols., 2004). En estudios posteriores (Scionti I y cols., 2012; Ricci G y cols., 2013) se ha publicado que un 3% de la población control porta fragmentos en el rango patológico con 4-8 repeticiones. Además, se ha observado que el 1.3% de la población control porta un haplotipo permisivo 4qA161, y que el 2% de la población control tiene un fragmento en el rango patológico que es variante 4qA. Dentro del rango de las 7-8 repeticiones han encontrado una gran variabilidad fenotípica constituyendo un subgrupo genético diferente de la forma clásica de DFEH. Se ha determinado en población italiana, que un 1.7% de la población control es portadora de un fragmento de 7-8 repeticiones D4Z4. Por estos motivos, este grupo de pacientes necesita no solo la confirmación molecular si no también una precisa caracterización clínica de los pacientes y familiares que accedan a realizarse el estudio molecular y así poder dar un consejo genético más certero, algo que no siempre es posible (Ruggiero L y cols., 2020).

Parece que en esos rangos próximos a las 38 kb, los modificadores de la cromatina que actúan en D4Z4 juegan un papel muy importante en la susceptibilidad de la cromatina de esa región a relajarse, aunque la naturaleza de esos factores no se conoce del todo (Lemmers RJ y cols., 2015). El nivel de metilación del alelo 4qA en miocitos y sangre derivada de pacientes sintomáticos con fragmentos próximos al límite patológico, es menor que en los familiares asintomáticos en esas familias (Jones TI y cols., 2015). Parece que en estos rangos de fragmentos próximos al límite (zona gris) la metilación no viene solo dada por el tamaño del fragmento y que se requiere otro factor (ya sea genético, epigenético o ambiental) para expresar la enfermedad (Statland JM y cols., 2015). Aunque esto sugeriría que los individuos con fragmentos próximos al límite patológico están más frecuentemente no afectados, también se han identificado casos portadores de un alelo permisivo con un fragmento de 1-3 repeticiones que no están afectados (Nikolic A y cols., 2016). En un estudio de una cohorte de pacientes entre los 0 y 17 años y otra cohorte de pacientes de comienzo temprano con 22 años de seguimiento, se ve que existe también un amplio rango de gravedad de la enfermedad que abarca el espectro completo de la DFEH, con algunos pacientes en silla de ruedas mientras otros todavía podían andar sin ayuda (Goselink RJM y cols., 2018). Esto indica que las bases fisiopatológicas que definen el fenotipo y la gravedad clínica de los pacientes de comienzo temprano todavía no son bien comprendidas.

Estos estudios muestran que el estado epigenético y la actividad transcripcional de la contracción D4Z4 no está relacionada perfectamente con el número de unidades en el alelo permisivo, y que otros modificadores epigenéticos juegan un papel en el grado de relajación de la cromatina en esa región. Un ejemplo de factor modificador es el gen SMCHD1 que influye en la expresión del gen DUX4 (Lemmers RJ y cols., 2012; Balog J y cols., 2015). Cuando un

fragmento de tamaño próximo al límite (DFEH1) se hereda junto a una mutación en el gen SMCHD1 (DFEH2) se observa un fenotipo más grave (denominado DFEH1+DFEH2) (Sacconi S y cols., 2013). De forma similar, el gen DNMT3B puede actuar como un modificador de la enfermedad en familias con DFEH1 (van der Boogard ML y cols., 2016).

Aunque nos hemos referido a la DFEH2 como la forma de DFEH independiente de la contracción, un amplio análisis en controles y pacientes con DFEH2 ha revelado también una dependencia del tamaño del fragmento (Lemmers RJ y cols., 2015). La media del tamaño del fragmento encontrada en este trabajo en controles es de 115 kb (33 repeticiones), mientras que en los pacientes con DFEH2 es de 60 Kb (16 repeticiones) (de Greef JC y cols., 2010; Lemmers RJ y cols., 2015). Como excepción a esta norma, se han encontrado algunos casos que tenían fragmentos inusualmente grandes (>70 Kb) pero que se explicaron con la presencia de eventos de duplicación en D4Z4 (Nguyen K y cols., 2017; Lemmers RJ y cols., Hum Mol Genet. 2018).

Se han mostrado evidencias de que la DFEH tipo 1 y tipo 2 forman un continuo de enfermedad (Sacconi S y cols., 2019). En este trabajo se llevó a cabo un análisis del efecto combinado del tamaño del fragmento D4Z4 y de la mutación en SMCHD1 en el estado de metilación en la región D4Z4. Este estudio mostró que los niveles de metilación en los pacientes con DFEH1+DFEH2 (9 o 10 repeticiones combinado con una mutación en SMCHD1) y en los pacientes con DFEH2 (>11 repeticiones con una mutación en SMCHD1) forman una escala continua junto a los pacientes con DFEH1. Estos niveles bajos de metilación en D4Z4 están asociados a una mayor gravedad de la enfermedad (corregida por la edad) y a una progresión más rápida (Sacconi S y cols., 2019).

La gravedad de los pacientes con DFEH2 está determinada en parte por el tamaño del fragmento en el alelo permisivo y en parte también por el tipo de mutación. En general, las mutaciones sin sentido dan un fenotipo más grave que las mutaciones de cambio de pauta de lectura o codón de parada que causan haploinsuficiencia (pérdida de función) (Lemmers RJ y cols., 2015; Brideau NJ y cols., 2015; Hamanaka K y cols., 2016). En estudios recientes se ha identificado la pérdida de una copia del gen SMCHD1 a través de microdeleciones del # 18p, o la pérdida del brazo corto del # 18 en el síndrome de deleción 18p (18p-) (Balog J y cols., 2018; Lemmers y cols., 2015) que se asocia a una expresión de DUX4 en los mionúcleos cuando está presente un alelo permisivo 4qA (Balog J y cols., 2018). Aunque estos pacientes presentan un amplio rango de síntomas no relacionados, en algunos casos se detectaron características clínicas de la DFEH, demostrando que la pérdida de una copia de SMCHD1 puede causar DFEH2 (Balog J y cols., 2018; Renard D y cols., 2018).

Cuando los pacientes con DFEH, ya sean DFEH1 o DFEH2, tienen más de un alelo permisivo 4qA, puede ocurrir que la expresión bialélica de DUX4 resulte en una mayor susceptibilidad a la presentación de la enfermedad causando un fenotipo más grave (Lemmers RJ y cols., 2018). Si la presentación clínica es mucho más leve de lo que cabría esperar para ese tamaño de fragmento, se debería considerar la posibilidad de mosaicismo somático para una mutación *de novo* (van der Maarel SM y cols., 2000).

3.6. Estudios complementarios

Aunque el dato definitivo para la evaluación de pacientes con sospecha de DFEH es el estudio genético, se pueden hacer otra serie de estudios más inespecíficos pero que orienten el diagnóstico, como son:

Creatina fosfoquinasa (CPK): los análisis de laboratorio de muestras de sangre de pacientes con DFEH pueden demostrar un nivel normal o moderadamente incrementado de la CPK; sin embargo, estos niveles raramente superan cinco veces el límite superior (Ricci G y cols., 2014).

Electromiograma (EMG): el EMG mide la actividad eléctrica del músculo y muestra signos inespecíficos de daño muscular. Los estudios de EMG se caracterizan por potenciales polifásicos de baja amplitud presentes durante breves intervalos de tiempo (Orrell RW, 2011).

Resonancia magnética (RM): los parámetros de resonancia magnética del músculo se correlacionan con las medidas de resultado clínico y la gravedad de la enfermedad. Los estudios de RM clásicamente reflejan que el tejido muscular sano está siendo reemplazado por áreas de tejido graso y fibroso. Antes del reemplazo graso y fibroso, las imágenes de RM en T2 demuestran un aumento del contenido de agua en los músculos afectados (Tasca G y cols., 2012). Además, las secuencias STIR (secuencias ponderadas en T2 con anulación de la señal de la grasa) detectan la inflamación del músculo, reflejando potencialmente una fase más activa de la enfermedad (Tawil R y cols., 2016; Mul K y cols., 2017; Frisullo G y cols., 2011). Esta correlación entre la señal STIR y la enfermedad activa es de particular interés, ya que esos músculos pueden tener un mayor riesgo de degeneración y, por lo tanto, un objetivo ideal para el tratamiento y el seguimiento de los efectos del tratamiento. Se están realizando estudios longitudinales para evaluar la sensibilidad de la resonancia magnética como un biomarcador de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo (Hamel J y Tawil R, 2018). La RM es una herramienta eficaz para diferenciar la DFEH de otro tipo de distrofias ya que es capaz de identificar su afectación muscular específica y asimétrica, dirigir el diagnóstico molecular y llevar un seguimiento de la enfermedad (Gerevini S y cols., 2016). En un estudio

reciente, se detectaron similitudes y diferencias entre la DFEH1 y DFEH2; diferencias en un gradiente rostro-caudal, con una participación predominante de los músculos de MMII en comparación con la cintura escapular y mayor porcentaje de hiperintensidades STIR en la DFEH2 (Giacomucci C y cols., 2020).

Biopsia muscular: cuando se realiza una biopsia de tejido muscular en pacientes con DFEH, las fibras musculares muestran patrones alternos de degeneración y regeneración, redondeo, fibrosis, un mayor número de núcleos internos e inflamación de los linfocitos (Statland JM y cols., 2015). La disponibilidad del estudio genético, permite establecer definitivamente el diagnóstico sin necesidad de la biopsia de músculo más invasiva y menos específica. En el caso de que el estudio genético para la confirmación del diagnóstico de DFEH sea negativo, deben considerarse otros estudios genéticos adicionales a la biopsia muscular (Lemmers RJ y cols., 2012). Por otro lado, la expresión génica en la biopsia muscular se ha incluido como biomarcador de eficacia en la mayoría de ensayos con inhibidores de DUX4.

Otras evaluaciones recomendadas a tener en cuenta a la hora de valorar la clínica de un paciente con DFEH de cara a un ensayo clínico son las siguientes:

La FSHD-COM (*Facioscapulohumeral Composite Functional Outcome Measure*) es un evaluador de 18 tareas motoras funcionales validadas individualmente (Eichinger K y cols., 2018). Las regiones del cuerpo representadas coinciden con las áreas de importancia identificadas por los pacientes e incluyen: función de la pierna, función del hombro y del brazo, función del tronco, función de la mano y el equilibrio. La escala total tiene 72 puntos, dando un mayor peso a las áreas funcionales que se ha observado más preocupan a los pacientes: función de la pierna, del hombro y del brazo. Cada elemento individual se puntúa de 0 a 4, donde 4 representa la peor puntuación en relación a la función y 0 la puntuación de una función normal, no afectada. Esta medida sirve para evaluar las diferencias funcionales tanto en pacientes ambulatorios como en los que no lo son.

La miografía de impedancia eléctrica (*EIM – Electrical Impedance Myography -*) es un test no invasivo para medir la impedancia de los músculos en un rango de frecuencia entre 1 kHz y 10 MHz, aplicando una corriente eléctrica de baja intensidad (< 1mA) mediante unos electrodos, cuyo voltaje resultante se mide usando otros electrodos que lo convierten a parámetros de resistencia (R) y reactancia (X) con la finalidad de valorar los músculos de los individuos con enfermedad neuromuscular. El test dura 30 min y ha demostrado en estudios previos de DFEH su reproducibilidad, validez y sensibilidad (Statland JM y cols., 2016; Mulk K y

cols., 2018). Se valoran los siguientes músculos: deltoides, bíceps, tríceps, vasto lateral, tibial anterior y gastrocnemio medio, y cada músculo normalmente se mide 3 veces.

La MFMI (*Motor Function Measure Domain 1*) es un test validado (Vuillerot C y cols., 2012) relacionado con la posición de pie y los cambios de posición, que consta de 13 puntos y que se tarda en realizar 10 min.

La función facial (IOPI) es una prueba para cuantificar la fuerza bucal, de los labios y la lengua con datos publicados dentro de unos rangos normativos para mediciones linguales (Adams V y cols., 2015). Las pruebas de resistencia se realizan pidiendo al sujeto que mantenga el 50% de la presión máxima de los labios durante el mayor tiempo posible mientras ve la luz de la pantalla de IOPI para medir el 50% del esfuerzo. Lo mismo para valorar la parte anterior y posterior de la lengua, la fuerza bucal y la fatiga.

Espacio de trabajo accesible: los pacientes se sientan frente a una cámara estereó y realizan un protocolo estandarizado de las extremidades superiores bajo la supervisión de un evaluador clínico (Han JJ y cols., 2013 y 2015). Se añaden 500 gr. de peso en las muñecas del sujeto. El grupo de movimientos estandarizados consiste en levantar el brazo desde la posición de reposo hasta por encima de la cabeza manteniendo el codo extendido, realizando el mismo movimiento en planos verticales en torno a 0, 45, 90 y 135 grados. El segundo conjunto de movimientos consiste en barridos horizontales a nivel del ombligo y el hombro. Cada conjunto de movimientos se repite 3 veces con el brazo izquierdo y derecho. Se ha demostrado, que una reducción en el espacio de trabajo accesible refleja el deterioro de la fuerza de las extremidades superiores en la DFEH (Han JJ y cols., 2015).

Test de fuerza se realiza utilizando el MMT (*Manual Muscle Testing*) basado en una escala de 10 puntos modificada de la del Consejo de Investigación Médica (*Medical Research Council*) con posiciones estandarizadas para cada músculo, y la prueba de fuerza de agarre isométrica máxima de la mano se realiza usando un dinamómetro de fuerza manual (Personius KE y cols., 1994; Tawil R y cols., 1994).

Función respiratoria con la que se obtiene la capacidad vital forzada y el volumen de espiración forzado en 1 segundo, medidas estandarizadas en la práctica clínica.

El test de caminar durante seis minutos (*6MWT – six minute walking test-*): valora la capacidad aeróbica y la resistencia durante la actividad física (incluye los sistemas pulmonar y cardiovascular, la circulación sanguínea y periférica, las unidades musculares y el metabolismo corporal).

Las escalas de gravedad clínica que se determinarán mediante un examen físico específico y una prueba de fuerza (MMT) son dos, la Escala de severidad clínica (*CSS – Clinical*

Severity Score-) y la Escala clínica de la DFEH (FCS – FSHD Clinical Score) (Ricci E y cols., 1999; Lamperti C y cols., 2010). Las puntuaciones de gravedad clasifican la debilidad en la cara, los hombros, los brazos, las MMII distales y proximales en una escala de o bien 10 puntos (CSS) o de bien 15 puntos (FCS). Ambas escalas se han utilizado en estudios genéticos para identificar individuos con DFEH mediana y gravemente afectados con buenos resultados.

Medidas de los síntomas informados por el paciente como importantes:

- El cuestionario *FSHD-HI (FSHD-Health Index)* se diseñó para medir tanto la calidad de vida como la salud general del paciente con DFEH con 14 apartados específicos: 1) movilidad y deambulación; 2) debilidad motora fina y distal del brazo; 3) limitación proximal de la extremidad superior y del hombro; 4) debilidad del tronco; 5) deterioro de la actividad específica; 6) angustia emocional; 7) imagen corporal alterada específica; 8) discapacidad cognitiva; 9) insatisfacción con el rol social; 10) limitaciones sociales; y síntomas específicos de la DFEH como: 11) fatiga; 12) dolor; 13) dificultades de comunicación/debilidad facial; y 14) disfunción gustativa. Cada uno de estos apartados han sido previamente identificados por los pacientes con DFEH como los que tienen mayor importancia para ellos (Johnson NE y cols., 2012; Hamel J y cols., 2019).

- El *PROMIS57* es un instrumento probado en poblaciones generales que genera puntuaciones para la función física y el impacto de las limitaciones físicas en la vida diaria (Cella D y cols., 2010; Personius KE y cols., 1994).

- La *UEFI15 (Upper Extremity Functional Index)* es una medida validada en pacientes para medir la disfunción de la extremidad superior (Hamilton CB y cols., 2013; Chesworth BM y cols., 2014).

- La escala física *FDI (Facial Disability Index)* es un cuestionario que consta de 5 preguntas que valoran el impacto físico de la debilidad facial (VanSwearingen JM y cols., 1996) y también evalúa el promedio de caídas mensuales y el promedio semanal de ejercicio realizado.

- La guía para determinar los cambios clínicos mínimos importantes: para conseguir esto se les pide a los pacientes que rellenen un cuestionario “*domain-delta*” para valorarse a sí mismos y determinar su percepción de salud general y calidad de vida al principio del estudio y mensualmente hasta que finalice el estudio, que sirve para acompañar al cuestionario *FSHD-HI* (Johnson NE y cols., 2012; Hamel J y cols., 2019).

HIPÓTESIS

En una tesis como ésta, que abarca el trabajo de reflexión y conceptualización realizados en torno el diagnóstico de la DFEH en los últimos 20 años, la hipótesis y objetivos, necesariamente han ido modificándose con el tiempo, a medida que avanzaba el conocimiento de la enfermedad y se completaba el conocimiento de las bases moleculares de la DFEH1, y posteriormente de la DFEH2.

La DFEH es un síndrome clínico-genético con un diagnóstico molecular complejo que necesita de una caracterización de los defectos genéticos en diferentes planos (genético y epigenético) en la población con una sospecha clínica de sufrir la enfermedad o de ser portadora por ser familiar de un caso confirmado. Esta dificultad diagnóstica se traslada al consejo genético reproductivo ya sea éste prenatal o preimplantacional, con dificultades técnicas derivadas tanto de la toma de muestras, de la calidad del ADN obtenido, etc... que se añaden al propio proceso diagnóstico. Nos planteamos por tanto como hilo conductor de la hipótesis de esta tesis que el diagnóstico molecular de la DFEH en contexto clínico debe adaptarse a la situación de cada caso para resolver las particularidades genéticas concretas y ser útil en la clínica.

En este sentido no en todos los casos vale con la detección del fragmento patológico y la caracterización de los haplotipos permisivos, sino que la hipometilación de la región del cromosoma 4 es un componente clave en el desarrollo de la enfermedad con la hipótesis de que podría correlacionar con la gravedad y con el pronóstico funcional.

Otro aspecto contemplado en la hipótesis es que el diagnóstico diferencial con otras patologías musculares no es fácil desde el punto de vista clínico lo que, unido a la gran heterogeneidad clínica presente incluso dentro de una misma familia, hace que el diagnóstico molecular sea una pieza clave para diferenciar la DFEH de otras entidades clínicas próximas, algunas de las cuales comparten incluso rasgos epigenéticos.

Esta tesis pretende establecer las diferentes aproximaciones técnicas a aplicar en cada caso, estableciendo el mejor algoritmo diagnóstico que permita resolver la complejidad existente (translocaciones entre los cromosomas 4 y 10, deleciones de la región de la sonda que reconoce el fragmento patológico en el caso de la DFEH1, casos de mosaicismo, etc.) con el mejor rendimiento diagnóstico para un correcto abordaje del diagnóstico de la DFEH.

OBJETIVOS

1. Establecer el mejor flujo de trabajo en el diagnóstico molecular de los diferentes subtipos moleculares de la DFEH (DFEH1 y DFHE2) y resolver los casos complejos de DFEH1 en contexto clínico.
 - a. Valor diagnóstico de la electroforesis horizontal (LGE)
 - b. Aportaciones al diagnóstico de los nuevos hallazgos:
 - i. Electroforesis de campo pulsante (PFGE)
 - ii. Variante permisiva y los haplotipos SSLP

2. Caracterización molecular de una serie extensa de pacientes con sospecha de DFEH mediante el estudio de la delección D4Z4 en la DFEH1 y de los genes SMCHD1 y DNMT3B en la DFEH2.
 - a. Correlación con la clínica
 - b. Evolución temporal de la tasa de diagnósticos positivos y negativos

3. Análisis de la metilación en la región D4Z4, en pacientes con diagnóstico molecular confirmado de DFEH1 y DFEH2 y estudio de su correlación con la clínica.

4. Establecer el valor de un algoritmo de diagnóstico molecular integrado (genético/epigenético) en un contexto clínico-asistencial incluyendo el diagnóstico prenatal cuando hay una sospecha de DFEH.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Origen de los pacientes y tipos de muestras

Los pacientes incluidos en este estudio se han reclutado desde la Unidad de Neuromuscular del Hospital Universitario Donostia (HUD) y desde otros centros hospitalarios de España, tanto públicos como privados y también del extranjero para realizar el estudio molecular de las patologías a estudio, en su mayoría para el estudio de DFEH, pero también para realizar el diagnóstico de otras entidades en que su fenotipo puede asemejarse a la de una DFEH.

Tras obtener el consentimiento informado de cada paciente o sujeto a riesgo en el centro de origen de la muestra, se procedió a la extracción de la muestra de sangre periférica mediante venopunción para su posterior procesamiento y obtención de ADN.

En nuestro laboratorio recibimos indistintamente sangre periférica fresca en EDTA o, el ADN extraído (se recomienda una extracción manual ya que la extracción automática fragmenta el ADN y no preserva bien los fragmentos de ADN de alto peso molecular y el rendimiento es menor). En el caso de los diagnósticos prenatales recibimos la biopsia de vellosidad corial en la semana 12 o bien el ADN fetal extraído, o bien amniocitos cultivados durante unas 3 semanas o bien su ADN fetal extraído.

2. Recogida de datos

Tanto la información clínica que acompaña a las muestras enviadas como los resultados del estudio molecular han sido recogidos en una base de datos de Access protegida con clave.

Los individuos con DFEH se han clasificado en relación a la existencia de antecedentes familiares (AF) de enfermedad neuromuscular en su familia o no como:

- Esporádicos o casos *de novo*: Si no existían antecedentes familiares de DFEH confirmada ni evidencias de enfermedad neuromuscular en su familia.

- Casos familiares: aquellos en los que existía más de un caso con DFEH en su familia (caso *propositus* con progenitores u otros ancestros afectados). Dentro de los casos familiares puede darse un caso *de novo* al estudiar el caso *propositus* con progenitores asintomáticos.

3. Estudio molecular de la distrofia facioescapulohumeral tipo 1 (DFEH1)

Basándonos en nuestra experiencia de los dos primeros años, establecimos de partida unos **criterios mínimos de calidad para el diagnóstico molecular postnatal:**

- Recibir como mínimo 10 ml de sangre periférica fresca en EDTA (tubo con tapón lila), idealmente recién extraída y enviada el mismo día de la extracción, o refrigerada a 4°C hasta el día siguiente de la extracción en que se envíe la muestra.

- Si lo que se recibe es ADN extraído, se precisa un mínimo de 30 µg de ADN (para realizar las 3 digestiones por duplicado en cada paciente) y que la concentración sea superior a 400 ng/µl. La extracción de ADN debe ser manual, no automática, ya que se preserva de esta manera mejor la integridad del ADN y se evita la fragmentación.

Estos criterios mínimos de calidad en el caso de los prenatales son extremadamente importantes. Es muy importante que en el centro que se realice la biopsia de vellosidad corial se tenga experiencia, tanto en la obtención de la muestra como en la extracción de ADN de forma manual, no automática (el rendimiento es mucho menor y el ADN está fragmentado).

3.1. Extracción de ADN a partir de sangre periférica

El ADN de todas las muestras se ha extraído manualmente a partir de sangre periférica según el método "*Salting out procedure*" descrito por Miller SA y cols. (1988). Se aísla el ADN a una concentración aproximada de 500 ng/µl.

3.2. Extracción de ADN a partir de vellosidad corial o líquido amniótico

En el caso de estudio molecular en prenatales, el material de partida es una biopsia de vellosidad corial (~20 mg) extraída en la semana 11-12 de embarazo o líquido amniótico extraído entre las semanas 14-16 de embarazo. A partir de la vellosidad corial directamente o a partir de los amniocitos cultivados durante 2-3 semanas tras la amniocentesis (4-5 flask T25 confluentes) se procede a la extracción del ADN fetal (**ANEXO 1**).

3.3. Medida de la concentración de ADN

La concentración de ADN se ha medido determinando la absorbancia a 260 nm y a 280 (Davis y cols., 1986) con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

3.4. Estudio molecular mediante electroforesis horizontal estándar (LGE – Linear Gel Electrophoresis -)

Como herramienta habitual para realizar el diagnóstico molecular de la DFEH se ha utilizado la electroforesis horizontal estándar.

En los casos prenatales también se realiza el estudio mediante LGE y Southern blot (método directo), pero si se trata de un caso familiar en el que contamos con varios individuos afectados y sanos, podemos realizar en paralelo, el método indirecto mediante marcadores proximales a la región de repeticiones D4Z4 en el # 4 (**ANEXO 5**).

3.4.1. Discriminación del fragmento patológico mediante triple digestión enzimática (*EcoRI*, *EcoRI/BlnI*, *XapI*)

Se realiza la digestión del ADN mediante una triple digestión con los enzimas de restricción *EcoRI* (Cat. No. 1040A, Takara Bio), *EcoRI/BlnI* (Cat.No. 751022A, Takara Bio), *XapI* (Cat. No. 10733911, Thermofisher), con una incubación a 37°C durante un mínimo de 6h.

3.4.2. Electroforesis horizontal (LGE)

El producto de la digestión se carga en un gel de agarosa al 0,5% junto a un marcador de alto peso molecular (Cat. No. 1703707, BioRad) para medir el tamaño de los fragmentos de la digestión (tampón TAE1X). La electroforesis, cuyo fin es optimizar la separación entre 5 y 50 kb, se realiza a 65V durante 23h aproximadamente (como referencia se coge la banda de 8,3 kb del marcador, que debe estar a la altura de la parte inferior del gel). Después de la electroforesis, se fotografía el gel bajo UV. Luego se trata el gel mediante una depuración (15 min en HCl 0,25N) seguida de un lavado rápido en agua destilada y, por último, se desnaturaliza con NaOH 0,4 N durante 15 minutos.

3.4.3. Southern blot

Para transferir el ADN embebido en el gel a una membrana Hybond XL (Cat. No. RPN303S, GE) se utiliza NaOH 0,4N durante 16h aproximadamente. Al día siguiente se neutralizan las membranas 2 min 30s en 2XSSC y se incuban colocadas cada una dentro de una carpeta de papel Watman 3MM durante 2h a 80°C para que el ADN se fije a la membrana.

3.4.4. Prehibridación

En primer lugar, se realiza una prehibridación de la membrana. Para ello se utiliza la solución de hibridación (MERCK, Cat. No. H7033) a la que hay que añadir esperma de salmón (MERCK, Cat. No. D9156) previamente hervido en una proporción (100:1) y se calienta esta mezcla a 65°C un mínimo de 30 min para que se disuelva bien. Se pone la membrana en contacto con 15 ml de solución de hibridación (precalentada a 65°C), durante aproximadamente 1h a 65°C en un horno de hibridación. Mientras realizamos la prehibridación de las membranas podemos ir marcando la sonda con el fósforo 32.

3.4.5. Marcaje radiactivo con fósforo 32 e hibridación

La sonda p13E-11 (D4SF104S1) que se utiliza para el diagnóstico de rutina de la DFEH1 se obtiene mediante amplificación por PCR (**ANEXO 2**).

Se utiliza una sonda p13E-11 por membrana (1000 ng) y se marca al azar con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP utilizando el Kit de marcaje "*Megaprime DNA Labelling System*" (GE) según las instrucciones del fabricante. Utilizamos el marcador Lambda DNA/*HindIII* Marker, 2 (Cat. No. SM0101, Thermofisher) y se marca también una alícuota por tanda de membranas.

Añadimos por membrana 1 μg de sonda p13E-11 y 0,1 μl de marcador a la solución de hibridación y se pone en contacto con la membrana. Dejar en rotación en el horno de hibridación O/N a 65°C (un mínimo de 18 horas).

3.4.6. Lavados

Al día siguiente se realizan 3 lavados de 10 min con 0,2xSSC/0,1%SDS. En caso de necesidad se puede lavar con mayor astringencia en 0,2xSSC/0,1%SDS.

3.4.7. Autoradiografía y revelado

El revelado se ha realizado con el equipo Amersham Typhoon IP *Biomolecular Imager* que consta de:

- * Un escáner (*Typhoon IP*) (1) que lleva incorporado el software *ImageQuant* para analizar las imágenes.

- * *Image Eraser* (2): Borra las pantallas de almacenaje de fósforo para poder ser reutilizadas.

* Pantallas de almacenaje de fósforo (3): Recoge y almacena temporalmente una imagen de la muestra radiactiva.

* Chasis (4): mantiene las pantallas de almacenaje de fósforo en un ambiente hermético sin luz.

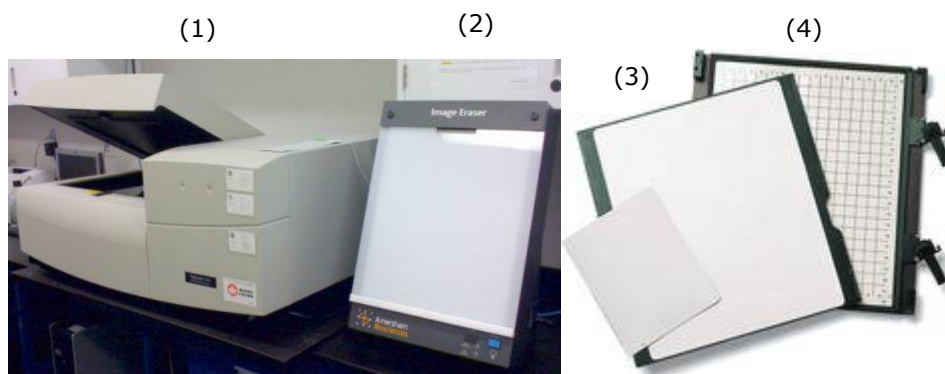


Figura 31. En la imagen se pueden ver los distintos accesorios del escáner Typhoon Trio, el Image Eraser y los chasis de exposición de pantallas

Mientras se están realizando los lavados colocamos las pantallas en el Image Eraser para su borrado. Después de lavadas las membranas, se dejan secar y se introducen en bolsas de plástico. Cada membrana en su bolsa de plástico se coloca en el chasis y se cubren con la pantalla. Se revelan las pantallas al día siguiente en el Typhoon IP utilizando para ello el programa *Image Quant TL*. Se obtiene la imagen en formato digital que nos permite trabajar con distintos parámetros (contraste, intensidad, cuantificación de la señal obtenida, etc).

Posteriormente se lee el tamaño de los fragmentos obtenidos y se comparan con los del marcador de alto peso molecular. El tamaño de los fragmentos reconocidos por la sonda p13E-11 se da en función del número de elementos repetidos de 3,3 kb presentes después de la triple digestión.

Los criterios diagnósticos seguidos a la hora de interpretar los resultados obtenidos en el diagnóstico molecular de DFEH se han basado en el número de kilobases (kb) del fragmento *EcoRI* obtenidas o el número correspondiente de repeticiones:

- DFEH1 (rango patológico): fragmento *EcoRI* con menos de 34 kb o 9 repeticiones.
- DFEH1 dudoso (rango dudoso o zona gris): entre 34-38 kb o 9-10 repeticiones. Para estos tamaños de fragmentos, dada la resolución del gel, a veces es necesario completar los análisis para precisar el tamaño exacto, con una electroforesis de campo pulsante (PFGE).
- No DFEH1 (rango no patológico): con más de 38 kb y o más de 10 repeticiones

En la literatura existe un consenso bastante extendido de considerar DFEH con un fragmento menor de 38 kb o 10 repeticiones (Wijmenga C y cols., 1992; van Deutekom JC y cols., 1993), aunque existen otros grupos que el límite lo sitúan en 34-35 kb (van Deutekom JC y cols., 1996). Nosotros debido al gran número de muestras que recibimos sin información clínica (55,8%) hemos decidido considerar DFEH con un fragmento por debajo de 34 kb, entre 34-38 kb (ambos inclusive) los consideramos dudosos, ya que existe población control con fragmentos dentro de este rango (zona gris), y por encima de las 38 kb a los que no tienen DFEH.

Las correspondencias aproximadas entre el tamaño del fragmento encontrado y el número de elementos repetidos se basan en la fórmula (Butz M y cols., 2003):

Número de repeticiones = (Tamaño del fragmento en kb – 5kb secuencia flanqueante) / 3,3kb

Nº Repeticiones	Tamaño del fragmento (kb)
1	9, 10
2	12
3	15
4	18, 19, 20
5	21, 22
6	24, 25, 26
7	28, 29
8	30, 31, 33
9	34, 36
10	38

Tabla 2. Correlación del número de repeticiones con el tamaño del fragmento en kb (elaboración propia).

A la hora de realizar la interpretación de los fragmentos, hay que tener en cuenta que existe una hibridación cruzada de la sonda p13E-11 utilizada con una región homóloga del # Y. Esto aparece bajo la forma de un fragmento de alrededor de 9,2 kb encontrada en varones.

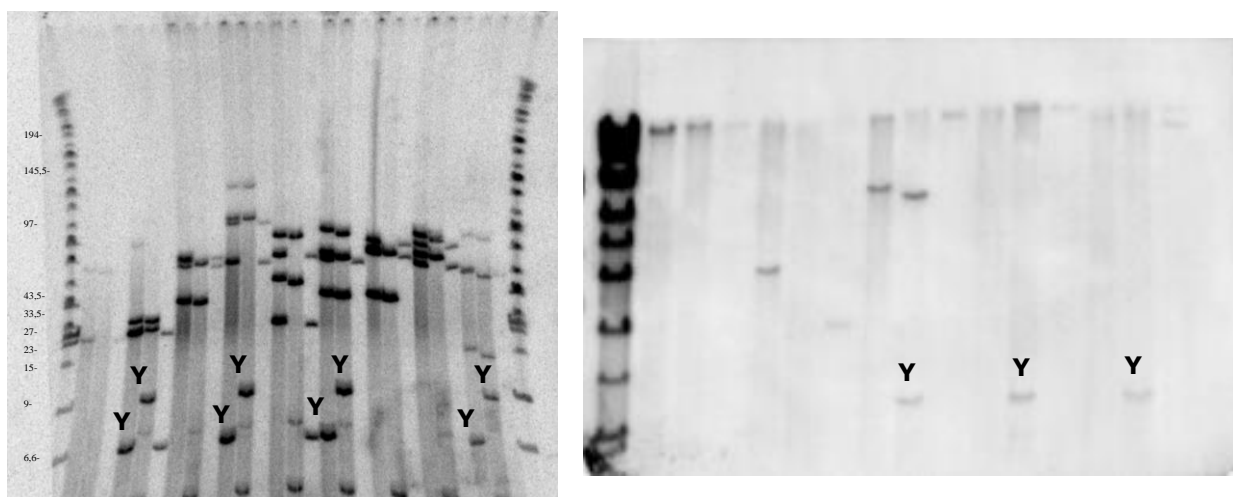


Figura 32. Visualización del fragmento inespecífico perteneciente al # Y en dos membranas con pacientes a estudio (PFGE -izda-, LGE- dcha-).

En la primera digestión con el enzima *EcoRI* se visualizan los fragmentos tanto del # 4 como los del # 10. Como en los fragmentos del # 10 existen dianas de restricción para el enzima *BlnI*, en la segunda digestión con los enzimas *EcoRI* y *BlnI* se visualizan solamente los fragmentos del # 4 (*BlnI*-resistentes) con una diferencia de 3 kb entre la banda de la primera y de la segunda digestión debido a la localización de la primera diana de restricción para el enzima *BlnI* respecto a la diana para *EcoRI*. En los fragmentos del # 10 existen dianas de restricción específicas para el enzima *XapI*, y en la tercera digestión con el enzima *XapI* se visualizan solamente los fragmentos del # 10 (*BlnI*-sensibles) con una diferencia de 6 kb entre la banda de la primera y de la tercera digestión debido a la localización de la primera diana de restricción para el enzima *XapI* (Lemmers RJ y cols., 2001).

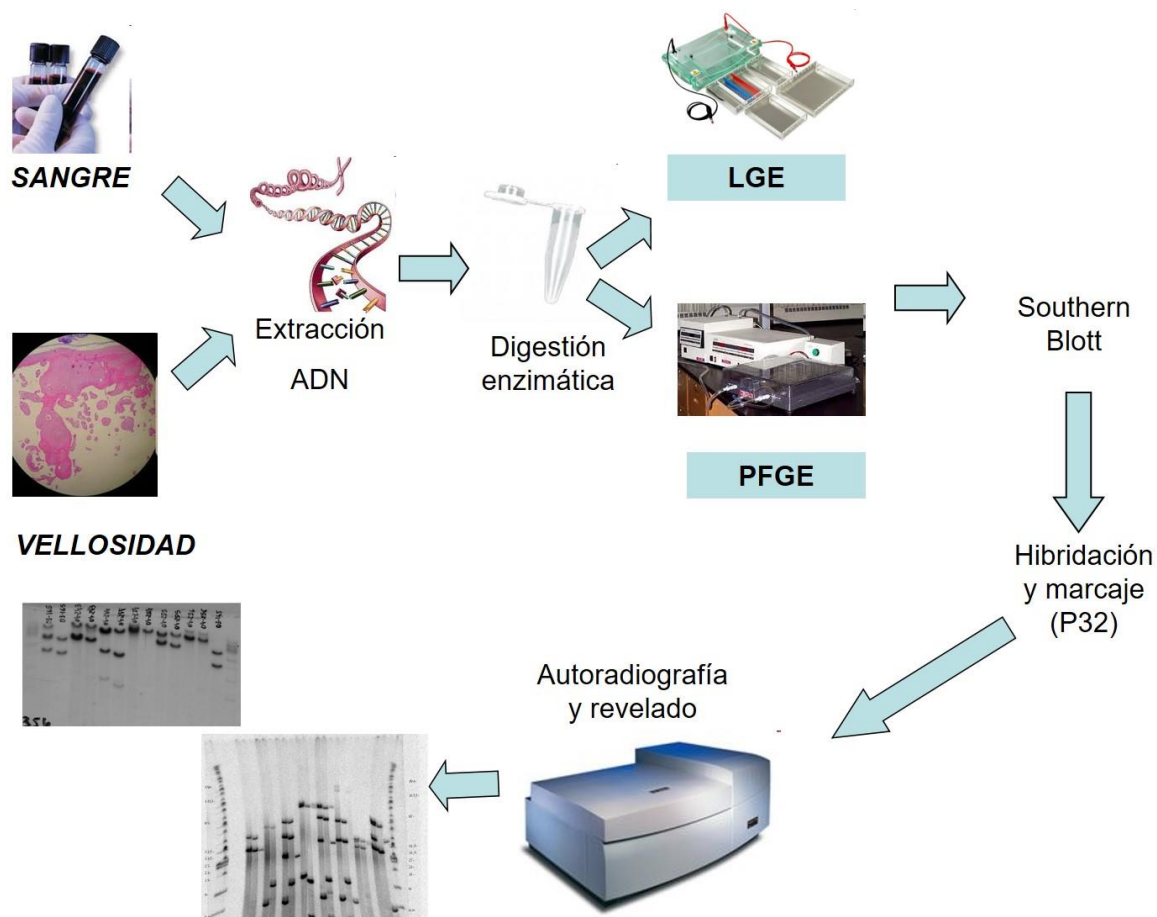


Figura 33. Esquema del flujo de trabajo del diagnóstico de DFEH

3.5. Estudio molecular mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis -)

Es otra técnica complementaria que se utiliza en el diagnóstico molecular de la DFEH1 y que puede utilizarse en lugar de la electroforesis horizontal de rutina (LGE). Su fin es optimizar la separación de fragmentos de ADN de gran tamaño molecular y se realiza en una unidad de electroforesis especial (*CHEF-DR II Chiller System, BioRad*) cuya diferencia con la electroforesis horizontal es que cada cierto tiempo el campo eléctrico cambia de dirección (pulsos) cambiando la orientación y las polaridades alternativamente. Con Southern blot convencionales (utilizando la LGE) es difícil resolver tamaños de fragmentos mayores de 40 kb, por lo que la PFGE se utiliza para incrementar la resolución ya que nos permite discriminar un rango entre las 10-300 kb.

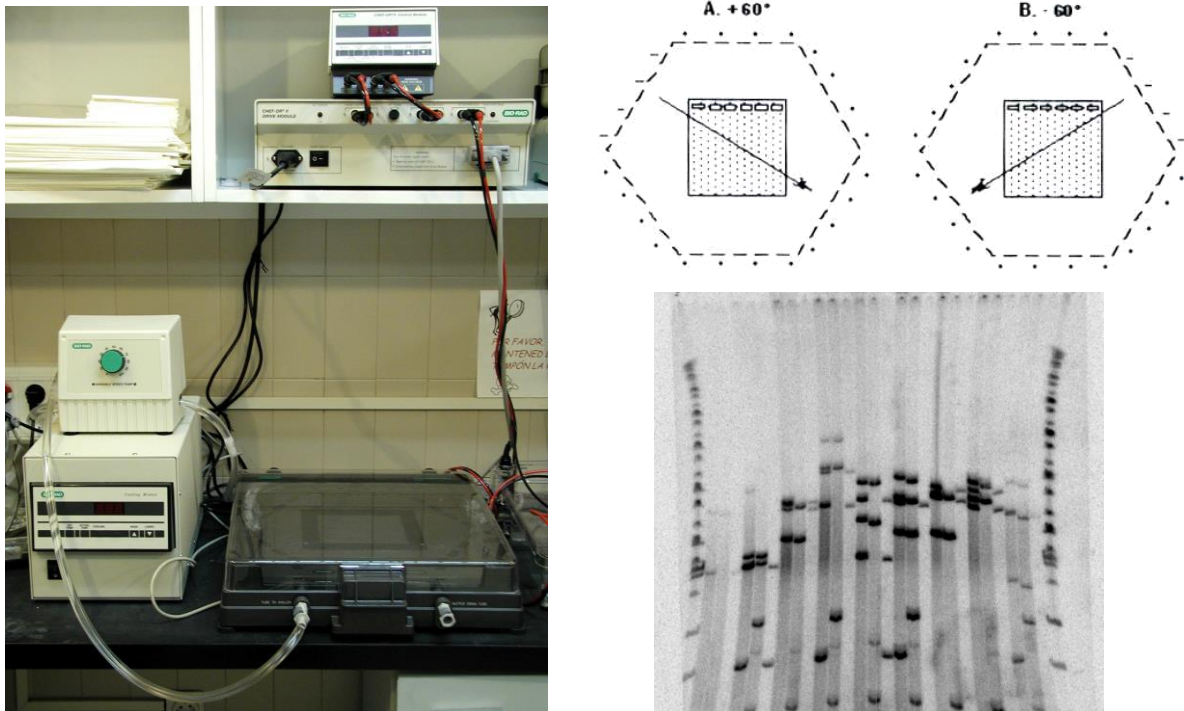


Figura 34. Equipo de PFGE, esquema del funcionamiento de los pulsos eléctricos de la PFGE y una imagen de una membrana revelada de PFGE incluyendo las 3 digestiones realizadas en 9 pacientes

Se realiza también una triple digestión, pero esta vez se añade el enzima *HindIII* (Ref: A141060A, Takara Bio) a la digestión de *EcoRI* porque aumenta la resolución dentro del rango de 20 a 50kb y no corta dentro del mismo grupo de repeticiones. Para realizar la técnica de PFGE se puede partir o bien de ADN líquido o bien de bloques de agarosa en los que está embebido el ADN.

Lo ideal para la PFGE es utilizar el ADN embebido en bloques de agarosa ya que permite una resolución de hasta 300 kb para obtener una información completa de los alelos provenientes del # 4 y del # 10 y detectar mejor los casos mosaicos e híbridos. Normalmente la PFGE se utiliza como prueba complementaria a la LGE cuando hay una justificación o bien molecular (sospecha de un fragmento translocado, de un fragmento híbrido o de un mosaico) o clínica (confirman que el fenotipo es de DFEH y se sospecha que pueda deberse a una deleción en la región de la sonda) para continuar el estudio en dicho paciente.

En nuestro laboratorio desde que comenzamos a realizar el estudio molecular de la DFEH hemos utilizado ADN líquido para el estudio, ya que las muestras llegan en primer lugar para descartar DFEH1 mediante LGE (cuya resolución es mayor en los fragmentos <38kb). En el año 2008 comenzamos a realizar la PFGE, pero el ADN de las muestras susceptibles de tener

algún reordenamiento estaba ya extraído para descartar en primer lugar la DFEH1. Por ese motivo y también porque recibimos muchas muestras de pacientes con poca o ninguna información clínica, y además es un protocolo muy laborioso, la PFGE es un proceso que no es eficiente a nivel coste–efectivo con estas condiciones porque además nos obligaría a solicitar una cantidad doble del material de partida (bien sangre periférica o ADN extraído para poder desde un principio hacer la extracción del ADN de las dos formas).

La utilización de ADN líquido para la PFGE limita la visualización de alelos de gran tamaño debido a la fragmentación del ADN en el proceso de extracción, pero hemos llegado a visualizar alelos de 250 kb indicando una alta calidad en nuestro método de extracción. Por eso recomendamos la extracción manual de ADN y no la automática.

El protocolo que hemos seguido para conseguir el ADN embebido en bloques de agarosa está publicado en la web:

<https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/fields-center/documents/DNAisolation-DNAplugsandliquidDNA1.pdf>

Debido a los tamaños de los fragmentos genómicos implicados, los eventos de intercambios intercromosómicos y deleciones de la región de la sonda p13E-11 son visualizados mejor con la PFGE (van Overveld PG y cols., 2000).

Generalmente una contracción mitótica de las repeticiones D4Z4 en el # 4 da lugar a dos poblaciones de células, una portando los alelos originales previos al reordenamiento, y la otra en la cual el grupo de repeticiones D4Z4 de uno de los alelos del # 4 se contrae al tamaño dentro del rango de la DFEH. La mejor técnica para detectar el mosaicismo en los casos *de novo* de DFEH y para estimar la proporción de células afectas es la electroforesis de campo pulsante preferiblemente con ADN embebido en bloques de agarosa. La mayoría de la población porta dos copias de cada cromosoma homólogo, y se pueden observar cuatro fragmentos *EcoRI* de diferente tamaño cuando el ADN de un individuo es analizado. Cada fragmento representa un alelo D4F104S1 diferente, con dos alelos derivados del locus 4q35 y dos alelos del locus 10q26 (ambos loci producen fragmentos con el mismo rango de tamaño). En el caso de individuos mosaico, se distinguen cinco fragmentos *EcoRI* de diferente tamaño: dos alelos del # 10, uno del # 4, y el otro alelo del # 4 sufre una contracción dando lugar a dos poblaciones celulares -con una señal de hibridación menos intensa que los otros 3 alelos- (una de ellas portará el tamaño original de ese alelo del # 4 y la otra población de células portará el fragmento contraído con un tamaño que puede estar dentro del rango patológico o no). Por lo tanto, un individuo mosaico con DFEH portará en un porcentaje de sus células un fragmento *EcoRI* contraído en el rango patológico y en otro porcentaje de sus células el fragmento *EcoRI*

original. La intensidad de la banda de estos dos fragmentos dependerá del porcentaje de células en que se encuentre ese tamaño de fragmento.

3.5.1. Triple digestión enzimática (*EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BlnI*, *XapI*)

Si se parte de bloques de agarosa, se deben equilibrar primero en unas soluciones específicas, antes de realizar las digestiones. Posteriormente, se realiza la triple digestión *EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BlnI*, *XapI* tanto de los bloques de agarosa como del ADN líquido y se incuban a 37°C un mínimo de 6h (**ANEXO 3**).

Para determinar si un fragmento pertenece a la variante 4qA o 4qB se realiza una digestión única del ADN con el enzima *HindIII*, siguiendo los demás pasos del protocolo igual, pero hibridando la membrana con la sonda 4qA o 4qB que también se amplifica por PCR (**ANEXO 4**).

3.5.2. Electroforesis de campo pulsante (PFGE)

En el caso de los bloques de agarosa, se cargan directamente en un gel de agarosa MP (Roche) 0,85% (TBE0,5X) flanqueados por un marcador, antes de meter el gel (volumen de 300 ml) en la cubeta. En el caso de ADN líquido, se siembran las muestras también flanqueadas por un marcador cuando el gel (volumen de 350 ml) ya está dentro de la cubeta. El marcador que utilizamos es una mezcla de: *MidRange PFG Marker I 50 µg/ml* (Cat. No. N0342, NE) + 8 µl del marcador λ -*HindIII* (Cat. No. SM0101, Thermofisher).

La electroforesis se realiza en el aparato *CHEF-DRII Chiller System* (BioRad) con el programa de 1 bloque y 18°C, 6V/cm, 20h, Start 1 sg, Stop 16 sg.

3.5.3. Southern blot

Después de la electroforesis, se fotografía el gel bajo UV y se deja unos 15 sg. Luego se trata el gel en el tampón de blotar NaCl 0,6M/NaOH 0,4M: primero se deja el gel 15 min en agitación, se elimina el tampón, se echa nuevo tampón y se deja otros 15 min en agitación.

Para realizar el *blotting*, cortamos una membrana Hybond-XL (Amersham), 3 papeles Whatman de transferencia (GB003, Scheider&Schuell) y se realiza en el mismo tampón de *blotting* durante toda la noche (mínimo 16 horas).

Al día siguiente se neutraliza la membrana durante 10 min en 1M Tris pH 7,5/ SSC 20X. Después se fija el ADN a la membrana. Para ello colocamos la membrana en una carpeta de papel Whatman 3MM y la ponemos 2h en la estufa a 80°C.

3.5.4. Prehibridación

En primer lugar, se realiza una prehibridación igual que en el caso de la LGE pero con la diferencia de que se utilizan 25 ml de solución de hibridación por membrana de PFGE.

3.5.5. Marcaje radiactivo con fósforo 32 e hibridación

Se marca de manera aleatoria la sonda p13E-11 (D4SF104S1) (1000 ng) o la sonda 4qA/4qB (250 ng) por una parte y el marcador λ -HindIII (Amersham) con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP utilizando el Kit de marcaje "*Megaprime DNA Labelling System*" (GE) según las instrucciones del fabricante.

Se añade por membrana una alícuota de sonda y 0,1 μl de marcador λ -HindIII (Thermofisher, Cat. No. SM0101) a la solución de hibridación. La hibridación tiene lugar a 65°C O/N en los tubos en rotación en el horno de hibridación (18 horas aproximadamente).

3.5.6. Lavados

Al día siguiente, para la sonda p13E-11 se realizan 3 lavados de 5 min en 2XSSC/0,1% SDS. Para la sonda 4qA/4qB hay que lavar con mayor astringencia en 0,2xSSC/0,1%SDS.

3.5.7. Autoradiografía y revelado

El revelado también se realiza con el equipo Typhoon IP (GE Healthcare) y se siguen los mismos pasos que en la LGE: borrado previo de las pantallas, colocación en los chasis de las membranas dentro de bolsas de plástico, se cubren las membranas con la pantalla y se mantiene el chasis cerrado hasta el día siguiente que se escanea la pantalla (se guarda la imagen en formato .tif) y se analiza el tamaño de los fragmentos obtenidos comparándolos con los del marcador de alto peso molecular (9-300kb).

En el caso de que se quieran deshibridar las membranas para rehibridarlas de nuevo, se utiliza el protocolo:

En primer lugar, colocamos las membranas en el tampón de Blotting NaCl 0,6M/NaOH 0,4M a 42°C durante 30 minutos, en agitación. Después pasamos las membranas al tampón SSC0,1X/ 0,1% SDS/0,2M Tris-HCl pH 7.5 e incubamos 20 minutos a 42°C en agitación.

Se guardan las membranas en papel Whatman 3MM y así ya están preparados para volver a hibridarlas de nuevo.

3.6. Delección de D4F104S1

La manera más eficiente de detectar delecciones de la región donde hibrida la sonda p13E-11 es mediante la PFGE con bloques de agarosa (Lemmers RJ y cols., 1998), ya que se visualizan todos los alelos (incluso de gran tamaño) y la ausencia de un alelo inmediatamente sugiere una delección de D4F104S1. Desafortunadamente todas las sondas que reconocen correctamente el grupo de repeticiones D4Z4 muestran una hibridación cruzada en el rango de la DFEH con muchas regiones homólogas y por tanto no pueden usarse para detectar el fragmento deleccionado. Además, debido a que no se conoce el lugar donde comienza la delección, el tamaño del fragmento observado no nos proporciona ninguna pista sobre el número preciso de repeticiones que lleva esa delección.

Esta delección de la sonda puede testarse utilizando una sonda complementaria a la misma repetición D4Z4 (9B6A), o en la región telómerica a esta zona (4qA/4qB) (Lemmers RJ y cols., 1998; Lemmers RJ y cols., 2003) o en dentro de las mismas repeticiones (D4Z4) (Ehrlich M y cols., 2007).

Un método para detectar delecciones en el diagnóstico de rutina, incluye el uso secuencial de varias sondas en la misma membrana en la cual el enzima *HindIII* reemplaza a *EcoRI*. Las digestiones con *HindIII* resultan en fragmentos D4Z4 de 6 kb mayores que los digeridos con *EcoRI* y permite el uso de la sonda telomérica 4qA además de p13E-11, que reconoce una secuencia distal a las repeticiones D4Z4 (Lemmers RJ y cols., 2001). En este test, las digestiones del ADN, *EcoRI*, *EcoRI/BlnI* y *HindIII* primero se hibridan con p13E-11, se deshibrida la membrana y después de la nueva hibridación con 4qA se visualiza el alelo deleccionado en la digestión con *HindIII*.

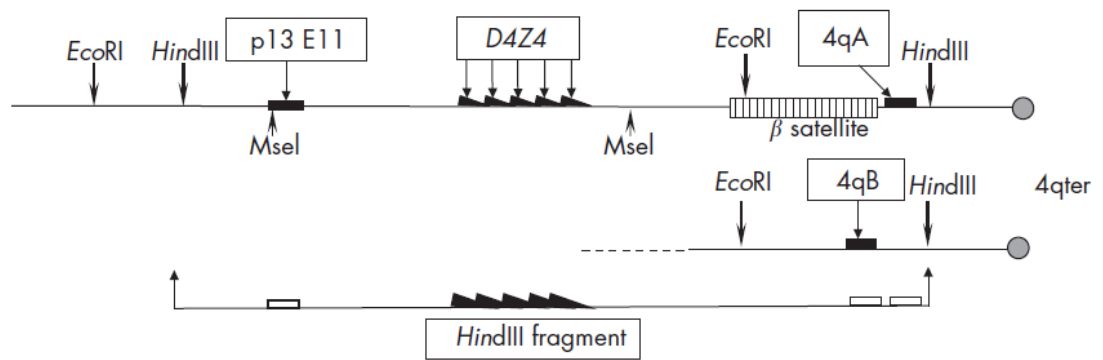


Figura 35. Mapa genómico del locus de la DFEH que contiene los subtelómeros 4qA y 4qB (Imagen tomada de Thomas NST y cols., 2007).

Otra sonda utilizada y que es específica de cada una de las repeticiones es la sonda de 1 kb denominada D4Z4. Se utiliza con la triple digestión del ADN (*EcoRI*, *EcoRI/BlnI* y *XapI*) y tras la hibridación con la sonda D4Z4 se visualiza directamente el fragmento deleciónado.

En la página web:

<https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/neurology/images/HybridizationBuffer2018.pdf> se muestra la preparación de los distintos tampones para utilizar en la hibridación con las distintas sondas

4. Haplotipo SSLP

Para determinar el haplotipo al que pertenecen los pacientes se estudia este *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP) que es una combinación de 5 VNTRs, una inserción/delección de 8 pb, y dos SNPs localizados 3,5 kb de forma proximal a D4Z4 y varía en tamaño entre 157 y 182 pb. El SSLP está localizado entre las posiciones 1532 y 1694 de AF117653 y se estudia por PCR utilizando los cebadores:

(F) 5' GGTGGAGTTCTGGTTTCAGC 3'

(R) 5' CCTGTGCTTCAGAGGCATTTG 3'

Para el análisis de fragmentos, el cebador F se marca con HEX. Los fragmentos SSLP han sido amplificados siguiendo las siguientes condiciones de PCR:

dNTPs 5Mm	1 μ l
Tampón HF 5X	5 μ l
H ₂ O	16.13 μ l
F/R (6 μ M)	0.67/0.67 μ l
Phusion enzyme (2U/ μ l)	0.2 μ l
ADN (2,5ng/ μ l)	2 μ l

Condiciones para el termociclador:

98°C 30''

98°C 15''

60°C 30''

72°C 15''

72°C 30'

} x 32

Las diferencias de tamaño en los fragmentos SSLP se han determinado mediante un ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El análisis de los resultados se ha llevado a cabo mediante el software GeneMapper™ (Thermofisher).

5. Estudio molecular de la distrofia facioescapulohumeral tipo 2 (DFEH2)

La DFEH2 está asociada a mutaciones en el gen SMCHD1 y también en el gen DNMT3B. El gen SMCHD1 localizado en el # 18 (locus 18p11.32) contiene 48 exones y el gen DNMT3B localizado en el # 20 (locus 20p11.21) contiene 23 exones.

Tras la extracción del ADN a partir de sangre periférica (se requieren unos 100 ng) se realiza el estudio de este gen mediante un panel de secuenciación NGS (*Next Generation Sequencing*) (Ion Torrent-PGM), con una cobertura del 100% de las regiones codificantes e intrónicas flanqueantes (25 pb) de los genes. Las secuencias son procesadas con el software de análisis Ion Reporter (Applied Biosystems) que devuelve un archivo con el listado de las variantes encontradas. Las posibles variantes exónicas/intrónicas patogénicas encontradas se contrastan con distintas bases de datos (LOVD, ClinVar, HGMD) y se confirman mediante secuenciación Sanger. Las secuencias son alineadas con el software de análisis SeqScape (Applied Biosystems). Se utilizan como secuencias de referencia: Genbank NM_015295 (GRCh37/hg19) para SMCHD1 y NM_006892 (GRCh37/hg19) para DNMT3B.

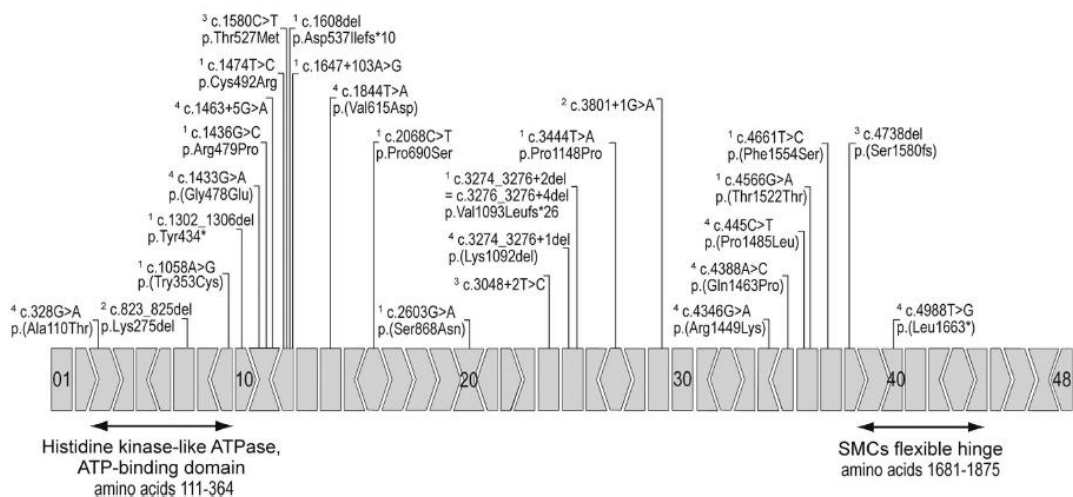


Figura 36. Mutaciones en SMCHD1 (Ilustración tomada de Larsen M y cols., 2015)

6. Estudio del nivel de metilación en la región D4Z4

En los estudios realizados en este trabajo, hemos utilizado el análisis de metilación mediante el enzima de restricción sensible a la metilación (*FseI*), el cual mide el estado de metilación de un único dinucleótido CpG en la unidad D4Z4 más proximal de los grupos de repeticiones del # 4 y del # 10 (Lemmers RJ y cols., 2012).

Para estudiar el nivel de metilación en el sitio *FseI* en la unidad D4Z4 más proximal se ha utilizado el siguiente protocolo publicado en la página web de la Universidad de Rochester:

(<https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/fields-center/documents/MethylationanalysisD4Z4a.pdf>)

En nuestra experiencia algunas muestras de ADN líquido pueden contener impurezas (proteínas o sales) que podrían inhibir la digestión de *FseI* (Cat. No. 174R0588L, New England Biolabs). Para superar estos problemas, el ADN se purifica en columna antes de la digestión con *FseI*. Para realizar la purificación del ADN se utiliza el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Cat. No. 740609250, Macherey Nagel) según el fabricante y se eluye el ADN con 40 µl de tampón de elución (rendimiento del 90%). Para bloques de agarosa hay que comprobar la concentración de ADN después de la extracción y ajustar a 2,0 µg antes de la digestión con *FseI*. Antes de la purificación, se realiza una doble digestión de las muestras de ADN mediante *BglII*/*EcoRI* (en gran volumen y O/N) para obtener fragmentos <50 kb (requerido para la mayoría de los métodos de purificación). (*BglII* Cat. No. 1021A, New England Biolabs).

Después del paso de purificación, las muestras se deben digerir con *FseI* durante > 4 horas (nosotros lo dejamos O/N).

ADN líquido

<i>Bgl</i> II (10U/μl)	2 μl
<i>Eco</i> RI (10U/uL)	2 μl
Buffer H 10x	10 μl
Espermidina 0.1M	3.3 μl
<u>agua</u>	<u>40 μl</u>
total (mix)	57.3 μl
<u>agua + 4 μg ADN</u>	<u>42,7 μl</u>
Total	100 μl

ADN embebido en bloques de agarosa

<i>Bgl</i> II (10U/μl)	5 μl
<i>Eco</i> RI (10U/uL)	3 μl
buffer O 10x	15 μl
spermidina 0.1M	5 μl
dtc 0.1M	1.5 μl
<u>agua</u>	<u>122.5 μl</u>
Total	150 μl

ADN	40 μl	NEB4 10x	6 μl
BSA 100x	0.6 μl		
<i>Fse</i> I (2U/ul)	3.5 μl		
<u>Agua</u>	<u>9.4 μl</u>		
Total	60 μl		

Nota: *FseI* es muy inestable y debe almacenarse a -80°C (a -20°C la actividad cae drásticamente).

GEL Y ELECTROFORESIS

0.8%TAE (300ml), con un peine en la parte superior. Se cargan 60 μl de cada muestra más 12 μl de blue loading buffer 5X, precedidas y seguidas de 10 μl λ-*Hind*III marker.

Primero se deja 15 min a 35V y después durante unas 6 horas a 75V.

BLOTTING

Se equilibra el gel 2 veces en tampón de blotar (NaCl 0.6M/NaOH 0.4M) durante 20-30 minutos y se realiza la transferencia O/N a una membrana Hybond-XL (GE) en el mismo tampón de blotar.

HIBRIDACIÓN

La hibridación se realiza de la misma manera que los geles de PFGE. La única diferencia es que en este caso se utilizan columnas caseras de Sephadex G-50 para filtrar la sonda. Se marca e hibrida con la sonda p13E-11 (1000 ng), 3 µl del marcador λ -HindIII (Cat. No. SM0101, Thermofisher). Dejamos las membranas en contacto con la sonda y el marcador en el horno de hibridación O/N a 65°C. Para deshibridar la membrana utilizar 0,1%SSC/SDS (solución previamente hervida).

LAVADOS

Hacemos 3 lavados de 10 min cada uno: 2xSSC/0,1%SDS, 1xSSC/0,1%SDS y 0,3xSSC/0,1%SDS.

REVELADO

Se revela en el equipo Typhoon IP (GE) y se pueden ver al revelar dos bandas, una banda que corresponde al # 4 metilado a la altura de 4061 pb y una banda que corresponde al # 4 no metilado a 3387 pb.

Se cuantifican mediante densitometría con el programa ImageQuant (GE) y el nivel de metilación se calcula mediante la relación entre estas dos bandas.

7. Estudio de otros genes implicados en los síndromes escapuloperoneales: VCP y FHL1

El gen VCP contiene 17 exones y el gen FHL1 contiene 7 exones. Los cebadores que hemos utilizado para amplificar los distintos exones de los dos genes se han diseñado con el programa Primer 3.

Los cebadores que hemos utilizado para amplificar los distintos exones del gen VCP se resumen en la siguiente tabla:

Exones		Tamaño Exón (pb)	Cebadores 5' → 3'	Condiciones
1	F	231	GAGCCGAGCCCCGGCCAGT	TD 60-50°C con DMSO
	R		TGCGCGCCGCCGAGCAAGC	
2-3	F	112+173	GCAGGAGTATCTACTGACTC	TD 60-50°C con DMSO
	R		GCCAAAAACCCACACACAC	
4	F	143	TATCAGCTATCTGTGCCAGG	TD 60-50°C con DMSO
	R		ATCCTTAAGCTCAGAATTAG	
5	F	131	AACTGTGCTTGTACTGTTTG	TD 60-50°C con DMSO
	R		CACTGAGTAATCATAAAATC	
6	F	132	TTGCACACTAGGTAGTGAATG	TD 60-50°C sin DMSO
	R		CCCAGGATTAGACATTGGGAC	
7	F	103	GAACCTAATCACACTCTGCA	TD 65-55°C sin DMSO
	R		ATTGGGTCTAGCTAGACATA	
8-9	F	134+136	TTACCACCTTCTACCCAGG	TD 60-50°C sin DMSO
	R		TGGACCAATCACTGTGAAG	
10	F	113	CTCTGGACTAGAGATGAGCC	TD 65-55°C sin DMSO
	R		GACACTGTAACGCCTGGTCA	
11-12	F	165+123	CTGGGTCTTTGAGGCAGCAT	TD 60-50°C con DMSO
	R		GACAGTGACTIONCACCTGGAC	
13	F	213	GGATGCTTCTGTTAGTTAG	TD 60-50°C sin DMSO
	R		AATCAATACATAGTTCAGCC	
14	F	309	GTGTGAGCCACCACGTTTG	TD 60-50°C sin DMSO
	R		CCCAGTGAATCTTGTCCAG	
15	F	156	ATGCTAAGGTACCTCTGCTG	TD 60-50°C sin DMSO
	R		CCATGATTGGCACATCTGGG	
16	F	155	AAACTGCAGTAATGGGAGGC	TD 60-50°C sin DMSO
	R		ACTCCCATCCCTTTGGTG	
17	F	659	GGAAGCTAGAGGGGTAGTTGTG	TD 60-50°C sin DMSO
	R		CACTGCCCAAACACTACAACAG	

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar los exones de VCP y condiciones de PCR.

Los cebadores que hemos utilizado para amplificar los distintos exones del gen FHL1 se resumen en la siguiente tabla:

Exones		Tamaño Exón (pb)	Cebadores 5' → 3'	Condiciones
1	F	364	CCTGCTTCCTCCCCTCTTTC	TD 60-50°C con DMSO
	R		CGCCGAAGCCGCAGTACCCA	
2	F	278	AGAATGTGTTACCATGAGCC	TD 60-50°C
	R		AAGCCCTTTGTACAATGCCG	
3	F	378	ATGGACTCCAAGGCAGCATT	TD 60-50°C
	R		GGAAATCCTAACAGCCAGCT	
4	F	387	ACTGTGTCATCTCAGTGGTC	TD 60-50°C
	R		AGCAGCTCAGAGCAACGTTA	
5	F	373	AGTAACTGCAGGGCCTGCAT	TD 65-70°C con DMSO
	R		GAATGGGATAGTGTGTGTGG	
6	F	389	TTGTATACCAAAGCGCCCAG	TD 60-50°C con DMSO
	R		ATTCTCTGGGGCCTTTGTG	
7	F	393	AGTGGGGCAGGTCGTCATTT	TD 60-50°C con DMSO
	R		TGGGAGAAAAGACGGAAGGA	

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar los exones de FHL1 y condiciones de PCR.

Los exones de los dos genes los hemos amplificado con las siguientes condiciones de PCR (unos exones se amplifican con DMSO y otros sin DMSO):

	Mix 1 (Vol en ul)	Mix2 (Vol en ul)
dNTPS (5mM)	1	1
MgCl ₂	1	1
Tp 10X	2.5	2.5
Primer F/R 6 μM	2.5/2.5	2.5/2.5
H ₂ O	14.3	13.05
DMSO	-----	1.25
Polimerasa Biotaq 5U/ul	0.2	0.2
ADN (150 ng/ul)	1	1
Volumen Final	25	25

Hemos utilizado un programa de PCR en la que la temperatura baja gradualmente (Touchdown). Ponemos como ejemplo la TD 60-50°C:

95°C	5'		
95°C	30''	}	x 4 ciclos
60°C	30''		
72°C	45''		
95°C	30''	}	x 20 ciclos
60°C	30'' (-0.5°C/ciclo)		
72°C	45''		
95°C	30''	}	x 11 ciclos
50°C	30''		
72°C	45''		
72°C	5'		
4°C	∞		

Para la predicción del efecto de las variantes encontradas hemos consultado las bases de datos de LOVD, ClinVar, HGMD, y utilizado los programas informáticos de predicción in silico, SIFT y PolyPhen.

- LOVD (Leiden Open Variation Database -<https://databases.lovd.nl/shared/genes->)
- ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)
- HGMD (Human Genome Mutation Database -<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php->)
- SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant -https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/Extended_SIFT_chr_coords_submit.html-) predice si la sustitución de un aminoácido afecta a la función de la proteína. Esta predicción se basa en el grado de la conservación de los residuos aminoácidos en los alineamientos derivados de secuencias estrechamente relacionadas, recogidas a través de PSI-BLAST.
- PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping -<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/->) es una herramienta que predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína utilizando unas consideraciones físicas y comparativas sencillas.

8. **Valoración clínica. Escala de Gardner-Medwin-Walton (GMW)**

A pesar de que la escala GMW (Gardner-Medwin D, Walton JN 1974) no es a nuestro juicio la herramienta más adecuada para medir la discapacidad en la DFEH, dado que sigue ampliamente utilizada por los clínicos para una valoración global de la enfermedad

neuromuscular y que en el momento de iniciar esta tesis no existían otras publicadas, es la que nosotros hemos utilizado en nuestros análisis para valorar el grado de incapacidad:

I: Incapaz para correr libremente y ponerse de pie sin ayuda de las manos

II: Marcha anadeante, subir escaleras sin el pasamanos

III: Subir escaleras sólo con la ayuda del pasamanos

IV: Incapaz de subir escaleras

V: Incapaz de levantarse de una silla sin ayuda

VI: Caminar sólo con ayuda, caídas frecuentes

VII: Incapaz para caminar y mantenerse de pie

9. *Cuantificación de la CPK*

Los rangos normales de CPK para hombres suelen oscilar entre 32 y 294 U/L y entre 33 y 211 U/L para mujeres, aunque esto puede variar dependiendo de los rangos de referencia que cada laboratorio tenga establecido. Hay que tener esto en cuenta ya que nosotros no hemos medido la CPK en nuestro laboratorio y nos hemos basado en los datos obtenidos de los distintos centros de origen.

RESULTADOS



1. Aspectos demográficos, clínicos y genéticos de la muestra

1.1. Aspectos demográficos

Entre agosto del 2000 y diciembre de 2020 se han recibido **4158** muestras de pacientes o sujetos a riesgo, y 95 muestras para estudio prenatal, en las que se ha realizado el diagnóstico molecular de DFEH mediante electroforesis horizontal (LGE) y otras técnicas.

La edad media de los individuos con diagnóstico molecular de DFEH1 es de 42.7 años (n= 1405) mientras que la de los individuos no DFEH1 es de 41.8 años (n= 1406).

La distribución de mujeres entre el grupo DFEH1 (n=1930), 46.2% mujeres (n=892) y el 53.8% de varones (n=1038) frente al grupo No DFEH1 (n=2087), 49.9% mujeres (n=1043) y el 50.1% de hombres (n=1044) presenta diferencias significativas (p=0.02).

De los 4158, conocemos los datos del año de nacimiento y del sexo en 2799 individuos. La distribución de la edad a la que se realizó el estudio molecular distribuido por rangos de edades según el sexo es la siguiente:

Rango de edad (años)	Nº Mujeres	Nº Varones	Total
0-10	49	54	103
11-20	99	146	245
21-30	214	210	424
31-40	282	314	596
41-50	242	260	502
51-60	182	221	403
61-70	176	159	337
71-80	70	90	160
81-90	12	14	26
91-100	3	2	5
	1329	1470	2799

Tabla 5. Distribución de la edad de los pacientes en el momento del estudio genético (por sexos)

No se han observado diferencias en los rangos de edades ni por el sexo.

1.2. Procedencia de las muestras

La relación de muestras enviadas para el estudio de DFEH por comunidades autónomas dentro de España y del extranjero es la siguiente:

RESULTADOS

PAIS	COMUNIDAD AUTÓNOMA	MUESTRAS RECIBIDAS	%
ESPAÑA		4052	97.5
	ANDALUCÍA	413	10.2
	ARAGÓN	276	6.8
	ASTURIAS	71	1.8
	ISLAS BALEARES	48	1.2
	ISLAS CANARIAS	87	2.1
	CANTABRIA	3	0.1
	CASTILLA LA MANCHA	64	1.6
	CASTILLA Y LEÓN	62	1.5
	CATALUÑA	1072	26.5
	COMUNIDAD VALENCIANA	401	9.9
	EXTREMADURA	40	1.0
	GALICIA	205	5.1
	LA RIOJA	29	0.7
	COMUNIDAD DE MADRID	677	16.7
	MURCIA	76	1.9
	NAVARRA	76	1.9
	PAIS VASCO	452	11.2
PORTUGAL		77	2.5
FRANCIA		1	
BÉLGICA		19	
TURQUÍA		2	
FINLANDIA		1	
IRÁN		1	
REINO UNIDO		2	
ISRAEL		2	
USA		1	
	TOTAL	4158	

Tabla 6. Procedencia de las muestras enviadas para el estudio de DFEH.

Se han recibido muestras de todas las comunidades autónomas. Un 26,5 % de las muestras provienen de Cataluña, un 16,7 % de Madrid, un 11,2 del País Vasco y un 10,2 % de Andalucía, con lo que de estas cuatro comunidades se han mandado el 64,6 % de las muestras.

En cuanto a las muestras provenientes de otros países, la mayoría viene de Portugal (un 72,6%) y Bélgica (17,9%).

1.3. Síntomas de inicio

Se ha obtenido información sobre los síntomas de inicio en 319 pacientes con DFEH1 de los 2009 totales (15.9%). Al analizar estos datos hemos obtenido que el primer síntoma de inicio se distribuye de la siguiente manera:

Síntomas de inicio	Nº Individuos DFEH1	%
Deb MMSS	101	31.66
Deb MMII	39	12.23
Deb cintura escapular	36	11.29
Deb facial + deb cintura escapular	28	8.78
Deb facial	25	7.84
Deb MMSS + deb MMII	22	6.90
Deb facial + deb MMSS	20	6.27
Deb cintura escapular + deb MMSS	12	3.76
Deb cintura escapular + deb MMII	9	2.82
Deb facial + deb cintura escapular + deb MMSS	6	1.88
Deb facial + deb MMII	5	1.57
Deb cintura pelviana + deb MMII	3	0.94
Deb facial + deb cintura escapular + deb MMII	3	0.94
Deb facial + deb MMSS + deb MMII	2	0.63
Deb cintura escapular + deb cintura pelviana	2	0.63
Deb facial + deb cintura escapular + deb cintura pelviana	2	0.63
Deb facial + deb cintura pelviana	1	0.31
Deb facial + deb cintura escapular + deb MMSS + deb MMII	1	0.31
Deb cintura escapular + deb MMSS + deb cintura pelviana	1	0.31
Deb cintura pelviana	1	0.31
	319	100.00

Tabla 7. Síntomas de inicio en la DFEH1.

SÍNTOMAS DE INICIO	Nº INDIVIDUOS DFEH2	%
Deb MMII	6	28.57
Deb cintura escapular	4	19.05
Deb MMSS	4	19.05
Deb facial + deb cintura escapular	2	9.52
Deb facial + deb cintura pelviana	1	4.76
Deb facial + deb MMII	1	4.76
Deb cintura escapular + deb MMII	1	4.76
Deb cintura escapular + deb MMSS	1	4.76
Deb cintura pelviana	1	4.76
	21	100.00

Tabla 8. Síntomas de inicio en la DFEH2.

Según los datos obtenidos, el primer síntoma de inicio que los pacientes refieren es la debilidad en miembros superiores, seguido de debilidad en miembros inferiores y debilidad escapular y por último en una menor proporción de pacientes se refiere la debilidad facial.

Contamos con el dato de los síntomas de inicio en 21 casos de DFEH2 (29.2% del total), y en estos casos el síntoma de inicio más frecuente es debilidad en los miembros inferiores, seguido de debilidad en los miembros superiores y en la cintura escapular.

1.4. Grado de incapacidad: Escala de Gardner-Medwin y Walton (GMW)

Hemos analizado la relación entre el tamaño del fragmento y el valor de la escala GMW encontrando una relación entre el tamaño del fragmento y la gravedad, a menor tamaño de fragmento o menor número de repeticiones mayor gravedad, sin embargo, esa relación sólo se da en fragmentos menores de 24 kb.

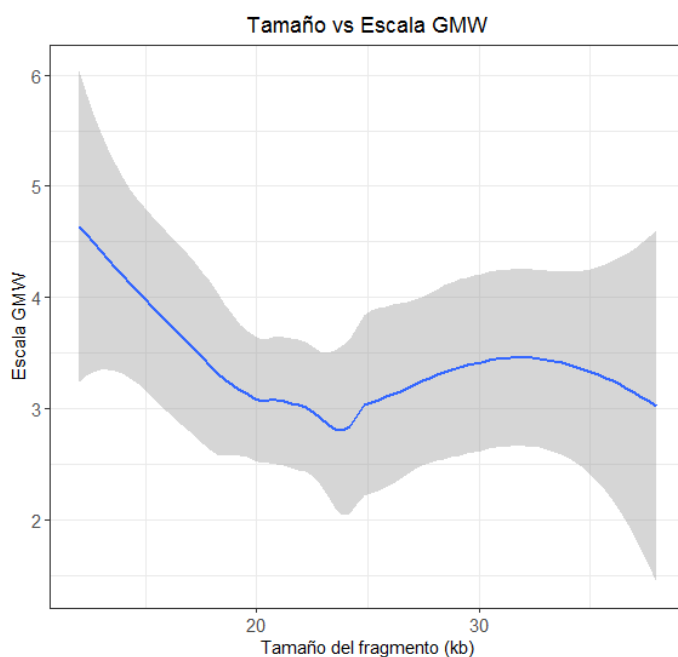


Figura 37. Gráfico de correlación entre el tamaño de fragmento y la escala de GMW

Al analizar la correlación entre la escala GMW y el tamaño de los fragmentos no encontramos una correlación lineal ($p=0.3294$) y al analizar la correlación entre la escala GMW y el tamaño de los fragmentos menores de 25 kb existe una correlación lineal ($p=0.03057$).

Para determinar si la gravedad del cuadro de acuerdo a la valoración GMW está relacionada con el sexo, hemos estudiado las diferencias entre ambas variables sin encontrar diferencias significativas ($p=0.1614$).

Asimismo, hemos estudiado la relación entre la escala y la edad de inicio apreciándose una tendencia a una gravedad menor con un inicio más tardío de los síntomas.

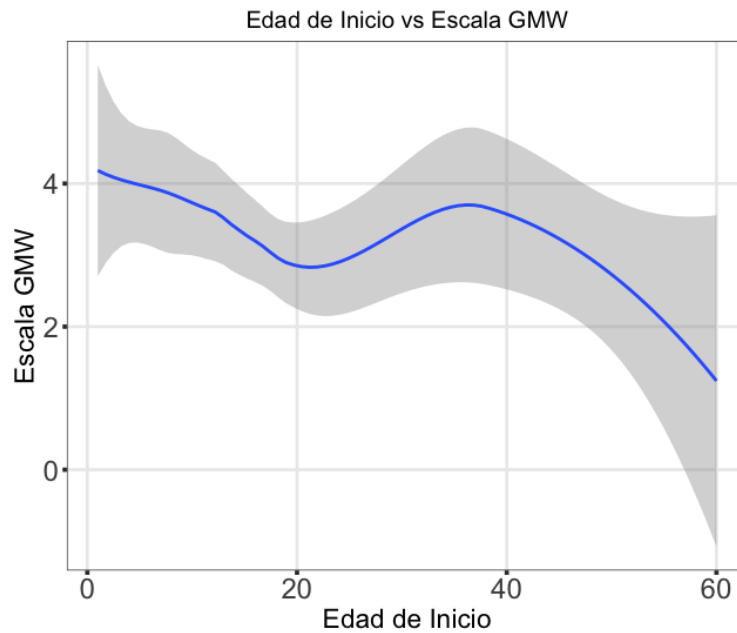


Figura 38. Gráfico de correlación entre la escala de GMW y la edad de inicio de los síntomas.

1.5. Fenómeno de anticipación

Comparando los datos de edad de inicio que tenemos dentro de las familias podemos valorar el posible efecto de anticipación, definido como una edad de inicio de los síntomas menor en los descendientes frente a sus progenitores (edad de inicio menor en la 2ª generación, $p=0.008$). Hemos analizado la edad de inicio de 42 individuos pertenecientes a 18 familias con DFEH.

Familia	1ª Generación	2ª Generación	3ª Generación
Edad de inicio (años)			
1	22	21	
2	15	14	
3	15	10	
4	30	5	
5	18	20	
		14	
6	30	15	
7	16	9	
8	60	44	10
9	18	8	
		14	
10	15	2	
11	30	14	
		31	
12	4	13	
13	38	28	
14	40	4	
		19	2
15	37	28	
16	46	21	
17	30	30	
18	60	25	
Promedio	29.11	18.17	6
Desv est	15.63	10.34	

Tabla 9. Edad de inicio en 3 generaciones de 18 familias con DFEH1.

Hemos realizado la misma comparación con la escala GMW para evaluar si existe diferencia en la gravedad de los síntomas entre las generaciones. Este dato sólo se ha podido obtener en 10 familias (22 individuos).

Familia	1ª Generación	2ª Generación
	Escala GMW	
1	7	2
2	1	1
3	2	5
4	1	1
		2
5	3	2
6	2	3
7	5	1
		2
8	3	2
9	6	6
10	3	2
Promedio	3.3	2.6
Desv. est.	2.05	1.63

Tabla 10. Escala de GMW en 2 generaciones de 10 familias con DFEH1.

En nuestra serie no se observan diferencias en el valor de la escala de gravedad clínica entre las diferentes generaciones ($p=0.29$).

1.6. CPK

Al analizar los valores de la variable CPK medida en cada centro sanitario de origen en los pacientes con DFEH1 ($n=132$) obtuvimos un valor promedio de 494.7 U/L con bastantes valores extremos, por lo que puede ser más indicativo el valor de la mediana que se sitúa en 337.5 U/L. La distribución de la variable CPK no está relacionada con el tamaño del fragmento. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las determinaciones se han hecho en cada centro de origen, con unidades de referencia que quizás varíen entre los distintos centros.

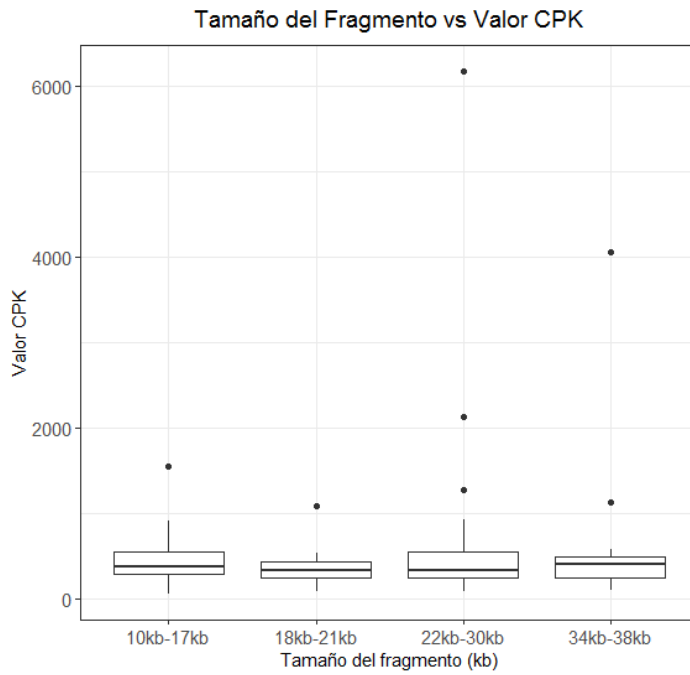


Figura 39. Gráfico de correlación de la CPK con el tamaño del fragmento en DEFH1.

2. Caracterización molecular de la muestra mediante electroforesis horizontal estándar (LGE)

La distribución del tamaño del fragmento *EcoRI* en nuestra serie de 4158 pacientes estudiados a lo largo de estos 20 años es la siguiente:

Tamaño del frag (kb)	Nº individuos
8	1
9	1
10	11
12	62
15	94
16	1
17	1
18	212
19	11
20	130
21	76
22	342
24	30
25	330
26	7
28	244
29	5
30	172
31	4
32	18
33	1
34	101
36	76
38	79
>38 kb	2149
Total	4158

Tabla 11. Distribución del tamaño del fragmento *EcoRI* en nuestra serie de pacientes.

Por lo tanto, de 4158 muestras recibidas por presentar clínica sugestiva de DFEH, un 42.2% (1753 individuos) han sido confirmadas por el diagnóstico molecular clásico, un 6.2% (256 individuos) se encuentra en la franja gris de casos dudosos (34-38 kb) y un 51.6% (2149 individuos) han sido descartados molecularmente para DFEH1.

Tamaño del fragmento <i>EcoRI</i>	Nº individuos	%
>38 kb	2149	51.6
34-38 kb	256	6.2
<34 kb	1753	42.2
Total	4158	100

Tabla 12. Distribución de nuestra serie de pacientes en No DFEH, DFEH1 (zona gris), DFEH1 confirmados.

RESULTADOS

Si clasificamos por rangos de tamaño de fragmento *EcoRI* en el rango patológico (<38 kb), la distribución de individuos con DFEH1 es la siguiente:

Rango de tamaño del frag (kb)	Nº individuos		%
10kb-11kb	13	171	8.5
12kb-14kb	62		
15kb-17kb	96		
18kb-19kb	223	429	21.4
20kb-21kb	206		
22kb-24kb	372	709	35.3
25kb-27kb	337		
28kb-29kb	249	444	22.1
30kb-31kb	176		
32kb-33kb	19		
34kb-37kb	177	256	12.7
38kb	79		
	2009	2009	100

Tabla 13. Distribución de los pacientes DFEH1 en función de los tamaños de fragmento *EcoRI*.

Los tamaños de fragmentos se distribuyen prácticamente como una distribución normal, aglutinándose la mayoría entre 18 y 33 Kb.

Hemos hecho un cálculo del % de acierto en la confirmación molecular de la sospecha clínica de las muestras recibidas a lo largo de estos 20 años, y la proporción se mantiene bastante constante, en torno a un acierto del 50% de los casos recibidos para estudio molecular de DFEH1.

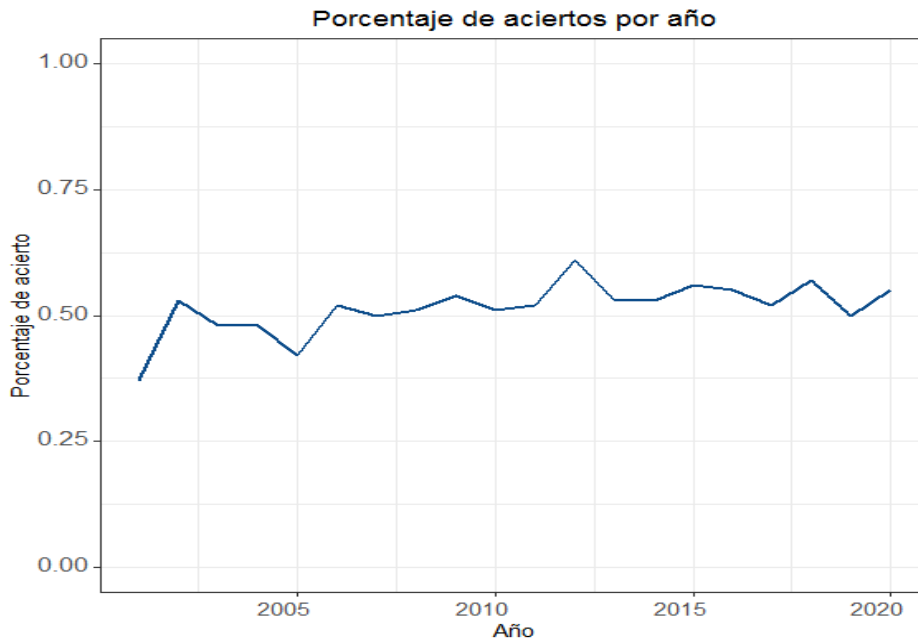


Figura 40. Porcentaje de acierto en la confirmación molecular de la sospecha clínica a lo largo de estos 20 últimos años.

2.1. Distribución de los pacientes por tamaño de fragmento y sexo

De los 2009 pacientes con un fragmento ≤ 38 kb conocemos el sexo en 1930. Si atendemos a estratificar los casos de acuerdo al número de repeticiones y sexo, la distribución del fragmento en el rango patológico diferenciado por sexos es la siguiente:

Rango de tamaño del frag (kb)	Nº Mujeres	Nº Varones	Total de individuos
10kb-11kb	8	5	13
12kb-14kb	29	31	60
15kb-17kb	33	55	88
18kb-19kb	107	106	213
20kb-21kb	100	96	196
22kb-24kb	176	181	357
25kb-27kb	132	191	323
28kb-29kb	118	123	241
30kb-31kb	72	100	172
32kb-33kb	8	10	18
34kb-37kb	71	102	173
38kb	38	38	76
Total	892	1038	1930

Tabla 14. Distribución de los pacientes DFEH1 en función de los tamaños de fragmento *EcoRI* diferenciados por sexos.

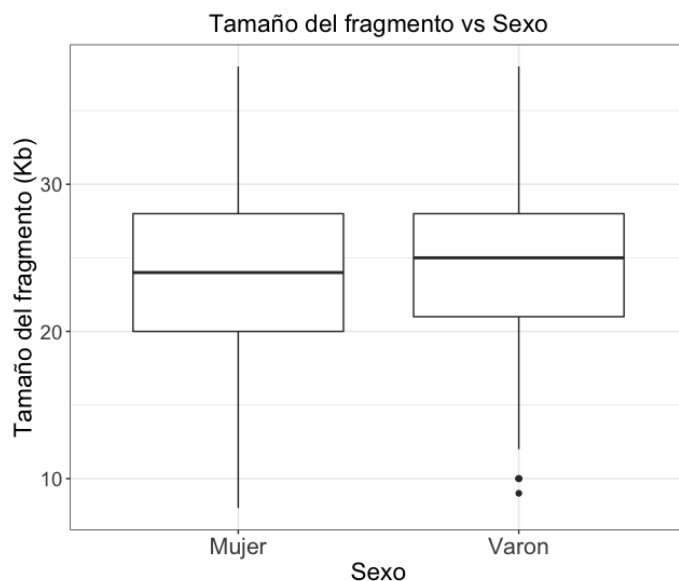


Figura 41. Gráfico de cajas que muestra la distribución del tamaño del fragmento en ambos sexos.

No hay diferencias significativas en la distribución según el sexo.

2.2. Transmisión del fragmento: Origen materno o paterno

Se ha podido valorar el patrón de transmisión del fragmento en 660 casos, en 381 el origen del fragmento ha sido materno (57.7%) lo que supone una diferencia significativa frente al 50% esperado ($p=0.0012$). Esta diferencia se debe principalmente a las diferencias encontradas en el rango 22kb-29kb, tal y como se observa en los valores p de la tabla.

Rango de tamaño del frag (kb)	Origen materno		Origen paterno		Total casos	p
	n	%	n	%		
10kb-17kb	11	40.74	16	59.26	27	0.49
18kb-21kb	85	57.05	64	42.95	149	0.2219
22kb-29kb	230	63.36	133	36.64	363	0.00028
30kb-33kb	37	51.39	35	48.61	72	0.8676
34kb-38kb	18	36.73	31	63.27	49	0.1831
Total	381	57.73	279	42.27	660	

Tabla 15. Transmisiones de origen materno y paterno en casos familiares de DFEH1.

No hemos podido analizar si el sexo del progenitor transmisor influía en la gravedad o en la edad de inicio de los síntomas porque carecíamos de datos suficientes. Al analizar la

distribución de las posibles combinaciones, la transmisión progenitor-descendiente es la siguiente:

Rango de tamaño del frag (kb)	Madre-Hija	Madre-Hijo	Padre-Hija	Padre-Hijo	
10kb-17kb	6	5	8	8	27
18kb-21kb	44	41	33	29	147
22kb-29kb	116	112	55	78	361
30kb-33kb	17	20	17	18	72
34kb-38kb	12	6	17	14	49
Total	195 (29.7%)	184 (28%)	130 (19.8%)	147 (22.4%)	656 (100%)

Tabla 16. Patrón de transmisión del fragmento por rango de tamaños de fragmento.

Hay un mayor número de transmisiones vía materna en el rango de 22kb-29kb (Tabla 16).

Con los datos de los que disponíamos en relación a las edades de inicio de la transmisión materna y paterna, hemos encontrado una edad de inicio menor ($p=0.08$) en los casos de herencia paterna (19 años) frente a los casos de herencia materna (22 años). El mismo análisis entre los distintos rangos de tamaño de fragmento en las 4 transmisiones apunta a que cuando la transmisión es madre-hijo la edad de inicio es más tardía que las demás, aunque no alcanza la significación estadística ($p=0.368$).

Rango de tamaño del frag (kb)	Edad de inicio del descendiente (años)			
	Madre-Hija	Madre-Hijo	Padre-Hija	Padre-Hijo
10kb-17kb	9.33	8.5	10.5	8.6
18kb-21kb	17.9	14.4	15.9	16.8
22kb-29kb	25.2	25.2	27.4	21.5
30kb-33kb	24.2	25.26	19.42	18.07
34kb-38kb	40	21	27	24.3
Total	21.69	22.03	17.71	19.92

Tabla 17. Edad de inicio en los rangos de tamaño de fragmento en los distintos patrones de transmisión del fragmento.

2.3. Casos esporádicos y familiares con DFEH1

Entre los 2009 casos estudiados con menos de 10 repeticiones (≤ 38 kb) tenemos 147 casos aparentemente *de novo* condición confirmada al estudiar a los progenitores o a través su historia clínica y de ellos 15 son casos mosaico. Si tenemos en cuenta los 1753 casos

estrictamente positivos para DFEH1 (<34 kb), un 8.4% han resultado casos *de novo* de los cuales un 0.85% han sido casos mosaico.

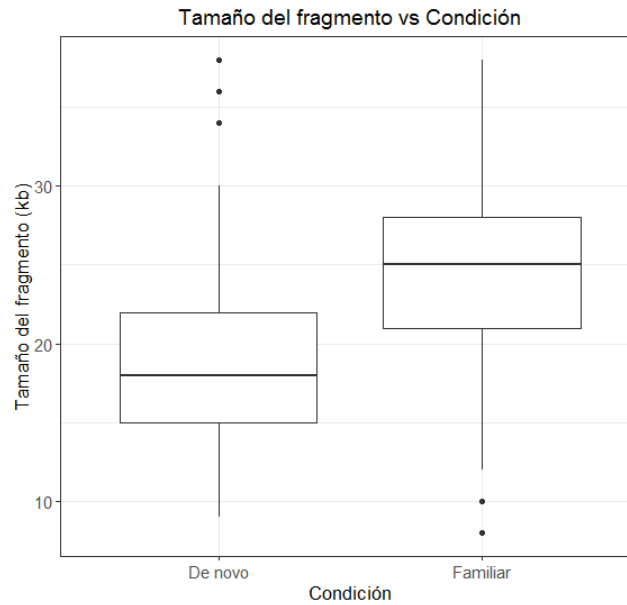


Figura 42. Gráfico de cajas mostrando la distribución del tamaño del fragmento entre casos *de novo* y familiares.

Se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en el tamaño del fragmento entre el grupo DFEH1 *de novo* (mediana de 18) frente a la DFEH familiar (mediana de 25).

2.4. Edad de inicio de los síntomas en las DFEH1 familiar y de novo y correlación con el tamaño del fragmento residual.

Para estudiar si existe una correlación entre la edad de inicio y el tamaño del fragmento hemos analizado los datos de los casos *de novo* ($n=92$) frente a los casos de familiares ($n=434$) en los que tenemos el dato de la edad de inicio.

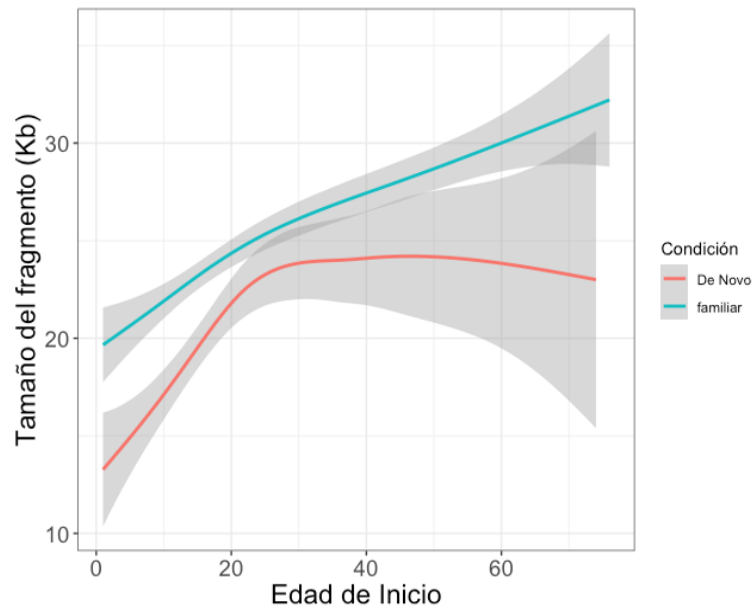


Figura 43. Gráfico de correlación entre edad de inicio de los síntomas y el tamaño de fragmento para los casos *de novo* y los casos familiares (la zona sombreada representa el intervalo de confianza).

Se observa una correlación lineal entre tamaño del fragmento y edad de inicio en toda la serie, a menor tamaño del fragmento una más precoz edad de inicio. En los casos *de novo* esta correlación se da únicamente en los fragmentos menores de 24 Kb. Por encima de este tamaño de fragmento desaparece la correlación.

Si analizamos la edad de inicio media entre ambos grupos (*de novo* y familiares), vemos que existen diferencias en la distribución, con una edad media de inicio en el grupo *de novo* de 19.89 años frente a una edad media de 25 años en el grupo familiar ($p < 0.001$).

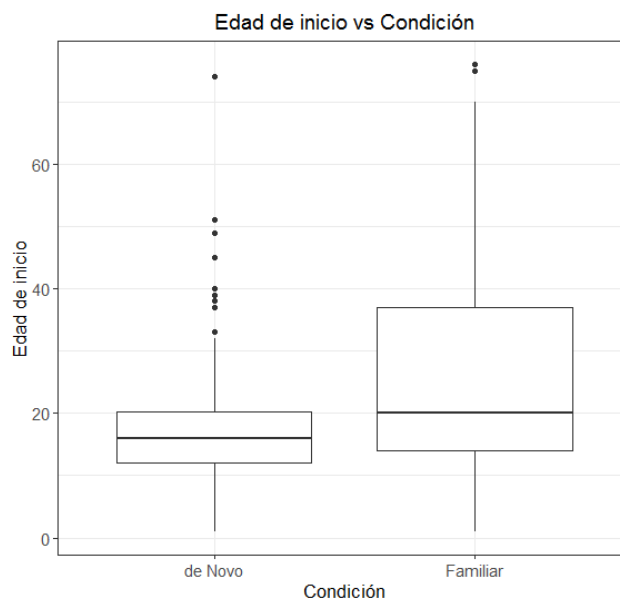


Figura 44. Gráfico de cajas mostrando la distribución de la edad media de inicio de síntomas en los casos *de novo* y los familiares.

RESULTADOS

La media de la edad de inicio entre hombres (24.36 años) y mujeres (25.69 años) no presenta diferencias significativas ($p= 0.367$).

2.5. *Pacientes asintomáticos con fragmentos en el rango patológico*

De las 4158 muestras recibidas, 1947 pertenecían a las 557 familias de las que al menos tenemos dos miembros estudiados molecularmente, mientras que el resto de muestras han llegado como sospechas de casos individuales (2211 muestras).

El 22.5% del total de muestras (932), se enviaron para realizar el diagnóstico de portadores ya que tenían algún antecedente familiar de DFEH1 pero se encontraban asintomáticos, 820 muestras dentro de los casos familiares y 112 individuos dentro de los casos individuales.

Tras realizar el diagnóstico de portadores en estas familias, encontramos 72 casos de portadores del fragmento patológico de la familia, y basándonos en la información clínica aportada, detectamos además otros 7 individuos aislados que son portadores de un fragmento en el rango patológico y permanecen asintomáticos.

La distribución de portadores asintomáticos es la siguiente:

Rango de tamaño del frag (kb)	Nº Mujeres	Nº Varones	Nº individuos	%	p
10kb-17kb	0	2	2	2.53	0.22
18kb-21kb	6	7	13	16.46	0.840
22kb-33kb	25	15	40	50.63	0.259
34kb-38kb	20	4	24	30.38	0.014
Total	51	28	79	100	

Tabla 18. Individuos asintomáticos portadores de un fragmento patológico.

La mayoría de casos de portadores asintomáticos (50.63%) se concentran en el rango de 22kb-33kb. En la zona gris se observa una distribución diferente del tamaño de fragmento por sexos, habiendo un exceso de mujeres ($p=0.014$).

2.6. *Pacientes con un tamaño del fragmento en la zona gris*

Como hemos comentado al inicio de este punto 2, hay 256 individuos con un tamaño de fragmento en la zona gris. De las familias estudiadas, hay 53 con fragmentos en el rango entre las 34kb-38kb (108 individuos). Esto supone que un 9.5% de las familias estudiadas están en la zona gris. Y tenemos por otra parte 148 individuos con fragmentos en este rango que desconocemos si tiene antecedentes familiares de DFEH1.

Tamaño del frag (kb)	Nº Familias
34 kb	25
36 kb	14
38 kb	14
Total	53

Tabla 19. Individuos en los casos familiares portadores de un fragmento en la zona gris.

3. Caracterización molecular de la repetición D4Z4

3.1. Electroforesis de campo pulsante (PFGE). Variante 4qA o 4qB.

Desde el año 2008 en que se adquirió el equipo (CHEF DRII System, BioRad), se han analizado 1015 pacientes mediante PFGE para poder caracterizar de manera más completa el diagnóstico en los casos en los que se sospechaba alguno de los siguientes supuestos:

- Existencia de un fragmento híbrido o mosaico,
- Descartar casos de delección de la región donde hibrida la sonda p13E-11,
- Para confirmar la variante A permisiva,
- Estudiar la segregación de los fragmentos en algunas familias complejas molecularmente.

De estos 1016 pacientes analizados, 576 no tenían fragmentos en el rango patológico (>38kb) y 439 tenían al menos un fragmento en el rango patológico (≤38 kb).

En los individuos que a la hora de hacer el diagnóstico resultaron tener los dos alelos del # 4 con tamaños del fragmento *EcoRI* >38 kb (no DFEH1), analizamos la variante A/B, y obtuvimos la distribución que presentamos en la Tabla 20, del número de fragmentos encontrados que eran variante A y variante B para los dos alelos del # 4 y para los dos alelos del # 10.

Rango tamaño de fragmento <i>EcoRI</i> (kb): >38 kb							
Nº Fragmentos <i>EcoRI</i> analizados: 576 pacientes							
Alelo 4(1): 336 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 4(2): 270 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 10(1) 472 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 10(2):350 fragmentos <i>EcoRI</i>	
4(1) A	4(1) B	4(2) A	4(2) B	10(1) A	10(1) B	10(2) A	10(2) B
251	85	159	111	465	7	333	17

Tabla 20. Distribución de la variante A/B para los alelos del # 4 y # 10 en pacientes No DFEH.

RESULTADOS

Estos resultados van asociados a los que presentaremos más adelante de los haplotipos SSLP. Los alelos del # 10 son siempre variante A, pero existe una excepción (10qB), cuando esos fragmentos están compuestos por grupos de repeticiones homogéneas del # 4 en el # 10 debido a una translocación entre ambos cromosomas (asociados al haplotipo 161: 10qB161T).

Por lo tanto, en este grupo tenemos 24 pacientes (4.2%) que portan fragmentos translocados con todo el grupo de repeticiones del # 4 translocadas al # 10 pero dentro del rango de la normalidad. Estos individuos se denominan trisómicos, ya que al hacer el diagnóstico nos vamos a encontrar con 3 fragmentos *EcoRI* con apariencia de ser del # 4 pero uno de ellos será uno de los alelos del # 10, pero que tiene repeticiones del # 4 translocadas.

Analizamos la distribución de los fragmentos que eran variante A y B en 127 individuos con un tamaño de fragmento *EcoRI* en la zona gris (34-38 kb) en uno de los dos alelos del # 4 (por lo tanto, DFEH1 dudosa). La distribución de las variantes A y B para los dos alelos del # 4 y los dos alelos del # 10 se presentan en la siguiente tabla:

Rango tamaño de fragmento <i>EcoRI</i> (kb): 34-38 kb							
Nº Fragmentos analizados: 127 pacientes							
Alelo 4(1): 87 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 4(2): 64 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 10(1): 86 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 10(2): 60 fragmentos <i>EcoRI</i>	
4(1) A	4(1) B	4(2) A	4(2) B	10(1) A	10(1) B	10(2) A	10(2) B
76	11	33	31	84	2	56	4

Tabla 21. Distribución de la variante A/B para los alelos del # 4 y # 10 en pacientes DFEH1 en la zona gris.

Analizamos también la distribución de los fragmentos que eran variante A y B en 312 individuos con un tamaño de fragmento *EcoRI* <34 kb (DFEH1) en uno de los dos alelos del # 4. La distribución de las variantes A y B para los dos alelos del # 4 y los dos alelos del # 10 se presentan en la siguiente tabla:

Rango tamaño de fragmento <i>EcoRI</i> (kb): <34 kb								
Nº Fragmentos analizados: 312 pacientes								
Alelo 4(1): 219 fragmentos <i>EcoRI</i>			Alelo 4(2): 150 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 10(1): 213 fragmentos <i>EcoRI</i>		Alelo 10(2): 234 fragmentos <i>EcoRI</i>	
4(1) A	4(1) B	4(1) C	4(2) A	4(2) B	10(1) A	10(1) B	10(2) A	10(2) B
213	6	1	95	68	213	6	155	19

Tabla 22. Distribución de la variante A/B para los alelos del # 4 y # 10 en pacientes DFEH1.

En los casos con fragmentos ≤ 38 kb, como en los pacientes no DFEH1, en el # 10 encontramos la variante B debido a los alelos translocados del # 4 al # 10 que hemos comentado y que tienen un haplotipo 10qB161. Esto lo podemos ver en 31 pacientes de 439 analizados (127 en la zona gris y 312 con fragmentos menores de 34 kb) mediante PFGE (7%).

En la zona gris, hemos podido analizar la variante A y B en el fragmento con el tamaño patológico que tenemos en el alelo 1 del # 4 en 87 individuos con DFEH1 dudosa. Para que se exprese la enfermedad, además de un fragmento en el rango patológico se necesita que ese fragmento tenga una variante A permisiva, que en la mayoría de los casos es la 4qA161. En 76 de los casos sucede así, pero nos encontramos que en 11 casos el fragmento patológico va asociado a la variante B que no es permisiva.

En los casos con un fragmento < 34 kb, hemos analizado la variante A/B en 312 casos, 213 con una variante A, por lo tanto, confirmados como DFEH1, pero hay 6 casos con variante B y 1 caso que no estaba asociado ni a la variante A ni B por lo que será la que en previos artículos publicados han llamado variante C (Thomas NS y cols., 2007).

Los casos que no tenían variante A fueron:

- 4 individuos pertenecientes a la misma familia y otros 2 individuos independientes, son portadores de un fragmento de 30 kb asociado a la variante no permisiva 4qB163 por lo que estos individuos no tienen una DFEH1, son falsos positivos.
- 1 individuo porta la variante C previamente descrita que está asociada con un fragmento mosaico de 15 kb y que por tanto es una DFEH1.
- El resto de individuos portadores de variantes no permisivas se encuentran en la zona gris (34-38 kb) y por tanto se descarta la DFEH1 en estos casos: 2 individuos asociados a la variante 4qB161, 6 individuos asociados a la variante 4qB163, 2 con un fragmento asociado a la variante 4qB168, y 1 asociado a la variante de 4qB166.

El estudio de la variante 4qA/4qB no se realiza de rutina, ya que de acuerdo Tawil R y cols. (2015), si en pacientes con un fenotipo sugestivo de DFEH se encuentra un fragmento *EcoRI* asociado al # 4 en el rango patológico se puede considerar causal de la DFEH1 y el realizar el tipaje para ver si es variante A o B no mejora la especificidad ni la sensibilidad de la técnica que son del 93% y del 98% respectivamente (Tawil R y cols., 2015).

3.2. Haplotipos SSLP (Simple sequence length polymorphism)

El estudio del SSLP se realizó para confirmar que el alelo patológico encontrado en los casos de DFEH1 pertenezca a las variantes permisivas patológicas ya descritas: 4qA161, 4qA161L, 4qA159, 4qA168 y para excluir como patogénicos aquellos haplotipos no permisivos

RESULTADOS

asociados a fragmentos en el rango patológico (4A166, 4B163, 4B168, 10A166, 10A164, 10B161T, y 10A176T).

En los casos de DFEH2 se realiza porque, aunque los dos alelos del # 4 tienen tamaños superiores a las 38kb, el alelo del # 4 asociado a la enfermedad debe tener un tamaño entre las 34kb-70kb (8-20 repeticiones D4Z4) y tiene que tener un haplotipo permisivo.

El haplotipo SSLP también nos ayuda a detectar fragmentos translocados entre los # 4 y # 10 debido a que tienen unos haplotipos específicos (10qB161, 10qA176T, 10qA180T). Los fragmentos híbridos H2 del tipo # 10 en el # 4, compuestos por repeticiones del # 4 seguidas de repeticiones del # 10, suelen tener también haplotipos bastante infrecuentes como el 148, 157 o 170.

En el estudio de SSLP hemos caracterizado los alelos del # 4 y del # 10 en nuestra serie y hemos obtenido los siguientes resultados:

# 4 No DFEH1			# 4 DFEH1		
Alelos	Número de casos	%	Alelos	Número de casos	%
A161B163	57	32.2	A161A161	39	30.23
A161A161	43	24.29	A161B163	27	20.93
A161A166	20	11.3	A161A166H	11	8.53
A161B168	10	5.65	A161B168	9	6.98
B163B163	7	3.95	A161A166	8	6.20
A161A168	4	2.26	A163B163	5	3.88
A161A166H	4	2.25	A161A163	4	3.10
A161B166	3	1.69	A161A170	2	1.55
A166B163	3	1.69	A156A161	1	0.78
A166HB168	3	1.69	A157A161	1	0.78
B163B168	3	1.69	A161A168	1	0.78
A161A163	2	1.13	A161B162	1	0.78
A161B161	2	1.13	A161B166	1	0.78
A163A163	2	1.13	A163A168	1	0.78
A166A166	2	1.13	A166HB163	1	0.78
A166B168	2	1.13	C161A161	1	0.78
A159B163	1	0.56	B163A161	8	6.2
A161A172	1	0.56	B166A166H	2	1.55
A161B174	1	0.56	A166A166	1	0.78
A163A170	1	0.56	B161A161	1	0.78
A166A166H	1	0.56	B161B168	1	0.78
A168A172	1	0.56	B163A166	1	0.78
A168B163	1	0.56	B163B163	1	0.78
B163A166H	1	0.56	B168A166H	1	0.78
B163B161	1	0.56	Total general	129	100
B168B166	1	0.56			
Total general	177	100			

Tabla 23. Distribución de alelos del # 4 en los individuos No DFEH1 (izda) y DFEH1 (dcha).

RESULTADOS

# 10 No DFEH1			# 10 DFEH1		
Alelos	Número de casos	%	Alelos	Número de casos	%
A166A166	120	70.18	A166A166	65	53.72
A166A164	26	15.20	A166B161T	20	16.53
B161TA166	8	4.68	A166A164	19	15.70
A166A176T	3	1.75	A166A161T	7	5.79
A176T161T	3	1.75	A176TA166	3	2.48
A166A180T	2	1.17	A166A166H	2	1.65
A162A166	2	1.17	A148A166	1	0.83
A162B161T	1	0.58	A164A161T	1	0.83
A164A166H	1	0.58	A166A180T	1	0.83
A164B161T	1	0.58	A166HA164	1	0.83
A166A168	1	0.58	B161TA164	1	0.83
A166HA164	1	0.58	Total general	121	100
A166HB161T	1	0.58			
B161TA176T	1	0.58			
Total general	171	100			

Tabla 24. Distribución de alelos del # 10 en los individuos No DFEH1 (izda) y DFEH1 (dcha).

Cromosomas 4-10 No DFEH1			Cromosomas 4- 10 DFEH1		
Alelos	Número de casos	%	Alelos	Número de casos	%
A161B163A166A176T	31	22.63	A161A161A166A166	24	22.22
A161A161A166A166	20	14.60	A161B163A166A166	18	16.67
A161A166A166A166	7	5.11	A161A166HA166A166	7	6.48
B163A166HA166A164	7	5.11	A161B163A166A164	5	4.63
A161B163A166A166	6	4.38	A163B163A166B161T	4	3.70
B163B163A166A180T	5	3.65	A161A161A166B161T	4	3.70
A161B168A166A166	4	2.92	A161B163A166B161T	4	3.70
A161B163A164A166	4	2.92	A161A166HA166A164	3	2.78
A161A166A164A166	3	2.19	A161B168A166A166	3	2.78
A161B168A166B161T	3	2.19	A161A166A166A164	3	2.78
A166B168A166A166	3	2.19	A161B168A161TA166	2	1.85
A161A166B161TA166	2	1.46	A166HB166A166A166	2	1.85
A161A168A166A166	2	1.46	A156A161A161TA166	1	0.93
A168A172B161TA166	2	1.46	A157A161A166A164	1	0.93
A161B168A164A166	2	1.46	A161A161A164A166	1	0.93
A166HB168166A164	2	1.46	A161A163A161TA166	1	0.93
A161A161A164A166	2	1.46	A161A163A166A166	1	0.93
B163B168A166A166	2	1.46	A161A166A166A161T	1	0.93
A159B163A166HB161T	1	0.73	A161A166A166A166	1	0.93
A161A161A162A166	1	0.73	A161A166A176TA166	1	0.93
A161A161A166B161T	1	0.73	A161A166B161TA164	1	0.93
A161A161A176TB161T	1	0.73	A161A166HB161TA166	1	0.93
A161A163A166A176T	1	0.73	A161A168A166B161T	1	0.93
A161A166HA164A166	1	0.73	A161A170A164A166	1	0.93
A161A166HA166A166	1	0.73	A161A170A166A166H	1	0.93
A161A166HA166A176T	1	0.73	A161B161A176TA166	1	0.93
A161A168A164A166	1	0.73	A161B163A161TA166	1	0.93
A161A172A166A166	1	0.73	A161B163A166A180T	1	0.93
A161B161A166B161T	1	0.73	A161B163A176TA166	1	0.93
A161B163B161TA166	1	0.73	A161B163B161TA166	1	0.93
A161B166A166A162	1	0.73	A161B166A166HA164	1	0.93
A161B166A166B161T	1	0.73	A161B168A164A166	1	0.93
A161B168A166HA164	1	0.73	A161B168A166A161T	1	0.93
A161B174A166A166	1	0.73	A163A168A166B161T	1	0.93
A163A163A166A166	1	0.73	A166A166B161TA166	1	0.93
A166A161A162B161T	1	0.73	A166B163A164A166	1	0.93
A166A161A164B161T	1	0.73	A166HB163A166A166	1	0.93
A166A166A166A164	1	0.73	A166HB168B161TA166	1	0.93

RESULTADOS

A166A166A166A166	1	0.73	B161B168A161TA166	1	0.93
A166B163A164A166H	1	0.73	B163A161A166A166H	1	0.93
A166B163A166A164	1	0.73	C161A161A166B161T	1	0.93
A166B163A166A166	1	0.73	Total general	108	100
A166B168A166A164	1	0.73			
A168B163A166A166	1	0.73			
B161B166A166A166	1	0.73			
B163B163A166A164	1	0.73			
B163B163A166A166	1	0.73			
B166A161A166A166	1	0.73			
Total general	137	100			

Tabla 25. Distribución de los alelos del # 4 y # 10 en los individuos No DFEH1 (izda) y DFEH1 (dcha).

Resumiendo, se puede ver que la distribución de los alelos más comunes es:

	No DFEH1		DFEH1	
	Haplotipo	%	Haplotipo	%
# 4	A161B163	32.2	A161A161	30.23
	A161A161	24.29	A161B163	20.93
# 10	A166A166	70.18	A166A166	53.72
	A164A166	15.21	A166B161T	16.53
Ambos	A161B163A166A176T	22.63	A161A161A166A166	22.22
	A161A161A166A166	14.6	A161B163A166A166	16.67

Tabla 26. Combinaciones de haplotipos más frecuentes de los alelos del # 4 y # 10 en los individuos No DFEH1 y DFEH1.

3.3. Contracciones inusuales

3.3.1. Translocaciones

Debido a la gran homología entre los cromosomas 4 y 10 se dan una serie de reordenamientos que pueden ser o bien homogéneos (todo el grupo de repeticiones de un alelo del # 4 se transloca al # 10 o viceversa) (Figura 45) o heterogéneos (fragmentos compuestos por repeticiones del # 4 seguidas por repeticiones del # 10 –híbridos H2- o viceversa –híbridos H1-).

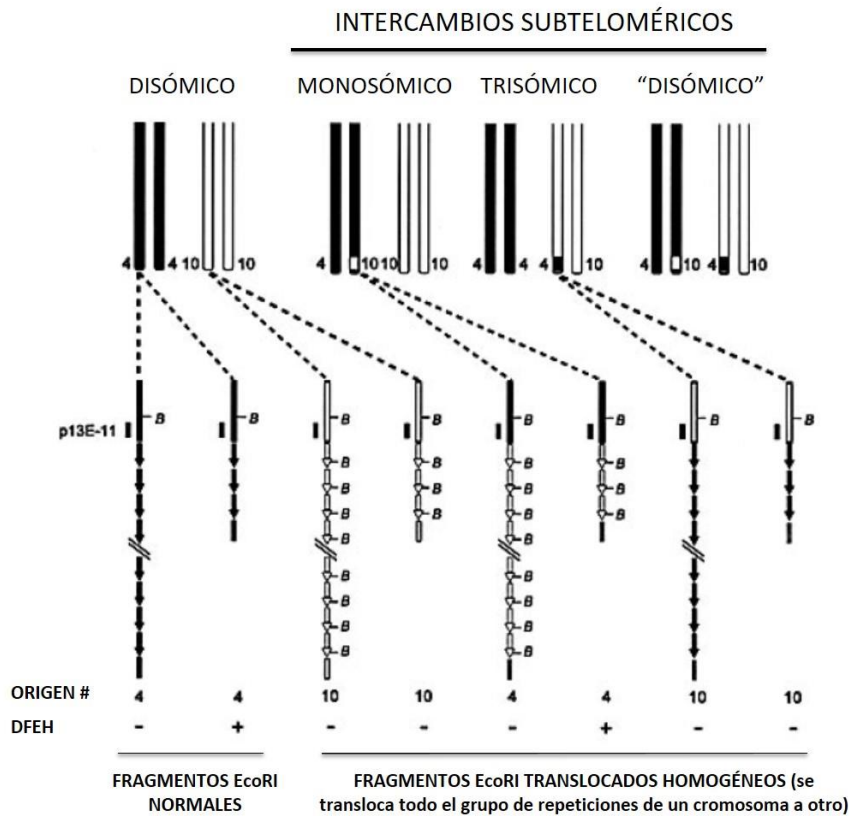


Figura 45. Intercambios subtelo­méricos homogéneos de todo el grupo de repeticiones del # 4 al 10 y viceversa.

Para poder reflejar los datos obtenidos en nuestra serie de pacientes vamos a seguir el esquema seguido por van Overveld PG en su artículo publicado en el 2000 en que describía la serie de las distintas constituciones subtelo­méricas del grupo de repeticiones D4Z4 en 208 individuos holandeses no relacionados (Figura 46).

	#4	#4	#10	#10	Clase	n
estándar	□▶▶▶▶	□▶▶▶▶	■▶▶▶▶	■▶▶▶▶	A	158
#10 en el 4	•	□▶▶▶▶	•	•	B	6
	•	□▶▶▶▶	•	•	C	5
	•	□▶▶▶▶	•	•	D	7
	□▶▶▶▶	□▶▶▶▶	•	•	E	0
#4 en el 10	•	•	■▶▶▶▶	•	F	18
	•	•	■▶▶▶▶	•	G	4
	•	•	■▶▶▶▶	•	H	1
	•	•	■▶▶▶▶	■▶▶▶▶	I	2
Constitución alélica compleja					X	1
Mosaicismo somático					M	6

Figura 46. Configuraciones subtelo­méricas de repeticiones en la región D4Z4 entre los cromosomas 4 y 10 (Imagen modificada de van Overveld PG y cols., 2000).

RESULTADOS

La región donde hibrida la sonda p13E-11 se representa en la imagen con un cuadrado mientras que las repeticiones del # 4 se representan con triángulos blancos y las del # 10 con triángulos negros. Los puntos indican la misma estructura de repeticiones que la que está arriba en la columna. Los individuos se han clasificado en 11 grupos diferentes:

Clase A: la configuración más común, es la distribución estándar con grupos de repeticiones del tipo # 4 en el # 4 y grupos de repeticiones del tipo # 10 en el # 10. Individuos disómicos (2 alelos del # 4 y 2 alelos del # 10).

Clases B-E: son individuos que portan grupos de repeticiones del tipo # 10 en el # 4, bien homogéneos (B y E) o heterogéneos (C y D).

Clases F-I: son individuos que portan grupos de repeticiones del tipo # 4 en el # 10, bien homogéneos (F e I) o heterogéneos (G y H).

El grupo B son los monosómicos, con apariencia de un solo fragmento del tipo # 4 y tres fragmentos del tipo # 10 (uno de esos fragmentos es el otro alelo del #4).

El grupo E son las nulisomías, con apariencia de 4 fragmentos del tipo # 10 (en la serie holandesa estudiada no encuentran ningún individuo con esa configuración).

El grupo I son los tetrasómicos, con apariencia de 4 fragmentos del tipo # 4 (dos de ellos corresponden a los fragmentos del # 10).

Los individuos de la clase C y H, tienen fragmentos híbridos H2 compuestos por repeticiones del # 4 seguidas por repeticiones del # 10, bien en el # 4 o bien en el # 10 respectivamente.

Los individuos de la clase D y G, tienen fragmentos híbridos H1 compuestos por repeticiones del # 10 seguidas por repeticiones del # 4, bien en el # 4 o bien en el # 10 respectivamente.

En nuestra serie de pacientes hemos encontrado las siguientes configuraciones subteloméricas:

	#4	#4	#10	#10	Clase	n
estándar					A	984
#10 en el 4	•		•	•	B	0
	•		•	•	C	47
	•		•	•	D	94
			•	•	E	0
#4 en el 10	•	•		•	F	111
	•	•		•	G	13
	•	•		•	H	9
	•	•			I	6
Constitución alélica compleja					X	23
Mosaicismo somático					M	21

Figura 47. Configuraciones subtelo méricas de repeticiones en la región D4Z4 entre los cromosomas 4 y 10 en nuestra serie de pacientes.

La mayoría de los individuos analizados son disómicos (76.5%, Clase A) y un 1.8% tiene una configuración alélica compleja. En los demás individuos (n=280), el tipo más frecuente de reordenamiento es la translocación del grupo homogéneo de repeticiones del # 4 en el # 10 (39.6%, trisómicos):

		%	
10 en el 4 (10/4)	Clase B	0%	Monosómico
	Clase C	16.8%	H2 en el # 4
	Clase D	33.6%	H1 en el # 4
	Clase E	0%	Nulisómico
4 en el 10 (4/10)	Clase F	39.6%	Trisómico
	Clase G	4.6%	H1 en el # 10
	Clase H	3.2%	H2 en el # 10
	Clase I	2.1%	Tetrasómico
		100%	

Tabla 27. Porcentaje de reordenamientos subtelo méricos del # 10 en el # 4 y viceversa en nuestra población.

Dentro del rango patológico tenemos 11 pacientes con DFEH1 en que el fragmento patológico es un fragmento híbrido, 9 individuos con un híbrido H1 (que comienza con repeticiones del # 10 seguidas de repeticiones del # 4) y 2 individuos con un híbrido H2 (que comienza con repeticiones del # 4 seguidas de repeticiones del # 10):

- Los híbridos H1 tienen un tamaño de 15 kb (2 individuos), 18 kb (3 individuos), 22 kb, 25 kb, 29 kb, 30 kb.
- Los híbridos H2 tienen un tamaño de 28 kb y de 30 kb.

RESULTADOS

Los 23 casos de constitución alélica compleja se han contado aparte porque no encajan en ninguna de las clases comentadas (por ejemplo, un individuo con un fragmento híbrido H1 o H2 en el # 4 y un fragmento homogéneo translocado con todas las repeticiones del # 4 al # 10).

3.3.2. Mosaicos

Los mosaicos se detectan porque se visualizan 5 alelos cuando se realiza el estudio molecular mediante PFGE (dos alelos del # 10, 1 alelo del # 4 y el otro alelo del # 4 se contrae y da lugar a otro fragmento (estos dos fragmentos se visualizan con una menor intensidad, dependiendo del porcentaje de células en que se encuentre ese tamaño de fragmento)).

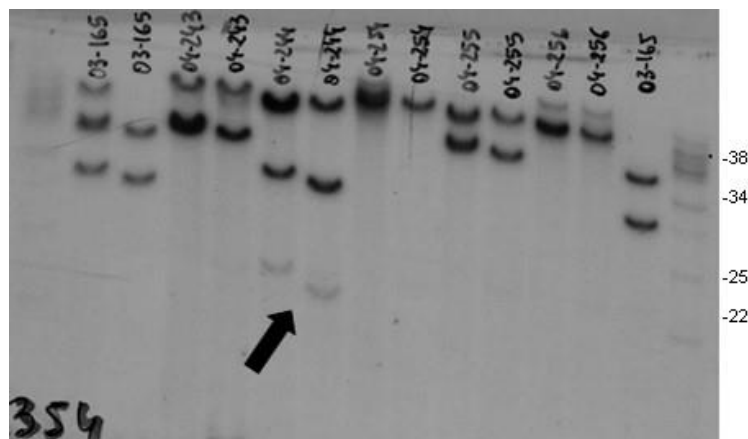


Figura 48. Paciente mosaico visualizado mediante LGE (flecha) (Esta membrana es anterior a la aparición del enzima *XapI* y solamente se realizaba la doble digestión *EcoRI* + *EcoRI/BlnI*).

Resumimos los resultados de los 21 mosaicos detectados en la siguiente tabla:

Individuo	Frag (kb)	Alelo 4 (1)	4 A/B (1)	CA 4 (1)	Alelo 4 (2)	4 A/B (2)	CA 4 (2)
		Tamaño frag en kb (% mosaicismo)			Tamaño frag en kb (% mosaicismo)		
1	>38	55	A	166	65(20)/75(80)	B	168
2	>38	45(50)/115(50)	A		63	B	
3	>38	55(70)/140(30)	B		65	A	
4	12	12(20)/25(80)		161			163
5	12	12(40)/60(60)			90		
6	15	15(20)/70(80)			45		
7	15	15(15)/130(85)	A	161	22	A	161
8	15	15(80)/75(20)	A	161	85	A	161
9	15	15(20)/12(80)	C	161	110	A	161
10	18	18(15)/65(85)		161	80		163
11	18	18 (80)/130(20)	A		100	A	
12	18	18(50)/85(50)	A		85	B	
13	18	18(70)/40(30)	A		65	B	
14	18	18(30)/120(70)	A		100	B	
15	18/25	18	A		25(70)/90(30)	B	
16	19	19(20)/50(80)			97		
17	22	22(70)/18(30)	A	161	80	B	163
18	25	25(20)	A	161	50	A	166
19	28	28	A		60(50)/70(50)	A	
20	29	29H1	A		65(20)/80(80)		
21	29	29(20)/38(80)	A		175	B	

Tabla 28. Mosaicos detectados en nuestra serie de pacientes.

RESULTADOS

Individuo	Frag (kb)	Sexo	Inicio (años)	Estado	Fragmento <i>EcoRI</i> mosaico
1	>38 kb	Mujer		Asintomática	No patológico (No DFEH1)
2	>38 kb	Mujer		Asintomática	No patológico (No DFEH1)
3	>38 kb	Mujer	53	Afecta	No patológico (No DFEH1)
4	12	Varón		Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
5	12	Varón	12	Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
6	15	Varón		Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
7	15	Mujer		Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
8	15	Varón	18	Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
9	15	Varón	33	Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
10	18	Mujer		Afecta	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
11	18	Varón		Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
12	18	Mujer		Asintomática	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
13	18	Mujer		Asintomática	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
14	18	Varón		Asintomático	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
15	18/25	Varón	10	Afecto	No patológico (DFEH1 por frag de 18 kb)
16	19	Varón		Afecto	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
17	22	Mujer		Asintomática	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
18	25	Mujer		Afecta	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)
19	28	Mujer	27	Afecta	No patológico (DFEH1 por frag de 28 kb)
20	29	Mujer		Afecta	No patológico (DFEH1 por frag híbrido de 29 kb)
21	29	Varón		Asintomático	Patológico (DFEH <i>de novo</i>)

Tabla 29. Sintomatología y tamaño de fragmento dentro de los casos mosaico.

En los 3 primeros individuos el fragmento mosaico está por encima de las 38 kb, por lo que no está asociado a la DFEH1.

En los individuos 19 y 20 son casos de DFEH1, pero no debido al fragmento mosaico que está por encima de las 38 kb, sino por otro fragmento *EcoRI* en el rango patológico (de 28kb y 29 kb respectivamente). En el individuo 15 a pesar de que el fragmento mosaico está en el rango patológico está asociado a la variante B no permisiva por lo tanto en ese individuo la enfermedad se expresa debido al otro fragmento de 18 kb que también tiene en el rango patológico.

En el resto de los 15 casos, la patología se debe a la aparición *de novo* de ese fragmento mosaico que se encuentra en el rango patológico. En los 2009 individuos estudiados con un fragmento <38 kb, hemos detectado mosaicismo en el 0.75% de los casos. Según la información clínica de la que disponemos y en los casos en que tenemos estudiados a los progenitores, de los 15 casos, en 10 de ellos (0.5%) se detectó el fragmento delecionado *EcoRI* en uno de los progenitores no afectados y en 5 casos (0.25%) se detectó dicho fragmento en los mismos pacientes con DFEH1 *de novo* en cuyos progenitores no se había detectado. En el

estudio de van der Maarel y cols. (2000) detectaron un 40% de casos mosaico y los porcentajes fueron del 14% frente al 26% respectivamente.

Entre los 15 casos en que la DFEH1 se debe a ese fragmento mosaico, tenemos 9 varones (dos de ellos asintomáticos) y 6 mujeres (tres de ellas asintomáticas).

Todos los casos detectados por LGE se han confirmado por PFGE. En los casos que hemos analizado muestras con la sospecha de delección de la región de la sonda no hemos obtenido ningún caso positivo.

Por lo tanto, la PFGE no mejora los resultados del LGE en los rangos ≤ 38 kb, pero resulta imprescindible para aclarar los casos dudosos (6.2%) ya que permite afinar el resultado y caracterizar los casos mosaicos y los casos híbridos.

No se han encontrado mosaicismos o híbridos en los cromosomas portadores de un fragmento en la zona gris, mientras que la mayoría de híbridos se concentran en los rangos mayores de 38 kb (sólo tenemos 11 casos de híbridos patológicos, 2 del tipo H2 y 9 del tipo H1) al igual que los reordenamientos homogéneos de todo el grupo de repeticiones, no así los casos mosaicos que se concentran en mayor medida en los cromosomas patológicos, aunque esto puede ser un sesgo técnico que no permite identificar mosaicos de fragmentos muy grandes.

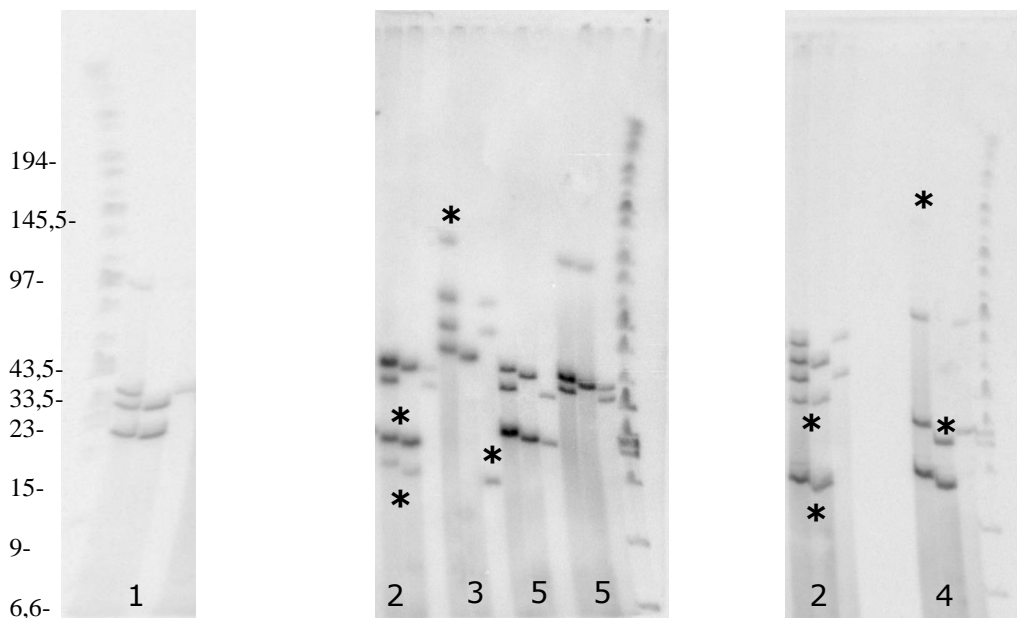


Figura 49. Ejemplos de algunas membranas de PFGE con distintos tipos de fragmentos:

RESULTADOS

- 1: Caso de heterocigoto compuesto (en este caso los alelos del # 4 tienen 22 y 34 kb).
- 2: Caso mosaico (se visualizan 5 alelos en total, dos del # 4 de menor intensidad -*- representan el mosaico y la intensidad depende del porcentaje de células que tengan ese tamaño de fragmento).
- 3: Caso híbrido H1 (el fragmento híbrido se indica mediante *).
- 4: Caso híbrido H2 (el fragmento híbrido se indica mediante *).
- 5: Casos disómicos (dos alelos del # 4 y dos alelos del # 10).

En el caso de fragmentos híbridos podemos visualizar dos tipos: los que comienzan por repeticiones del # 10 seguidas por repeticiones del # 4 (híbridos H1) y fragmentos que comienzan por repeticiones del # 4 seguidas por repeticiones del #10 (híbridos H2) (Figura 50).

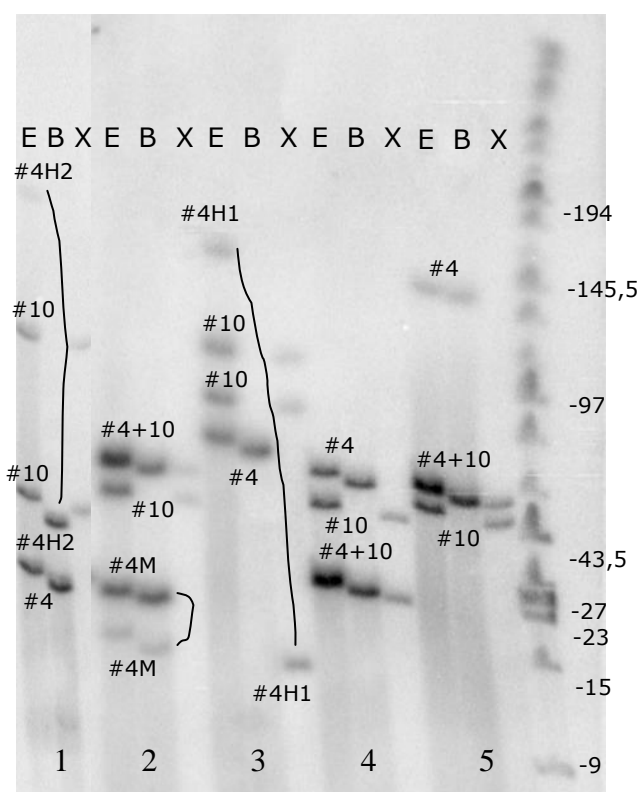


Figura 50. Membrana de PFGE con información completa de los alelos del # 4 y # 10 en 5 de nuestros pacientes (3 digestiones por paciente; E: *EcoRI/HindIII*, B: *EcoRI/BlnI*, X: *XapI*). Paciente 1: paciente con DFEH con un fragmento patológico del # 4 de 28 kb y otro fragmento híbrido H2 en el rango no patológico que comienza por repeticiones del # 4 seguidas de repeticiones del # 10 (fragmento híbrido señalado mediante la línea); Paciente 2: paciente mosaico con un alelo del # 4 de 22 kb que se contrae a otro de un tamaño de 18 kb, el otro alelo del # 4 con un tamaño de 70 kb que migra simultáneamente con un alelo del # 10 que tiene el mismo tamaño, y el otro alelo del # 10 tiene 55 kb; Paciente 3: individuo control con un fragmento híbrido H1 de 150 kb que comienza por repeticiones del # 10 y continúa por repeticiones del # 4 (señalizado por la línea), tiene otro alelo del # 4 con un tamaño de fragmento de 75 kb, un alelo del # 10 de 85 kb y el otro alelo del # 10 de 110 kb; Paciente 4: paciente disómico (2 alelos del # 4 y 2 del # 10) con DFEH con un fragmento patológico de 28 kb comigrando con un alelo del # 10 del mismo tamaño; Paciente 5: individuo control en el que se pueden observar los 2 alelos del # 4 y los 2 del # 10.

3.3.3. Heterocigotos compuestos

Se han descrito en la literatura individuos con DFEH que tienen 2 fragmentos en el rango patológico de la enfermedad (Wohlgemuth M y cols., 2003), que pueden ser uno permisivo (variante A) y el otro no permisivo (variante B) o bien ser los dos fragmentos permisivos. Al analizar nuestra serie hemos encontrado 11 casos de pacientes con los dos alelos del # 4 en el rango patológico (ver ejemplo en la Figura 50):

Individuo	Tamaños de los frag (kb)	Alelo 4 (1)	4 A/B (1)	CA 4(1)	Alelo 4 (2)	4 A/B (2)	CA 4(2)	Sexo
1	30/36	30H1(18)	A	166H	36	A	161	Varón
2	34/38	34	A	161	38	A	161	Varón
3	22/34	22	A	161	34	A	161	Mujer
4	22/28	22	A	161	28	A	166	Varón
5	22/28	22	A	161	28	A	163	Mujer
6	32/36	32	A	156	36	A	161	Mujer
7	25/30	25	A	161	30	B	163	Mujer
8	25/34	25	A	161	34	B	163	Varón
9	25/34	25	A	161	34	B	163	Mujer
10	18/25	18	A		25(70%)90(30%)	B		Varón
11	22/28	22	A	161	28	A	168	Mujer

Tabla 30. Casos de heterocigotos compuestos en nuestra serie.

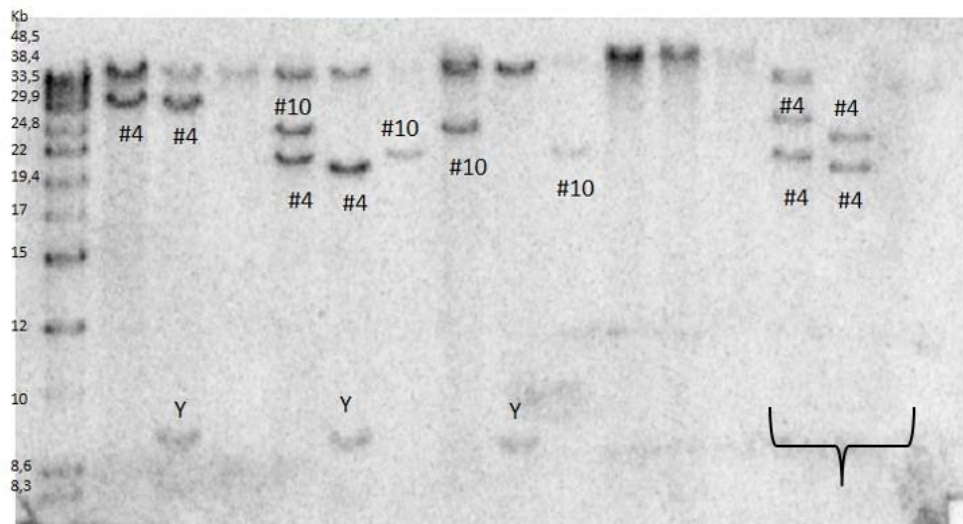


Figura 51. Membrana de LGE en la que se pueden ver la composición de los alelos del # 4 y # 10 en 5 de nuestros pacientes. El último individuo es un heterocigoto compuesto, ya que tiene dos fragmentos del # 4 por debajo de los 38 kb (22/28).

En 7 de los casos 11 casos los dos alelos del # 4 portan fragmentos permisivos asociados a la variante A y mientras que los 4 restantes portan en un alelo del # 4 un alelo

permisivo (normalmente suele ser el de menor tamaño) y un alelo del # 4 no permisivo (variante B). El individuo 10 comentado en el apartado de moaicismo, su fragmento de 25 kb no es permisivo.

El individuo 3 es un caso esporádico en su familia y es el único con dos fragmentos en el rango patológico (de 22 kb y 34 kb). Este paciente tenía 6 hermanas más y 3 de ellas que estaban asintomáticas eran portadoras del fragmento de 34 kb 4qA161, pero este fragmento no estaba asociado a la DFEH en esta familia (eran casos de población control con un fragmento de 34 kb que no estaba relacionado con la DFEH1). Este es un caso que ejemplifica muy bien lo importante que es caracterizar clínica y molecularmente el caso dentro del contexto familiar.

3.3.4. Fragmentos no patológicos en el rango ≤ 38 kb

Hemos establecido de acuerdo a la literatura que se necesita portar un fragmento *EcoRI* asociado al # 4 en el rango patológico, pero también hemos visto que ese fragmento tiene que estar localizado en un # 4 con un haplotipo permisivo. En este apartado vamos a describir los casos que podrían llevar a confusión porque no cumplen estos requisitos:

Tenemos por una parte los 17 individuos con fragmentos no permisivos que hemos encontrado (6 con un fragmento de 30 kb y el resto con fragmentos con un tamaño dentro de la zona gris) y que hemos comentado en el apartado 2.1 de la PFGE y variante 4qA/4qB.

Pero aquí también tenemos que contar con los fragmentos asociados al # 10 que están en el rango patológico y que no debemos confundir con los asociados al # 4. Para esto nos ayudamos de la triple digestión que discrimina los fragmentos cuyo origen es # 4 de los del # 10 (Imagen 52). Pero existen casos que nos podrían llevar a confusión y para los que es preciso tener experiencia en la interpretación de los resultados. Éste es el caso de los fragmentos híbridos del tipo H1 (empiezan por repeticiones del # 10 seguidas de repeticiones del # 4) que tienen el mismo patrón que los fragmentos del # 10 y se visualizan también en la primera y tercera digestión que realizamos. Normalmente la diferencia esperada entre esas digestiones en los fragmentos del # 10 es de 6 kb y contando con eso podría discriminarse, pero podría darse la casualidad que el patrón del fragmento híbrido coincidiese con esa diferencia. En estos casos el hacer el haplotipo SSLP tampoco nos serviría de dato de apoyo porque el haplotipo mayoritario para los alelos del # 10 es el 166 y los fragmentos híbridos también tienen en mismo haplotipo 166 (en ese caso se marca como 166H). Tendríamos que revisar el caso mediante PFGE y ver la composición del resto de los alelos. También tendríamos el riesgo

de dar un resultado con un falso negativo en los casos de monosomía en que el grupo de repeticiones del tipo # 10 se transloca al # 4 dando apariencia de ser un fragmento del # 10 pero realmente su origen es # 4 y si este fragmento tiene menos de 38 kb es patológico y causante de la DFEH1. Estos casos son difíciles de detectar. En todos los pacientes que hemos estudiado mediante PFGE no hemos encontrado ningún caso de monosomía.

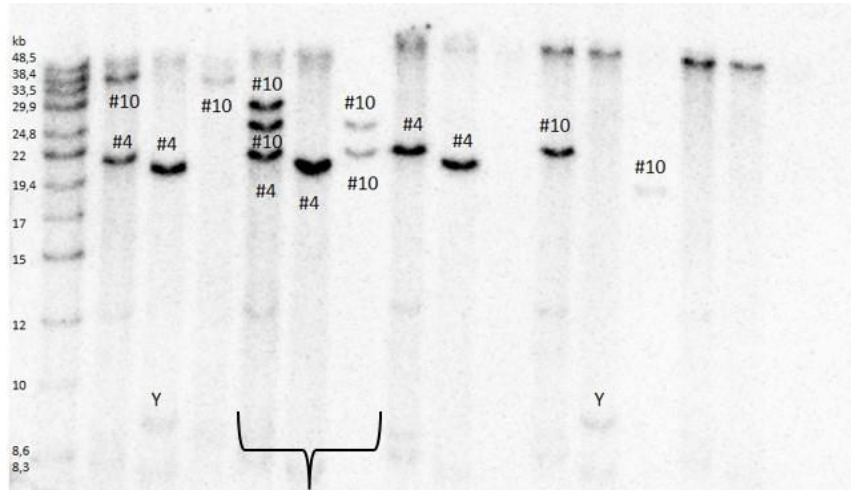


Figura 52. Fragmentos del # 10 en el rango patológico en una de nuestras membranas. El segundo individuo es portador de un fragmento *EcoRI* del # 4 en el rango patológico y los fragmentos *EcoRI* de los dos alelos del #10 tienen tamaños por debajo de las 38 kb.

No es muy frecuente encontrar fragmentos del # 10 con tamaños menores de 38 kb (se estima que puede llegar a suceder en un 10% de la población). En nuestra serie de pacientes hemos encontrado la siguiente distribución:

Rango tamaño de frag (kb)	Alelo # 10 (1) ≤38 kb	Alelo # 10 (1) <38kb y Alelo # 10 (2) <38 kb	Total
Alelo # 4 (1) >38 kb	242	24	266
Alelo # 4 (1) ≤38 kb	153	14	167
Total	395	38	433

Tabla 31. Fragmentos del # 10 menores de 38 kb en nuestra serie de pacientes No DFEH y DFEH1.

En 266 pacientes (61.4%) en que se ha descartado la DFEH1 por no tener ningún fragmento del # 4 <38 kb, hemos encontrado que 242 individuos tienen un fragmento del # 10 por debajo de las 38 kb y que otros 24 individuos tienen fragmentos del # 10 con la contracción en los dos alelos del # 10.

Pero en pacientes confirmados como DFEH1 con un fragmento contraído del # 4 también nos encontramos que tienen fragmentos contraídos en el # 10 (38.5%), bien en uno de sus alelos del # 10 (91.7%) o incluso en los dos alelos del # 10 (8.3%).

En los casos de DFEH1 este hecho es muy importante porque existe una correlación entre el tamaño de los fragmentos y el % de metilación de la región D4Z4. Esto se pudo corroborar en una publicación conjunta con el Dr. Richard Lemmers en el 2015 (Referencia 9 del anexo de artículos derivados de esta tesis). En el artículo se establece un parámetro que se denomina Delta 1 que es la metilación observada menos la metilación predicha basada en el número total de repeticiones D4Z4.

Por ejemplo, estos fragmentos del # 10 \leq 38 kb en pacientes con una DFEH1 pueden dar una metilación observada menor de la esperada para esos casos (incluso valores de metilación <25% como una DFEH2) y por eso se debería corregir en estos calculando el factor Delta 1 que tiene en cuenta los tamaños de los fragmentos del # 4 y del # 10.

En nuestra serie de pacientes, encontramos esta característica en casi el 5% de los casos. Hemos analizado la metilación en 4 casos de DFEH1 que además tienen fragmentos <38 kb en los dos alelos del # 10 con unos resultados de: 18.3%, 24.2%, 20.4% y 6.8% esperables para una DFEH2 (<25%).

4. *Diagnósticos prenatales*

Hemos realizado 93 estudios de diagnóstico prenatal pertenecientes a 64 familias distintas. Las muestras de partida han sido, ADN extraído de vellosidad corial (83) y ADN extraído de células cultivadas de líquido amniótico (10). Se han obtenido 40 resultados positivos (43%) y 53 resultados negativos (57%). Dentro de las 64 familias estudiadas en los prenatales, se han hecho el estudio prenatal 66 gestantes, ya que en dos familias se han hecho el estudio dos personas afectas dentro de la misma familia. En varias familias, la misma mujer se ha sometido al estudio prenatal en más de una ocasión. Hay 3 casos en que la misma mujer se ha sometido a 4 prenatales, 4 casos a 3 prenatales, 10 casos a dos prenatales y el resto de mujeres a un solo prenatal.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Origen materno	%	Origen paterno	%	Total	%
Feto Sano	27	58.7	26	55.3	53	57
Feto Afecto	19	41.3	21	44.7	40	43
Total	46	100	47	100	93	100

Tabla 32. Resultados de los prenatales realizados de DFEH1.

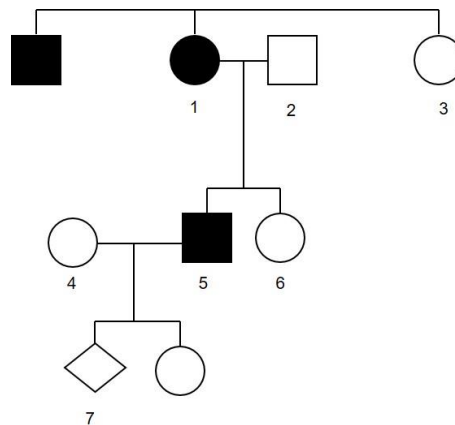
En los 46 casos en que la madre era la portadora del fragmento patológico, transmite el fragmento en el 41.3% de los casos ($p=0.403$), mientras que en los 47 casos en que el padre era el portador, lo transmite en el 44.7% de los casos ($p=0.341$).

El tamaño medio del fragmento heredado de origen materno ha sido de 22.2 kb y el tamaño medio del fragmento heredado de origen paterno ha sido de 21.9 kb.

Hemos realizado el estudio indirecto mediante marcadores en 23 de los 93 estudios prenatales (25%) en paralelo al método directo mediante Southern blot ya que contábamos con familiares afectos previamente estudiados e individuos sanos dentro de la misma familia.

Entre las 66 familias en que se han realizado los estudios prenatales cabe destacar 3 de ellas por tener características peculiares (A, B, C):

Familia A



Recibimos para hacer el estudio molecular la muestra del individuo 5 en el año 2003. Resultó ser un caso heterocigoto compuesto con dos fragmentos en el rango patológico, uno de 22 kb y uno de 28 kb. En estos casos se debe ver si los fragmentos están en un #4 permisivo (variante A) o no permisivo (variante B). Se realizó el estudio y los dos fragmentos eran variante A. Al año siguiente la pareja (individuos 4 y 5) se quedó embarazada y querían hacer el estudio prenatal. En este caso se necesitaba estudiar a más miembros de la familia para poder caracterizar la penetrancia de los dos fragmentos encontrados en el individuo 5 y su patogenicidad. Nos enviaron al resto de miembros de la familia con los siguientes resultados:

- Individuo 1: 22 kb 4qA
- Individuo 2: 28 kb 4qA
- Individuo 3: >38 kb 4qB
- Individuo 4: >38 kb 4qB
- Individuo 6: 28 kb 4qB

RESULTADOS

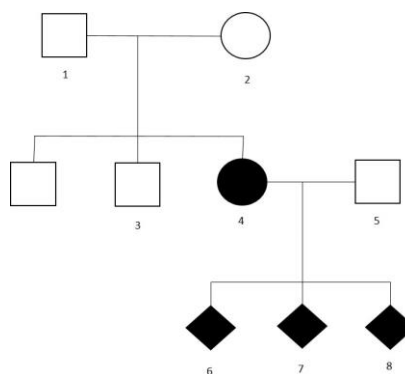
El individuo 5 había heredado vía materna el fragmento de 22 kb y vía paterna el fragmento de 28 kb. La madre y el padre fueron referidos como asintomáticos, aunque después de una reevaluación clínica, la madre presentaba síntomas muy leves. La hermana del individuo 5, era portadora del fragmento de 28 kb heredado también vía materna, y se encontraba totalmente asintomática.

No tuvimos acceso a la muestra del hermano del individuo 1 que podía corroborar nuestras sospechas en esta familia. Parecía que los individuos portadores del fragmento de 28 kb no expresaban la enfermedad mientras que los individuos portadores del fragmento de 22 kb presentaban síntomas. La madre del individuo 5 era portadora casi asintomática pero su hermano que sí presentaba síntomas, sospechamos que era portador también del fragmento de 22 kb. Al hacer el estudio prenatal se detectó que el feto había heredado el fragmento de 28 kb de su padre.

El estudio de todos los miembros de esta familia nos permitió con los conocimientos en esa época informar que parecía que el fragmento de 28 kb no era penetrante en esa familia y aunque estaba en el rango patológico no se expresa. Por lo que los portadores de este fragmento no llegarían a expresar la enfermedad.

Cuando años más tarde se descubrieron los haplotipos SSLP (año 2007), reevaluamos esta familia, y pudimos comprobar que este fragmento de 28 kb, a pesar de ser variante A, tenía un haplotipo 166 (4qA166) que es la única excepción de haplotipo con la variante A que no es permisivo.

Familia B



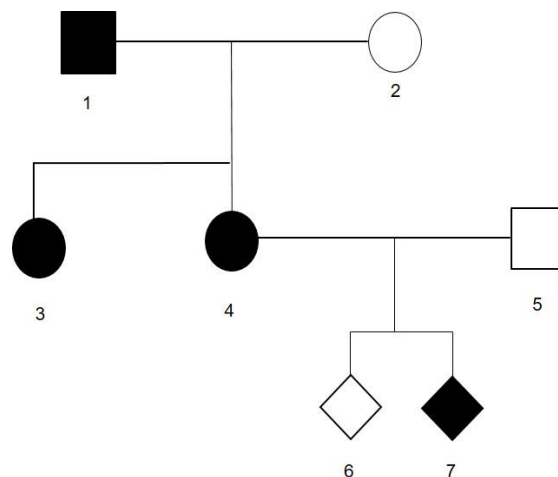
Se trata de una mujer (individuo 4) afecta que se hizo el estudio molecular en el año 2003 y como resultado se obtuvo un fragmento de 38 kb en el límite del rango patológico. El clínico responsable nos comentó que tenía un fenotipo muy típico de DFEH. Más tarde nos envían a los progenitores y al hermano para estudio molecular. La hija había heredado el fragmento de su madre (individuo 2), pero ésta última estaba asintomática.

A finales del año 2003 se publicó que los pacientes con DFEH tienen hipometilación en el alelo del # 4 que sufre la contracción de repeticiones. En el año 2005 se publicó que también los que no tenían la contracción (DFEH2) tienen una hipometilación <25% en esa región. Al estudiar la metilación en esta paciente, se detectó que la paciente tenía un 7% de metilación.

En el año 2011 se quedó embarazada y nos solicitó un diagnóstico prenatal en el que se vió que el feto había heredado el mismo fragmento de 38 kb así que se informó que en nuestra experiencia un fragmento de 38 kb no confiere una sintomatología tan acusada como tenía la paciente, lo que abría la posibilidad de tratarse de otro tipo de DFEH no asociada a un tamaño de fragmento menor de 38 kb. No obstante, la paciente decidió no seguir adelante con el embarazo. En el año 2012 se descubrió el gen SMCHD1, y siguiendo nuestro protocolo de diagnóstico revisitamos este caso para secuenciar el gen SMCHD1, encontrando la mutación c.565 A>G p.(Met189Val) en el exón 5.

Por lo tanto, este caso se trataba de una DFEH2, que además tenía un fragmento en el límite de 38 kb (DFEH1+DFEH2). La madre (individuo 2) que era portadora del fragmento de 38 kb, no tenía la mutación en SMCHD1 y tampoco la tenía su padre (individuo 1). Este caso por tanto es un caso esporádico de DFEH2. En el año 2014 y 2015 se volvió a quedar embarazada y como ya conocíamos la mutación puntual causante del fenotipo en el exón 5 del gen SMCHD1, secuenciamos directamente la mutación y analizamos el haplotipo. En los dos embarazos el feto heredó tanto la mutación patogénica como el haplotipo permisivo.

Familia C



En el año 2002 se realizó el estudio molecular a un varón con un fenotipo típico de DFEH (individuo 1) con un resultado confirmado para la DFEH1 con un fragmento *EcoRI* patológico de 28 kb.

En el año 2011 nos enviaron para estudio la muestra de su hija (individuo 4) que era también portadora del fragmento de 28 kb. En el año 2014 ésta (individuo 4) se quedó embarazada y enviaron la muestra del marido (individuo 5) y de la velloalidad corial para el estudio prenatal. El feto (6) no había heredado el fragmento de 28 kb, pero en los casos prenatales solemos hacer también el estudio de haplotipos SSLP (progenitores y feto) por si ayuda también a la informatividad del resultado mediante Southern. En este caso, al hacer el haplotipo observamos que la madre tenía el siguiente haplotipo: 163, 163, 166, 161. Esto significaba que la paciente tenía un haplotipo 163 en los dos alelos del # 4, un haplotipo 166 para uno de los alelos del # 10 y el otro alelo del # 10 tenía un haplotipo 161 por lo que debía ser un fragmento translocado con todo el grupo de repeticiones del # 4 en el # 10, con un haplotipo 10qB161T. Debido a esta posibilidad nos alarmamos, ya que normalmente el haplotipo 163 suele ir asociado a alelos no permisivos que son variante B. En un estudio en población control se vio que el haplotipo 163 va asociado en el 32.9% a la variante B y en un 0.9% a la variante A (Lemmers RJ y cols., 2010). Inmediatamente informamos de esto al centro remitente y nos planteamos analizar si el fragmento de 28 kb estaba asociado a la variante A (patológica) o a la variante B (no patológica, y entonces la patología no era producida por este fragmento). Realizamos el Southern blot e hibridamos con la sonda 4qA y efectivamente el fragmento era variante A. Así que por muy infrecuente que fuera tener un fragmento 4qA163, en este caso se dió esta combinación.

En el año 2015 enviaron a la hermana (individuo 3) que también fue portadora del fragmento de 28 kb.

En el año 2018 se volvieron a quedar embarazados (individuos 4 y 5) y ya que teníamos estudiados a varios miembros afectos de la familia, pedimos también muestra de la madre (individuo 2) para en paralelo al Southern blot, realizamos el estudio indirecto mediante los 11 marcadores proximales a la región D4Z4 (**ANEXO 5**) para poder determinar el haplotipo patológico que segregaba con la enfermedad y ver si el feto lo había heredado o no. En este caso el feto (7) heredó el fragmento de 28 kb visto mediante Southern blot y este resultado fue apoyado por el resultado de los marcadores.

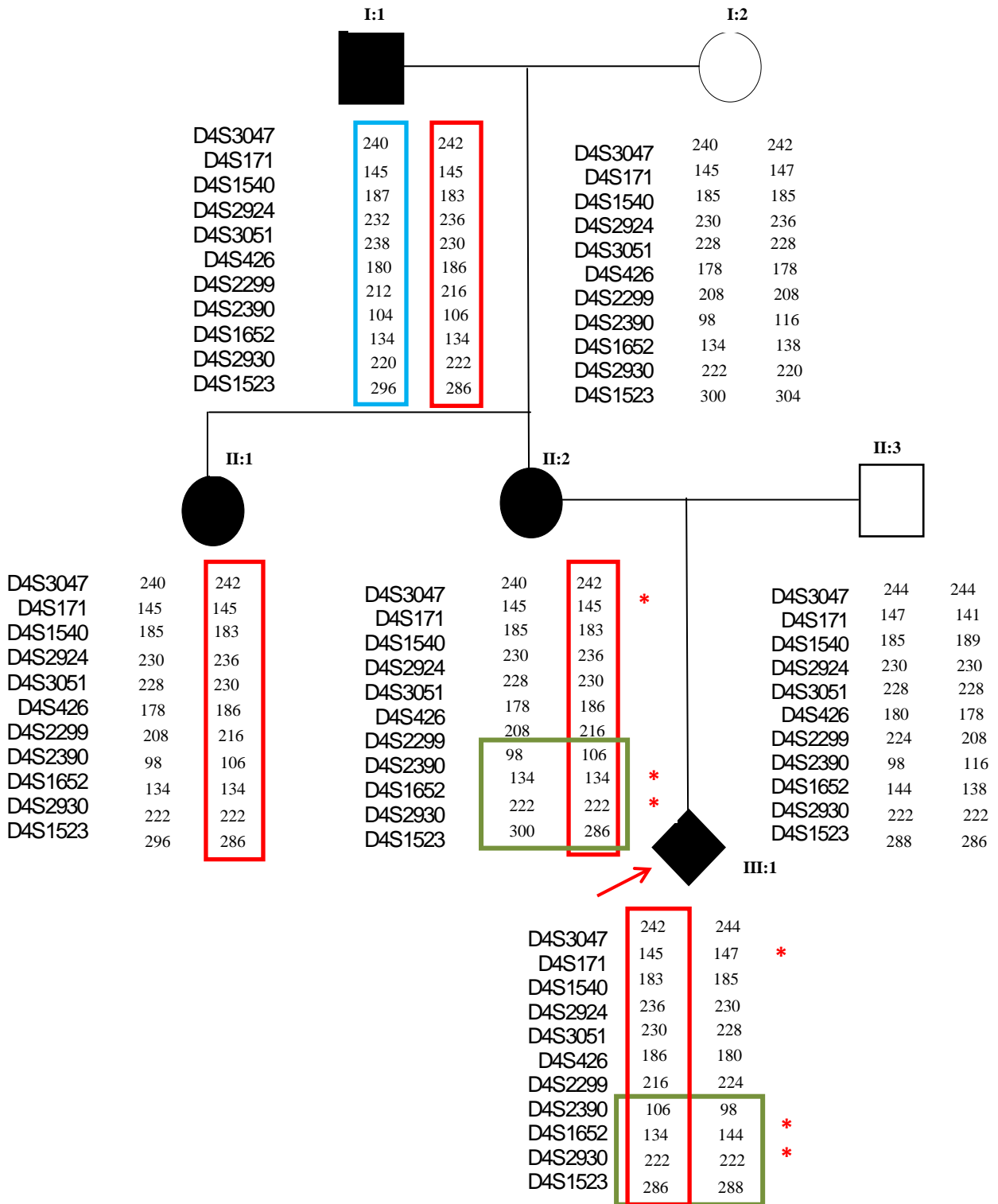


Figura 53. Estudio prenatal de DFEH1 de la familia C mediante marcadores proximales a la región D4Z4.

5. Pacientes con clínica de DFEH pero sin la contracción de D4Z4

5.1. DFHE tipo 2. Estudio de metilación.

Siguiendo los criterios descritos en Material y Métodos (punto 6) en nuestra serie de pacientes se ha realizado un muestreo y estudiado el nivel de metilación en 232 individuos con fenotipo compatible con DFEH y sin un fragmento en el rango patológico (<34 kb). El 31% de los casos (72) han sido positivos para DFEH2. De estos, 2 pacientes con mutación en DNMT3B, 70 pacientes DFEH2 con mutación en SMCHD1, y 8 de ellos tienen además un fragmento *EcoRI* en la franja gris (34-38 kb), por lo tanto son DFEH1 + DFEH2 (3.9%).

Estatus	Nº individuos estudiados	%
No DFEH	160	69
DFEH2	64	27,6
DFEH1+DFEH2	8	3,4
Total	232	100

Tabla 33. Pacientes DFEH2 y DFEH1+DFEH2 en nuestra serie.

Los pacientes DFEH2 con mutaciones en el gen SMCHD1 o DNMT3B tienen una hipometilación muy marcada (<25%). En la figura 54 se pueden ver 6 pacientes DFEH2 con hipometilación.

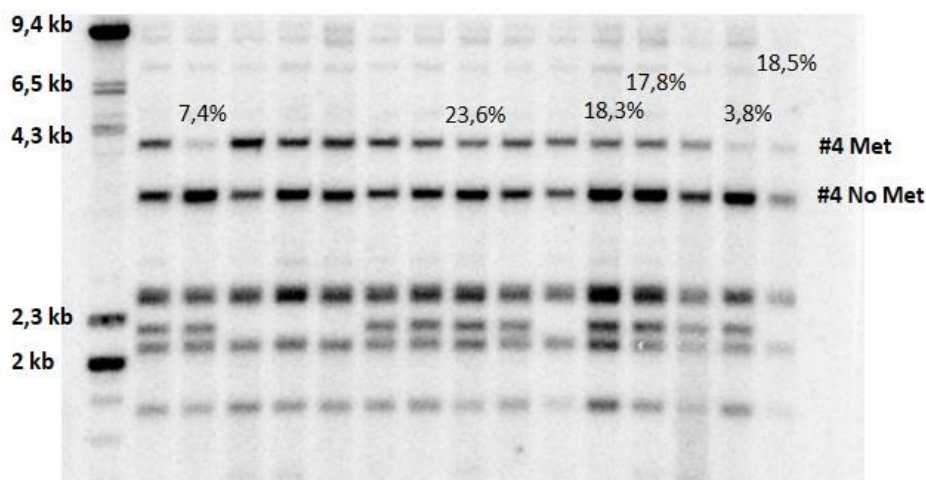


Figura 54. Membrana de uno de nuestros blots con 6 individuos con hipometilación. #4Met: # 4 metilado; #4No Met: # 4 no metilado.

Hemos resumido todas las variantes encontradas en la **Tabla 38 (ANEXO 6)**. En ella se ha incluido además de la mutación encontrada y el % de metilación, los tamaños del fragmento *EcoRI* para los dos alelos del # 4.

Aunque tenemos 72 casos de DFEH2 confirmados, como se puede observar en la tabla, algunos son esporádicos (42 casos) y en otros casos son casos familiares con varios individuos afectados (30 casos que pertenecen a 13 familias distintas).

Entre los casos con DFEH2 tenemos:

- Un caso se trata de un heterocigoto compuesto con dos mutaciones en el gen SMCHD1 que fue incluido en la publicación de van der Boogaard ML 2016 en la que colaboramos (Ref. 385).
- Un caso tiene un cambio intrónico en el gen SMCHD1 descrito como VUS además de un cambio en el gen DNMT3B predicho como patológico.
- Un caso con un cambio en el gen DNMT3B con predicción patológica, aunque no publicado en la literatura ni en las bases de datos (LOVD, HGMD, ClinVar). Este caso además se trata de un caso de DFEH1+DFEH2 porque porta además un fragmento *EcoRI* de 34 kb.
- Los otros 53 casos portan cambios en el gen SMCHD1, de los que están solamente publicados 15 de ellas (en las bases de datos LOVD, HGMD, ClinVar), los 38 restantes están pendientes de publicación.

En la **Tabla 39 (ANEXO 6)** se anotan como hemos comentado las variantes previamente publicadas y en las que no es el caso, las predicciones *in silico* de su patogenicidad.

Según Lemmers RJ y cols., 2015 en los casos de DFEH2 la gravedad viene determinada en parte por el tamaño del alelo permisivo y por otra parte por el tipo de mutación. En general, las mutaciones sin sentido dan un fenotipo más grave (efecto dominante negativo, P-ORF) que las mutaciones de cambio de pauta de lectura o codón stop que causan haploinsuficiencia (pérdida de función, D-ORF). No contamos con datos clínicos suficientes de los pacientes como para correlacionar la gravedad de la presentación clínica con el tipo de mutación.

La metilación media de los casos de DFEH2 en nuestra serie es del 11% (SD 5.6%).

Para caracterizar nuestra serie en función de la metilación, realizamos el estudio en un muestreo más amplio de muestras, sobre todo en los casos con fragmentos en la zona gris (34kb-38kb):

	Nº individuos (n=453)	% metilación (medio)	SD
Casos con fragmentos <34kb	66	29.6	10.5
Casos con fragmentos 34kb-38kb (no DFEH1+DFEH2)	130	31.6	12.2
Casos con fragmentos >38 (no DFEH2)	257	39.7	14.1

Tabla 34. Estudio de metilación en pacientes No DFEH, en pacientes en la zona gris (no DFEH1+DFEH2) y en pacientes DFEH1.

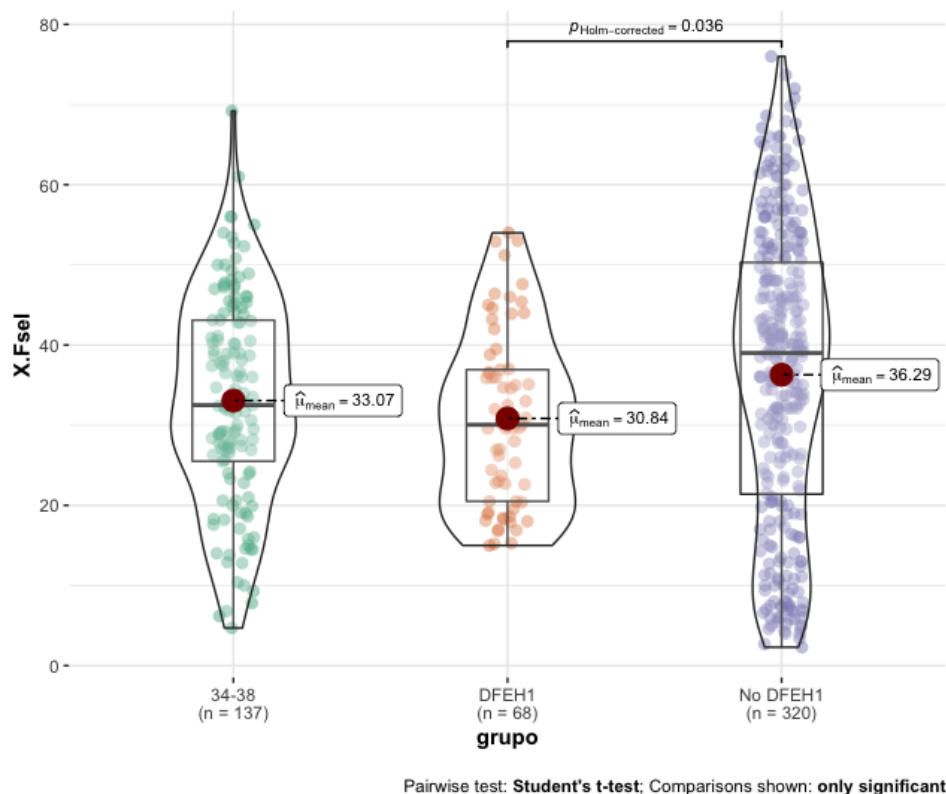


Figura 55. Distribución del % metilación (FseI) en los 3 grupos: DFEH1, DFEH1 (zona gris) y No DFEH.

Dentro de los casos estudiados en que hemos estudiado la metilación, hemos encontrado 29 pacientes (6.4%) con fragmentos en el rango de la zona gris y en tamaños mayores de las 38 kb que cumplen todos los requisitos para ser una DFEH2 (hipometilación + haplotipo permisivo) pero en los que no hemos encontrado mutaciones en los genes SMCHD1 y DNMT3B.

5.2. Pacientes sin DFEH: Otros síndromes (Diagnóstico diferencial)

Como se ha comentado en la introducción existen otros síndromes que pueden compartir semejanzas clínicas con la DFEH.

En algunos casos estudiados y con resultados negativos para la DFEH1 y 2, hemos sabido a posteriori por comunicación del clínico responsable que 4 casos se debían a mutaciones en el gen CAPN3 (distrofia de cinturas LGMDR1, calpaínas), un caso de miopatía central core, un caso de distrofia miotónica, un caso con mutaciones en el gen ANO5 (distrofia de cinturas LGMD2L).

Debido a los rasgos clínicos que comparte la DFEH con algunos síndromes escapulo-peroneales, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto el estudio de dos genes, VCP (*Valosin-containing protein*) y FHL1 (*Four-and-a-Half-LIM Protein 1*). Mutaciones en dichos genes dan lugar al síndrome IBMPFD (*Hereditary inclusion body myopathy (IBM) associated with Paget's disease of bone (PDB) and frontotemporal dementia (FTD)*) y a una miopatía escapulo-peroneal dominante ligada al # X, respectivamente.

5.2.1. Gen VCP

Se han secuenciado los 17 exones del gen VCP en 166 muestras cuya procedencia es la siguiente:

PAIS	COMUNIDAD AUTÓNOMA	MUESTRAS RECIBIDAS
ESPAÑA		140
	ANDALUCÍA	19
	ARAGÓN	4
	ISLAS BALEARES	2
	CASTILLA LA MANCHA	8
	CASTILLA Y LEÓN	3
	CATALUÑA	27
	EXTREMADURA	4
	LA RIOJA	1
	COMUNIDAD DE MADRID	32
	MURCIA	3
	NAVARRA	2
	PAIS VASCO	35
SUIZA		3
FRANCIA		10
HOLANDA		13
	TOTAL	166

Tabla 35. Procedencia de las muestras estudiadas para VCP a nivel nacional e internacional.

Las 25 muestras de Suiza, Francia y Holanda pertenecen a trabajos colaborativos con la finalidad de encontrar mutaciones en estos pacientes que tenían un fuerte componente

miopático entre sus características clínicas, y 6 muestras se recibieron expresamente para realizar la secuenciación del gen VCP. El resto (135 muestras), fueron seleccionadas de los 2149 individuos negativos para DFEH1 de nuestra serie por tener un fenotipo compatible con un perfil miopático debido a mutaciones en VCP.

Los resultados obtenidos los resumimos en la tabla 39 (**ANEXO 7**).

De estos 166 casos estudiados, 28 fueron positivos para mutaciones en el gen VCP (16.8%). De estos resultados han derivado tres publicaciones, una a nivel nacional - mutación c.383G>T p.(Gly128Val) en el exón 4 del gen - y dos a nivel internacional (con un grupo francés – mutación c.469G>C p.(Gly157Arg) en el exón 5 - y con un grupo suizo – mutación c.616A>T p.(Ile1206Phe)- en el exón 6) debido a que las mutaciones encontradas no estaban aún descritas (ver publicaciones derivadas de esta tesis – referencias 4, 8, 12-) (marcadas en negrita en la tabla 39 del Anexo 7).

5.2.2. **FHL1**

Durante una estancia en Nueva York en la Columbia University Medical Center en el año 2001, pudimos estudiar una gran familia con síndrome escápulo-peroneal en la que previamente se había establecido ligamiento con el # 12 (Wilhelmsen, K.C y cols., 1996). Sin embargo 10 individuos que no estaban afectados compartían el haplotipo del # 12 con individuos afectados sugiriendo penetrancia incompleta, o doble recombinación en esos individuos no afectados, o un falso ligamiento positivo. Por lo tanto, se realizó un estudio de genoma completo con marcadores microsatélite para identificar un nuevo locus de la enfermedad (en esta ocasión se incluyeron marcadores del # sexual ya que el árbol familiar podía sugerir un ligamiento con el # X). Como resultado se obtuvo ligamiento con el # X y se secuenciaron varios genes candidatos, entre ellos FHL1 encontrándose un cambio (G a C), en el nt 365 del exón 3, cambio de triptófano a serina en la posición 122, W122S (Quinzii C y cols., 2008) (Referencia 2 del anexo de artículos derivados de esta tesis) que segregaba perfectamente con los miembros afectados de la familia y que no portaban individuos sanos.

Posteriormente, secuenciamos los 7 exones del gen FHL1 en 18 pacientes de nuestra serie que después de haber sido negativos para DFEH1 y que tras reevaluar la clínica podrían ser sugestivos de tener mutaciones en este gen, pero los resultados fueron negativos.

DISCUSIÓN

El objetivo de esta discusión es destilar las principales enseñanzas que son fruto de un trabajo continuado realizado a lo largo de 20 años en relación al diagnóstico molecular de la tercera enfermedad neuromuscular más común en el adulto, la DFEH. El valor fundamental de los mismos se basa en las características de una muestra que se puede considerar representativa de la población española, pues a lo largo de ese período nuestro laboratorio ha sido el único que realiza esta determinación para la práctica totalidad de hospitales públicos y privados españoles.

La DFEH es una enfermedad compleja tanto a nivel molecular como epigenético que a lo largo de estos años me ha ido sorprendiendo y maravillando por esa misma complejidad, que como mi director de tesis expone muy bien, se asemeja a las “matrioshkas”, las tradicionales muñecas rusas en las que abres una y te encuentras otra en su interior. Las matrioshkas de la DFEH se han ido acumulando y aún a la hora de cerrar esta tesis no estoy segura de que conozcamos todos los entresijos moleculares que determinan los aspectos clínicos de la enfermedad y si no existe aún una última sorpresa encerrada en la última muñeca.

1. *Correlación fenotipo-genotipo*

1.1. *Correlación clínico-molecular*

Al analizar los resultados obtenidos sobre el tamaño del fragmento en los pacientes con clínica clara de DFEH hemos podido establecer con mayor nitidez los límites de normalidad/patogenicidad del tamaño del fragmento, estrechando lo que se conocía en la literatura como zona gris o zona de incertidumbre gracias a la combinación de los datos genómicos y epigenéticos. Como ya se ha comentado en la presentación de los resultados en la literatura existe un consenso bastante extendido de considerar DFEH con un fragmento menor de 38 kb o 10 repeticiones (Wijmenga C y cols., 1992; van Deutekom JC y cols., 1993), aunque existen otros grupos que el límite lo sitúan en 34-35 kb o 8-9 repeticiones (van Deutekom JC y cols., 1996).

En este trabajo, en base a la correlación con la observación clínica hemos llegado a establecer como DFEH indubitada a aquellos casos con un fragmento por debajo de 34 kb (8 repeticiones), reduciendo al rango de 34-38 kb (ambos inclusive) los casos dudosos (ya que existe población control con fragmentos dentro de este rango). De acuerdo a este clasificador podemos asegurar que los casos con fragmentos por encima de 38 kb no tienen DFEH1.

En la zona dudosa (zona gris) podemos encontrar en nuestra serie casos que no muestran clínica de DFEH y casos que sí, lo que sugiere que es precisamente en estos casos donde debemos poner el acento para encontrar los factores extragenómicos que determinan la emergencia de los rasgos fenotípicos de DFEH. Estos casos sintomáticos pueden corresponder a DFEH1 o a la suma de DFEH1+DFEH2.

Corroborando trabajos anteriores (Padberg GW y cols., 1995; Upadhyaya M y cols., 1995), podemos confirmar que los pacientes *de novo* (sin afectación clínica aparente en progenitores pasados los 30 años ni otros casos en la familia cercana) presentan un menor tamaño de fragmento que los pacientes familiares y que en parte por esta circunstancia, son clínicamente más graves. Casi la mitad de las nuevas mutaciones en la DFEH ocurren en los primeros pasos de replicación después de la fertilización, resultando en casos de mosaicismo somático presente en los progenitores de estos casos graves. Lemmers RJ y cols., (2004) estudiaron el mecanismo en 11 casos mosaico y detectaron un fragmento contraído en el rango patológico con una mezcla del alelo ancestral que no cambiaba de tamaño, lo que sugería que este reordenamiento ocurría preferentemente mediante una conversión de genes mitóticos sin sobrecruzamiento. Se especula que los cambios conformacionales de la cromatina en los primeros pasos de la división celular pueden dar lugar a esas roturas en la cadena de ADN que inician esos reordenamientos mitóticos en D4Z4. Siendo estos casos en nuestra serie mucho menos (0.75%) que los estimados en la literatura (10-30%) (Lunt PW y cols., 1995; Padberg GW y cols., 1995), podemos colegir que este fenómeno es relativamente raro sin que por el momento podamos establecer factores favorecedores de su aparición.

1.2. Características demográficas de nuestra serie

La distribución del fragmento *EcoRI* en el rango ≤ 38 kb muestra que la mayoría de los pacientes se encuentra en el rango entre las 22kb-27kb (35.3%), y luego la proporción es parecida en los rangos entre las 18kb-21kb (21.3%) y entre las 28kb-33kb (22.1%). Teniendo en cuenta que nuestra serie es mayoritariamente clínica (77.5%) (pacientes sintomáticos derivados para diagnóstico) (frente al 22.5% pacientes asintomáticos enviados para diagnóstico de portadores), estos son los rangos esperables en los casos detectados en la clínica.

1.3. Edad de inicio y casos de novo

La edad de inicio es significativamente menor en los casos *de novo* (19.85 años) frente a los casos familiares (25 años), y además hemos corroborado que existe la relación lineal entre el tamaño del fragmento y la edad de inicio detectada en trabajos previos, aunque con un porcentaje de variabilidad interindividual que impide usar este dato para hacer predicciones individuales o prenatales. Llamativamente, en los casos *de novo* esta linealidad se pierde en los casos con tamaños de fragmento mayores de 24 kb (5 repeticiones). Aunque es un dato que hay que tomar con cautela debido a la extrema variabilidad en los datos (como se observa en el incremento del intervalo de confianza (Figura 43), en varias de las comparaciones se observan diferencias en las tendencias entre pacientes en relación a este punto de corte (ver punto 1.5.).

Otro dato interesante a resaltar de nuestro estudio es que no parece existir relación entre la edad de inicio y el sexo del paciente.

1.4. Origen del fragmento patológico

Hemos analizado en los casos en los que teníamos acceso a esa información (n=656), de qué progenitor procedía el fragmento heredado, encontrando un mayor porcentaje de casos en los que el fragmento heredado provenía por vía materna (57.8%). Aunque esta diferencia no es significativa, la tendencia apuntada merecería ser tenida en cuenta en estudios centrados en esta cuestión por si existe algún tipo de impronta respecto a la expresión clínica de la enfermedad asumiendo una herencia estrictamente mendeliana.

1.5. Gravedad de los síntomas

En la escala de GMW que mide la gravedad de los síntomas y el tamaño de fragmento, existe una relación lineal que pierde su linealidad cuando el tamaño del fragmento es mayor de 24 kb. En relación a la sintomatología extramuscular en un trabajo realizado en colaboración con la Dra. Sistiaga (Referencia 3 del anexo de artículos publicados derivados de esta tesis) establecíamos una clara relación entre el coeficiente intelectual de los pacientes analizados y el tamaño del fragmento, estableciendo nuevamente el punto de corte en 24 kb, reforzando la idea de que la frontera de 24 kb puede servirnos para diferenciar dos grupos de pacientes. En nuestra serie, el 48.4% de los pacientes DFEH1 se encuentran en el grupo de

tamaño menor o igual que 24 Kb (n=972). Creemos que este punto de corte debería analizarse desde otros puntos de vista para establecer por ejemplo si la sobreexpresión de DUX4 se relaciona con este punto de corte o con otras variables epigenéticas de la enfermedad.

1.6. Anticipación

En las familias en las que hemos podido analizar esta cuestión por existir varias generaciones afectadas podemos afirmar que existe un fenómeno de anticipación definido como un adelanto de la edad de inicio en la generación siguiente. Este es un fenómeno descrito en otras enfermedades neurológicas debidas a inestabilidad del ADN como la distrofia miotónica tipo 1 o la corea de Huntington que aparece vinculado a mecanismos epigenéticos (Pratte A y cols., 2015; Neto JL y cols., 2017). En estos estudios hay que tener en cuenta que en la segunda, y sobre todo en la tercera generación la edad de inicio más temprana en realidad puede deberse a un diagnóstico más temprano (sesgo de selección de casos por conocimiento previo de la enfermedad en las familias que hará que esas familias acudan antes al neurólogo ante los primeros síntomas y que éste llegue a un diagnóstico con más facilidad).

No obstante, la cuestión queda pendiente de resolver en una serie con más datos clínicos más completos y cuando comprendamos mejor los mecanismos de expresión fenotípica de la DFEH.

1.7. Síntomas de inicio

En el área de resultados se describe con detalle la distribución de los síntomas de inicio recopilados de aquellos casos en los que se ha aportado información clínica, siendo el síntoma de inicio más frecuente (en más de un 30% de los casos) la debilidad en los miembros superiores seguido por la debilidad en los miembros inferiores (aproximadamente un 13 %) y de la debilidad escapular y facial (11%).

Aunque parecen existir diferencias en la aparición del primer síntoma entre los casos con DFEH1 y DFEH2, el tamaño de nuestra serie de DFEH2 es demasiado pequeño para establecer conclusiones y esa tendencia debería ser confirmada en series clínicas más grandes o con un metaanálisis de series.

2. Problemas técnicos en el diagnóstico molecular de la DFEH

2.1. Necesidad de Información clínica

A lo largo del período de recogida y análisis de los datos de nuestra cohorte (más de 20 años) se han producido variaciones en la aproximación al diagnóstico molecular de la DFEH derivadas tanto de mejoras en la tecnología como de los nuevos conocimientos generados. En este sentido y en relación a lo primero, la complejidad de la patología molecular ligada a la DFEH1 (translocaciones, casos con mosaicismo, fragmentos en el rango patológico que no producen DFEH, casos de delección de la región de la sonda, casos con un fragmento *EcoRI* en la zona gris, casos *de novo*, etc) ha obligado a incorporar las nuevas técnicas a medida que se iban descubriendo casos con peculiaridades que escapaban a los métodos de rastreo usados hasta entonces. Con este proceso de mejora continuo hemos podido discriminar mejor a los distintos grupos de pacientes. La escasa información clínica derivada de un origen de los pacientes muy diverso (más de 175 hospitales y centros diferentes) ha sido uno de los mayores problemas a los que nos hemos enfrentado en el día a día para poder establecer con nitidez las correlaciones entre estas peculiaridades genéticas y la expresión clínica. Esta limitación, el no contar con información clínica completa que permita orientar el diagnóstico molecular hacia los estudios complementarios correctos en cada caso, es una de las principales limitaciones de nuestro trabajo y que refuerza la idea de que es necesaria una estrecha colaboración con los clínicos para poder establecer el valor de los hallazgos moleculares y sobre todo para dotarlos de capacidad predictiva dentro de la teoría integrada sobre la enfermedad (Lemmers RJ y cols., 2010).

A este respecto, nos llama la atención que en las muestras estudiadas constatamos un promedio de acierto del 48.4% en el caso de la DFEH1, si incluimos también a los pacientes que tienen unos tamaños de fragmento en la franja gris (34kb-38kb). Si contamos de forma más estricta e incluimos a los pacientes con menos de 34 kb, el promedio baja a un 42.2%. Esto demuestra que la caracterización clínica de la enfermedad no lleva en muchos casos a un diagnóstico de presunción fundado y que posiblemente muchos estudios se han ordenado sin claros criterios clínicos. Resulta también curioso que este porcentaje se ha mantenido bastante estable a lo largo de los años, lo que ilustra una cierta dificultad del sistema sanitario para generalizar el conocimiento básico sobre la enfermedad, aspecto que se podría paliar con las unidades de referencia.

2.2. *Del revelado manual al escaneado*

En relación a los problemas técnicos vamos a ir enumerando los distintos problemas técnicos que nos hemos encontrado en el diagnóstico de la enfermedad y las herramientas que hemos ido utilizando para solventarlos, así como las mejoras en protocolos y técnicas de detección del fragmento o reordenamientos patológicos.

El tamaño de los fragmentos obtenidos en el análisis mediante LGE no es ni uniforme ni continuo. Esto se debe a que los fragmentos de menor tamaño se separan con una mejor resolución en el gel mediante electroforesis horizontal estándar (los tamaños menores a 30 kb), y a medida que nos acercamos al límite patológicos la resolución es menor, ya que la técnica no permite visualizar de forma tan nítida los fragmentos. Además, en los primeros años utilizábamos un marcador de peso molecular no comercial, que era una mezcla de ADNs de distintos pacientes con DFEH de los cuales se conocían los tamaños de los fragmentos. Por este motivo hay algunas muestras con tamaños de 19 kb, 24 kb, 26 kb, 29 kb, 31 kb y 33 kb. Posteriormente, empezamos a utilizar un marcador de peso molecular comercial (Material y Métodos, punto 3.4.2) y se han ido ajustando los tamaños del fragmento a los del marcador molecular comercial, por tanto, la ausencia de determinados tamaños de fragmentos no es un hecho biológico, es una consecuencia del cambio de la técnica a lo largo de los años. Actualmente se prefiere definir los casos por el número de repeticiones.

En los primeros años, el revelado de las membranas y la visualización de las bandas se hacía de manera manual, con relevado en placa fotográfica lo que conllevaba unos tiempos de espera hasta poder revelar la primera placa fotográfica de entre 5 y 7 días y la necesidad de un congelador de -80°C.

La incorporación de una mejora técnica como es el escáner Typhoon Trio (GE Healthcare) mejoró considerablemente este paso aportando las siguientes ventajas:

- El tiempo de exposición es aproximadamente una décima parte de la de la autorradiografía tradicional usando placa fotográfica.
- La sensibilidad es de 10 a 100 veces mayor.
- El rango dinámico lineal es de 1 a 100.000 (5 órdenes de magnitud). Las placas fotográficas tienen un rango dinámico lineal sólo de 1 a 500 (2,5 órdenes de magnitud). El rango dinámico lineal de la pantalla de almacenamiento de fósforo permite visualizar señales fuertes y débiles y cuantificar en una única exposición, lo cual elimina la necesidad de múltiples exposiciones.
- Las pantallas de almacenamiento de fósforo son reutilizables.

- Las pantallas de almacenamiento de fósforo se colocan sobre las membranas con luz y la exposición tiene lugar a tª ambiente.
- No se necesitan tratamientos químicos adicionales, cuarto oscuro o tratamiento especial.
- Los resultados están en formato digital y pueden ser analizados cualitativa y cuantitativamente utilizando ImageQuant.

2.3. La importancia de las digestiones

Como hemos visto hasta ahora, la DFEH está asociada a deleciones parciales del grupo polimórfico de repeticiones D4Z4 en 4q35. Esta deleción se visualiza mediante hibridación con la sonda p13E-11 del ADN digerido con *EcoRI*.

El uso de la doble digestión *EcoRI/BlnI* dió lugar a un avance en el diagnóstico molecular en la DFEH ya que los fragmentos específicos del # 10q26 son eliminados por la digestión de *BlnI* (Bakker E y cols., 1996; Upadhyaya M y cols., 1997). Posteriormente se vió que con el enzima de restricción *XapI* se digerían diferencialmente las repeticiones del # 4q35, aumentando la fiabilidad del diagnóstico molecular para la DFEH a un 98% (Lemmers RJ y cols., 2001).

Repeticiones D4Z4	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI/BlnI</i>	<i>XapI</i>	<i>HindIII</i>
	Sonda: p13E-11			Sonda: 4qA o D4Z4
Visualización de fragmentos de los alelos 4q y 10q	X			
Visualización de fragmentos de los alelos del # 4 - <i>BlnI</i> resistentes- (digiere los fragmentos del # 10)		X		
Visualización de fragmentos de los alelos del # 10 - <i>BlnI</i> sensibles- (digiere los fragmentos del # 4)			X	
Visualización de deleciones de la región de la sonda p13E-11				X

Tabla 36. Función de las distintas digestiones en el diagnóstico molecular de la DFEH.

Como resultado, la hibridación mediante Southern blot del ADN genómico digerido con *EcoRI*, *EcoRI/BlnI* y *XapI* y la electroforesis horizontal estándar (LGE) es la herramienta que se

usa actualmente en el diagnóstico molecular de la DFEH, ya que los fragmentos específicos del # 10q26 y del # 4q35 son eliminados por la digestión de *BlnI* y *XapI* respectivamente. A partir de su publicación en 2001, nosotros incluimos el enzima *XapI* en la rutina del diagnóstico y en vez de realizar dos digestiones por paciente pasamos a realizar la triple digestión.

Aunque la especificidad y sensibilidad de esta técnica de doble o triple digestión para mejorar el diagnóstico de la DFEH se ha asegurado y demostrado como alta (Lunt PW 1998), hay una complicación adicional para el diagnóstico debido a los intercambios subteloméricos de los cromosomas entre los dos loci homólogos 4q35 y 10q26 con repeticiones D4Z4, los cuales están presentes en el 20% de la población normal (Lemmers RJ y cols., 1998; Matsumura T y cols., 2002; van Deutekom JCT y cols., 1996).

Hace muchos años que se sugirió que la sonda p13E-11 detecta los fragmentos *EcoRI* en el rango de 10-35 kb con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100% en el rango de las 34 kb. Se ha publicado cierto solapamiento con controles normales en el tamaño de fragmentos *EcoRI* mayores de 35 kb (Butz M y cols., 2003) e incluso se describieron fragmentos menores de 35 kb en algunos controles normales (van Deutekom JCT y cols., 1996). Por ello, en la literatura más clásica sobre la patología molecular de la DFEH algunos autores consideran el límite del rango patológico las 35 kb y otros las 38 kb. En esta zona gris, el resultado molecular debía ser analizado conjuntamente con una información clínica detallada del caso en cuestión para poder confirmar una DFEH con un tamaño del fragmento *EcoRI* en el límite patológico en que los rasgos clínicos suelen pasar incluso desapercibidos. En ese sentido en nuestro trabajo hemos podido observar algunos fallos de interpretación, como es el caso de considerar un caso de DFEH1 en zona gris a un caso clínico con una afectación clínica muy clara (que sería muy poco probable en ese rango de patología si fuese una DFEH1) y que realmente correspondía a un caso de DFEH2. Este hecho sugiere la conveniencia de verificar todos los diagnósticos de DFEH1 con fragmentos en la zona gris, realizados antes del descubrimiento de la DFEH2 y de la generalización de los estudios de metilación, mediante el estudio de los genes SMCHD1, DNMT3B y LRIF1.

2.4. ADN embebido en bloques de agarosa frente a ADN líquido

La limitación que tenemos al realizar la PFGE es que podemos no visualizar alguno de los alelos que porte un fragmento *EcoRI* de alto peso molecular debido a la fragmentación del ADN líquido durante la extracción. Para evitar una mayor fragmentación del ADN, hemos realizado, e instado a realizar la extracción a los centros remitentes de muestras, de forma

manual lo que permite conservar su integridad. El rendimiento mediante extracción automática es muchísimo menor y además no se consigue tanta cantidad de ADN ni tan concentrado como con el método manual. Estos dos puntos son muy importantes para asegurarnos el resultado del diagnóstico. Lo ideal para la PFGE es utilizar ADN embebido en bloques de agarosa ya que se preservan mucho mejor los fragmentos de alto peso molecular y con ello se asegura poder visualizar los cuatro alelos. En nuestros resultados, a veces no visualizábamos algún alelo de tamaño muy alto por este motivo, pero la realización de bloques de agarosa es muy laboriosa y no es coste-efectiva para realizarlo en el diagnóstico de rutina en muchos laboratorios asistenciales.

2.5. Deleción de la sonda (Falsos negativos)

Hace unos años que se sabía que en unos pocos pacientes, tanto casos esporádicos como familiares, el fragmento corto *EcoRI* característico derivado de 4q35 no se puede visualizar mediante el diagnóstico de rutina (Upadhyaya M y cols., 1997). Una explicación para estos casos era la presencia de otras mutaciones no ligadas al locus de la DFEH en 4q35. En algunos casos, sin embargo, la aparente ausencia de este fragmento característico puede ser debido a la ausencia de la región genómica proximal al grupo de repeticiones D4Z4 que engloba a la sonda p13E-11 (locus D4F104S1) (Lemmers RJ y cols., 1998). La presencia de este tipo de deleciones causadas de forma independiente a la DFEH1, estaría facilitando la aparición de falsos negativos en el diagnóstico, ya que no se detectan con la electroforesis convencional y no aparecen asociados a un fenotipo clínico especial (Lemmers RJ y cols., 2003). La frecuencia de estas deleciones a nivel proximal de D4Z4 en pacientes con DFEH no se conoce actualmente con exactitud, principalmente debido a las dificultades prácticas inherentes a la valoración de su presencia en la puesta a punto del diagnóstico de rutina, aunque según datos de diferentes grupos se podría estimar que esto sucede en aproximadamente un 3% de los casos (Lemmers RJ y cols., 2012). Se comprobó que la extensión de las deleciones era diferente en algunos casos estudiados, sugiriendo que habían ocurrido por medio de diferentes mecanismos moleculares. En conclusión, es importante usar análisis adicionales para confirmar la DFEH en ausencia del fragmento delecionado. En nuestra serie de pacientes no hemos encontrado casos de deleción de la sonda.

En los casos en que según la clínica el paciente es una DFEH y mediante la LGE el resultado es negativo, se debería hacer PFGE para tener toda la información de los alelos y descartar una posible deleción de la región de la sonda p13E-11. En estos casos con sospecha

de delección de la región de la sonda, se realiza otra digestión aparte con el enzima *HindIII* y la hibridación con la sonda 4qA permitirá visualizar el fragmento delecionado en el rango patológico. Para la detección de dichas delecciones también se puede utilizar otra sonda llamada D4Z4 que hibrida directamente dentro de las repeticiones en cuya puesta a punto colaboramos con el grupo de la Dr. Melanie Ehrlich en el año 2007 (Referencia 1 del anexo de publicaciones derivadas de esta tesis).

2.6. Permisividad

En el año 2007 se publicaron los haplotipos SSLPs y tras ponerlos a punto en nuestro laboratorio, pudimos incorporar su estudio al diagnóstico molecular de la DFEH. Sin embargo, hoy sabemos que el análisis del haplotipo SSLP no es tan sencillo como se creía y aquí se esbozan algunas consideraciones que cualquier laboratorio diagnóstico molecular de la enfermedad debería tener en cuenta:

- Cuando analizamos los picos de los tamaños de los SSLPs para los dos alelos del # 4 y los dos alelos del # 10, los tamaños van a ser 3 pb más cortos que el fragmento de PCR, esto se debe a un artefacto de la carrera.
- Las alturas de los picos de los distintos SSLPs no aparecen con la misma altura en el resultado de la carrera, hay picos más altos que otros (por ejemplo 164>166>161>168>163>176,180).
- Además, los patrones de los picos son diferentes. Algunos picos aparecen como un pico desdoblado en dos antes de la base del pico y otros después de la base del pico.
- En el artículo citado (Lemmers RJ y cols., AJHG 2007) se muestran los haplotipos encontrados en individuos con una configuración alélica estándar, pero en un artículo posterior (Lemmers RJ y cols., 2010) se muestran todos los haplotipos encontrados en la población europea. Además, se han detectado otros tamaños (>170 bp). Nosotros en nuestra serie hemos encontrado tamaños de picos infrecuentes, como 153, 156 y 157, y también hemos encontrado picos de 170 de tamaño y de tamaños mayores (172 y 174) (punto 3.2 de resultados).
- Cuando se dan translocaciones homogéneas del grupo entero de repeticiones tanto del # 4 al # 10 o viceversa, en estos alelos inusuales se han observado otros tamaños del haplotipo SSLP (161 [10B161T], 176 [10A176T] and 180 [10A180T]). En nuestra serie de pacientes el más frecuente es el reordenamiento de un grupo de repeticiones del # 4 al # 10 (trisómico) que se observa en el 16.53% de los individuos.

- A veces, diferentes combinaciones de haplotipos dan el mismo patrón SSLP (pero en estos casos, uno de los dos es más probable). Podemos dar algunos ejemplos:

Con los resultados para el SSLP de: 161, 161, 166, 166 podemos tener 2 combinaciones, aunque la primera es la más probable:

Alelo 4(1)	Alelo 4(2)	Alelo 10(1)	Alelo 10(2)	Incidencia
4qA161	4qA161	10qA166	10qA166	11.2%
4qA161	4qA166H	10qA166	10qB161T	0.1%

Con un resultado para el SSLP de: 161, 163, 166, 166

Alelo 4(1)	Alelo 4(2)	Alelo 10(1)	Alelo 10(2)	Incidencia
4qA161	4qB163	10qA166	10qA166	9.5%
4qB163	4qA166H	10qA166	10qB161T	<0.1%

Con un resultado para el SSLP de: 161, 168, 166, 166

Alelo 4(1)	Alelo 4(2)	Alelo 10(1)	Alelo 10(2)	Incidencia
4qA161	4qB168	10qA166	10qA166	3.8%
4qA166H	4qB168	10qA166	10qB161T	<0.1%

Con un resultado para el SSLP de: 161, 161, 164, 166

Alelo 4(1)	Alelo 4(2)	Alelo 10(1)	Alelo 10(2)	Incidencia
4qA161	4qA161	10qA164	10qA166	0.6%
4qA161	4qA166H	10qA164	10qB161T	<0.1%

No se puede realizar un genotipado o un diagnóstico de DFEH1 fiable basándonos solo en el resultado del SSLP. Al considerarse todos los haplotipos que podemos encontrar, algunos ocurren con más frecuencias en 4q (como 161) y en 10q (166). Por tanto, hay que combinar los datos del SSLP con los datos obtenidos mediante PFGE con los tamaños de todos los fragmentos (los dos del # 4 y los dos del # 10) y los datos obtenidos de los fragmentos con la hibridación de las sondas 4qA/4qB. El SSLP nos puede servir de mucha utilidad a la hora de detectar alelos translocados ya que tienen tamaños específicos.

En nuestra muestra hemos podido analizar el SSLP en 788 individuos, 368 de individuos con tamaños el rango >38 kb y 420 de individuos con fragmentos en el rango patológico. Las combinaciones más prevalentes en el rango <38 kb son:

	DFEH1	
	Haplotipo	%
# 4	A161A161	30.23
	A161B163	27.13
# 10	A166A166	53.72
	A166B161T	12.4
Ambos	A161A161/A166A166	22.22
	A161B163/A166A166	15.74

Tabla 37. Combinaciones más prevalentes de la variante A y del haplotipo SSLP en los pacientes DFEH1.

Los resultados de nuestra serie de pacientes apoyan los datos de prevalencia de los haplotipos previamente publicados con las combinaciones más frecuentes para los alelos del # 4 en población holandesa (Lemmers RJ y cols., 2010). Esto no quiere decir que en otras poblaciones se puedan encontrar distribuciones diferentes, por lo que es muy importante conocer la variabilidad genética de nuestra propia población antes de dar por válidas estas proporciones.

2.7. Fragmentos híbridos y casos de mosaicismo

La complejidad diagnóstica de la DFEH se incrementó por la observación de que esos intercambios subteloméricos pueden también resultar en la formación de grupos híbridos, conteniendo una mezcla de repeticiones D4Z4 derivadas de 4q35 y 10q26 (van der Maarel SM y cols., 1999). Ya se señaló hace años que los intercambios subteloméricos pueden dar problemas durante el diagnóstico molecular en el 5% de los casos (Bakker E y cols., 1996; van Deutekom JCT y cols., 1996). A pesar de que el tamaño del fragmento en el rango patológico se cuantifica mucho mejor mediante la LGE ya que la resolución es mayor en fragmentos menores de 38 kb, la técnica de PFGE es muy ventajosa para detectar tanto translocaciones subteloméricas como casos de mosaicismo. Según Lemmers RJ y cols. (2004), un 90% de casos de mosaicismo pasaron desapercibidos al utilizar LGE. Aunque con la LGE es más fácil detectar un mosaicismo somático en un progenitor no afecto o muy poco afecto de un paciente con DFEH de novo, si el porcentaje de células con el fragmento contraído supera el 60%, ese

mosaico puede pasar por un paciente no mosaico, porque la intensidad de la banda es muy similar.

Entre los 2009 individuos con fragmentos EcoRI <38 kb de nuestra serie, solamente se detectaron 15 casos de mosaicismo mediante LGE (0.75%). Pensamos que esta baja detección de mosaicos puede deberse a la técnica que utilizamos de rutina que es la electroforesis horizontal como ya comentó Lemmers y cols. en su publicación (2004).

Es importante subrayar que sólo están asociados con la DFEH1 grupos de repeticiones <38 kb en el # 4 (tanto si su origen deriva del # 4q35 o 10q26 o si son fragmentos híbridos) (Cacurri S y cols., 1998; Lemmers RJ y cols., 1998). Por lo tanto, hay que tener cuidado en los casos trisómicos (vamos a visualizar un fragmento del # 10 y tres fragmentos con apariencia de # 4 – aunque uno de ellos tiene su origen en el # 10 -), ya que si ese fragmento translocado del # 4 al # 10 tiene un tamaño < 38 kb no sería patológico ya que reside en el # 10, por lo que podríamos encontrarnos ante un falso positivo en el diagnóstico molecular. Y en los casos monosómicos (vamos a visualizar un fragmento del # 4 y tres fragmentos con apariencia de # 10 – aunque uno de ellos reside en el # 4 -). Si ese fragmento translocado del # 10 al # 4 tiene un tamaño < 38 kb sí sería patológico ya que el fragmento translocado reside en el # 4, por lo que podríamos encontrarnos con un falso negativo. En los pacientes estudiados mediante PFGE en nuestra serie no hemos encontrado ningún caso de monosomía.

Por este motivo en los casos que el patrón de bandas mediante LGE nos hace sospechar un fragmento híbrido o un caso mosaico, se debe realizar también la PFGE. La indicación de realizar pruebas complementarias depende totalmente de la información clínica que se posea del paciente.

La mayoría de nuestros pacientes son disómicos, portan 2 alelos del # 4 y 2 alelos del # 10 (76.5%) pero dentro de los reordenamientos subteloméricos que pueden darse, los que más abundan en nuestra población de pacientes (39.6%) son las trisomías (presentan 2 alelos del # 4, 1 alelo del # 10 y en el otro alelo del # 10 nos encontramos un grupo de repeticiones homogéneo del # 4, dando una apariencia de alelo de # 4 al digerirlo con las enzimas de restricción pero que en realidad su origen es # 10). Estos fragmentos reordenados del # 4 al # 10 aunque se encuentren en el rango patológico no son patológicos y pueden resultar en falsos positivos.

El siguiente reordenamiento más común (33.6%) es la presencia de fragmentos híbridos H1 en el # 4 (presenta 1 alelo del # 4, 2 alelos del # 10 y la composición del otro alelo del # 4 van a ser repeticiones translocadas del # 10 seguidas de repeticiones del # 4). Y en tercer lugar nos encontramos fragmentos híbridos H2 también en el # 4 (16.8%) en que sucede

lo contrario que los H1 (el fragmento híbrido va a estar compuesto por repeticiones del # 4 seguidas de repeticiones translocadas del # 10). Estos dos tipos de híbridos si tienen <38 kb, son patológicos, y en nuestros pacientes hemos encontrado 12 casos de híbridos patológicos, 9 del tipo H1 y 3 del tipo H2.

Nos ha sorprendido la gran similitud en las frecuencias de los reordenamientos subteloméricos entre nuestra serie de pacientes y la serie holandesa publicada (van Overveld PG y cols., 2000). Este dato podría sugerir una homogeneidad de la población de origen y debería cotejarse con estudios en otras poblaciones (asiática, africana, etc.).

2.8. Heterocigotos compuestos

Aunque la mayoría de pacientes con DFEH portan un solo alelo con la enfermedad de acuerdo con el patrón de herencia dominante, se debatía si la ausencia de pacientes con dos alelos deletados se debía a la rareza de la enfermedad o a la letalidad de esa constitución alélica. Se anticipó que, si la heterocigosidad para dos alelos que producen la enfermedad no es letal, tal constitución se debería encontrar en la población con DFEH y en 2003 describieron dos casos de pacientes no relacionados heterocigotos compuestos para los alelos que transmiten la enfermedad en ambos # 4q (Wohlgemuth M y cols., 2003). Normalmente el alelo de mayor tamaño suele ser variante 4qB y el de menor tamaño 4qA. En este trabajo se describe que 2 fragmentos en el rango patológico no tienen por qué dar una mayor clínica en el paciente ya que puede ocurrir un efecto de dosaje genético y la penetrancia de los alelos ser incompleta. En un estudio realizado en más de 1100 casos incluidos en el registro nacional italiano, encontraron un 2.7% de casos de heterocigotos compuestos con dos alelos D4Z4 contraídos, y el 0.5% de esos casos tenía un haplotipo permisivo 4qA en los dos alelos (Scianti I y cols., 2012).

Reforzando estas observaciones, en nuestros pacientes hemos detectado 11 casos de heterocigotos compuestos (0.55%) entre los 2009 pacientes con un tamaño de fragmento <38 kb, de los que el 0.35% tiene un haplotipo permisivo en los dos alelos del # 4 (7/2009).

También se ha descrito un caso de homocigosidad en un paciente que portaba dos fragmentos 4qA de 24 kb ligados a la DFEH con un fenotipo clásico y no más severo de lo que se podía esperar (Tonini MM y cols., 2004).

En el caso de las DFEH2 también se han descrito 3 familias en las cuales el caso índice era portador de dos variantes potencialmente patológicas en el gen SMCHD1. En la primera familia, ambas variantes se encontraban en *trans* (en alelos diferentes) y actuaban de forma

sinérgica sobre la hipometilación en D4Z4 y en la penetrancia de la enfermedad. En la segunda familia, las mutaciones se encontraban *en cis* afectando a la función de SMCHD1 (efecto aditivo) mientras que, en la tercera familia, una de las dos variantes (*en trans*) no afectaba la función. Para aclarar esto y en colaboración con el grupo holandés de la Dra. Marlinde van der Boogaard, aportamos a su publicación la tercera familia (Ref. 385) (Referencia 10 del anexo de artículos derivados de esta tesis) que nos permitió concluir que el hecho de tener dos mutaciones que afectan a la función del gen también es compatible con la vida.

Recientemente, se ha identificado una mutación en homocigosis en el exón 2 del gen LRIF1 (Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1) en un paciente con un fenotipo de DFEH (Hamanaka K y cols., 2020). Esta mutación está relacionada con la relajación de la cromatina en D4Z4, y la expresión de DUX4 y sus genes diana en los núcleos de los miocitos, que son los sellos moleculares y epigenéticos de la DFEH. Por lo tanto, hay que tener en cuenta al gen LRIF1 como modificador epigenético de la región D4Z4 y como tercer gen responsable de la DFEH2 idiopática (Hamanaka K y cols., 2020). En la actualidad hemos comenzado a revisar este gen en la muestra de casos que presentan un fenotipo típico de DFEH, a los que se descartó la DFEH1 en primer lugar y que cumpliendo los requisitos de permisividad e hipometilación han resultado negativos para mutaciones en SMCHD1 y DNMT3B (Hamanaka K y cols., 2020).

2.9. Portadores asintomáticos de fragmentos en el rango patológico

En nuestra serie de pacientes existe una relación inversa entre el tamaño de la repetición D4Z4 y la gravedad clínica y progresión de la DFEH, que podría explicar la reducida penetrancia de los fragmentos con un tamaño próximo a las 38 kb. Se han descrito portadores asintomáticos en aproximadamente el 30% de las familias con DFEH, pero se ha visto que algunas de ellas concentran más casos no penetrantes seguramente debido a otros factores epigenéticos (Tonini MMO y cols., 2004). También han observado que el 19% de los probandos con DFEH portan alelos de más de 8 repeticiones y sólo el 50% de los probandos porta un haplotipo permisivo 4qA161 asociado al fragmento delecionado (Sciotti I y cols., 2012; Ricci G y cols., 2013).

En nuestra serie hemos encontrado 79 individuos que permanecían asintomáticos a pesar de tener un fragmento en el rango patológico, la mayoría concentrados en tamaños entre las 22kb-33kb (50.63%) que son típicamente casos familiares. Esto nos está indicando que algunas familias también concentran portadores asintomáticos a pesar de tener el

haplotipo permisivo, apoyando los datos publicados por Tonini MMO y cols. en 2004. A pesar de encontrarnos 5 casos mosaico que al no tener el defecto genético en todas las células de su organismo si no en un determinado % de ellas, presentan una clínica mucho menor de la esperada, que puede incluso llegar a pasar desapercibida, nos llama la atención encontrar otros individuos con tamaños pequeños desde las 15 kb hasta 21 kb (16.46%), subrayando la gran heterogeneidad clínica que existe en esta enfermedad. En 2016 Nikolik A y cols. publicaron la existencia de individuos con 1-3 repeticiones (10-15 kb) que permanecían asintomáticos a pesar de tener un fragmento con haplotipo permisivo. En nuestra serie hemos encontrado un único individuo con estas características, siendo portador de un fragmento de 15 kb.

De los 79 individuos asintomáticos comentados en el párrafo anterior, 24 individuos (30.4%) se concentran en el rango de la zona gris. Seguramente entre estos casos habrá individuos que quizás no estén bien caracterizados clínicamente y a pesar de tener un fragmento del # 4 de este tamaño, no sean verdaderas DFEH1. Parte de estos individuos pertenecen a las 53 familias de nuestra serie con fragmentos en la zona gris (34-38 kb). En estas familias habrá individuos portadores del fragmento tanto sintomáticos como asintomáticos, pero no podemos dar una estimación de porcentajes porque no tenemos información clínica suficiente. Los casos sintomáticos de este grupo cuya clínica refuerce la sospecha de una DFEH típica y que no cuadre con una clínica de un fragmento próximo al límite patológico, serían tributarios de estudios complementarios (metilación, secuenciación de los genes responsables de la DFEH2) y en caso negativo, de un rastreo genómico mediante NGS para descartar otras posibilidades diagnósticas.

En todo caso, el solapamiento de individuos de población control portando fragmentos en el rango patológico (sobre todo en la zona gris) y de portadores asintomáticos dentro de familias con DFEH confirmada sugieren que no están descritos todos los factores que dan lugar a la DFEH y hay que hacer un estudio exhaustivo de las características de cada caso para determinar lo que es relevante para la expresión fenotípica.

Además, un 1% de los casos con fragmentos <38 kb, pueden explicarse por translocaciones homogéneas 4:10 en las cuales el grupo de repeticiones del # 4 reside en el # 10 y estos casos no son patológicos porque el origen del fragmento es el # 10 (posibles falsos positivos). Estos casos son difíciles de detectar, ya que el detectar un fragmento con apariencia del # 4 (como es el caso de este reordenamiento del # 4 en el # 10) en el rango patológico induce a pensar directamente que es un fragmento cuyo origen es # 4. Se ha debido de hacer PFGE y el haplotipo SSLP por algún motivo y observar un haplotipo típico de este

reordenamiento (pej. el 176) te plantea la posibilidad de estar ante un fragmento translocado. En nuestra serie, en un portador de un fragmento híbrido H1 de 22 kb en el que no podíamos discriminar si el origen del fragmento de 22 kb era el # 4 o el # 10. Para resolver este caso fue necesario realizar un estudio de segregación familiar mediante PFGE y con el haplotipo SSLP, llegamos a la conclusión de que el fragmento era del # 10 y por lo tanto no era patológico.

En otros casos, los fragmentos D4Z4 <38 kb encontrados en la población control podrían explicarse por una incorrecta interpretación del análisis del ADN por una comigración accidental de alelos del # 10 (diferencia de 6 kb entre las dos digestiones) y alelos híbridos del # 4 que coincidan con esa diferencia de 6 kb.

Cuando el diagnóstico molecular de un paciente con sospecha de DFEH revela un alelo en el rango patológico, se puede asumir que es un alelo patogénico tipo 4qA (Tawil R y cols., 2015). La DFEH no se ha asociado nunca con un alelo 4qB y se ha demostrado que estos alelos no son patogénicos (Lemmers RJ y cols., *Science* 2010). Nuestros datos corroboran esta regla.

Por ello, es importante realizar el tipaje de los alelos en individuos que portan alelos del # 4 en el rango patológico, pero sin síntomas de la enfermedad o con un fenotipo inusual para la DFEH. Seguramente estos alelos pertenezcan a alguno de los haplotipos no patológicos citados en el apartado 3.2 (resultados).

Por tanto, hemos podido ver hasta aquí que un número de factores han servido para complicar el diagnóstico molecular de la DFEH, pero que para la mayoría de ellos existen herramientas moleculares que nos ayudan a solventarlos:

- El alto grado de homología en la secuencia entre la región asociada a la DFEH en 4q35 y otras regiones cromosómicas (triple digestión del ADN).
- La complejidad dinámica de los intercambios intercromosómicos de 4q35 y 10q26 (translocaciones y fragmentos híbridos).
- Evidencia de heterogeneidad clínica en familias con DFEH.
- Un mecanismo complejo causante de la enfermedad (deleción de la región que reconoce la sonda p13E-11): unos pocos pacientes DFEH de familias ligadas a 4q35 no manifiestan un alelo D4F104S1 *EcoRI/BlnI* pequeño asociado a la enfermedad.
- La incidencia de mosaicismo somático y en la línea germinal.
- La asociación de la DFEH con la variante 4qA y a uno de los 4 haplotipos permisivos.
- La presencia concomitante de mutaciones en SMCHD1, DNMT3B y LRIF1.

2.10. Hacia el modelo unificado de explicación de la enfermedad

El año 2010 es una fecha importante para la DFEH porque fruto de la experiencia de cerca de 17 años de varios grupos incluido el nuestro, se publica en la revista *Science* un modelo unificador para explicar el mecanismo patogénico de la enfermedad. Se demuestra que contracciones en entornos cromosómicos permisivos son patogénicas ya que permiten que se exprese el gen DUX4 de la última de las repeticiones y esa ganancia de función es tóxica para el músculo. Para explorar si esos polimorfismos (4A161, 4A161L, 4A159, 4A168 y 4A166H) afectan la transcripción distal de DUX4 se transfectó la última unidad D4Z4 y la secuencia flanqueante pLAM de cromosomas permisivos y no permisivos en células C2C12, para evaluar la estabilidad de la transcripción distal de DUX4 mediante Northern. Como prueba de concepto, el artículo confirmó la robustez de la teoría en familias con cromosomas patogénicos complejos.

La familia estudiada por nosotros dentro de ese trabajo (Ref. F2) era portadora de un fragmento híbrido H1 que comenzaba por repeticiones del # 10 seguidas por repeticiones del # 4. Se necesitaban casos complejos a nivel molecular como éste para demostrar que la teoría funcionaba, esto es que en estos casos también se daba la expresión del gen DUX4 de la última repetición (Referencia 5 del anexo de publicaciones derivadas de esta tesis). También describimos en este trabajo una excepción a los cromosomas permisivos de variante A, que es la asociada al haplotipo 166 (4qA166) que es no permisivo.

En nuestra serie hemos tenido casos de pacientes confirmados para la DFEH1 con haplotipos permisivos bastante infrecuentes:

- Un individuo cuyo fragmento patológico es un fragmento híbrido H2 (que comienza por repeticiones del # 4 seguidas de repeticiones del # 10) de 30 kb, asociado a un haplotipo 4qA157.
- Un individuo con dos fragmentos por debajo de las 38 kb (heterocigoto compuesto) con los dos fragmentos permisivos, uno de ellos de 32 kb con un haplotipo muy infrecuente 4qA156 y otro de 36 kb con un haplotipo 4qA161.
- Dos familias con fragmentos *EcoRI* de 18 kb y de 22 kb asociados a un haplotipo 4qA163. La incidencia de la asociación de la variante A con el haplotipo 163 es del 0.9%. Lo más frecuente es que la variante B vaya asociada al haplotipo 163 (32.9%).

- Tres familias cuyos fragmentos patológicos son fragmentos híbridos H1 (que comienzan por repeticiones del # 10 seguidas de repeticiones del # 4) de 28 kb, 22 kb y 18 kb respectivamente, asociadas al haplotipo 4qA166H. El haplotipo 166 asociado a la variante A es la única excepción de no permisividad (el resto de haplotipos asociados a la variante A son permisivos) sin embargo en el caso de los fragmentos híbridos sí que es permisiva (en Lemmers RJ y cols., *Science* 2010). Si el fragmento no fuera híbrido y tuviera el haplotipo 166, no sería permisivo.

3. Diagnóstico prenatal. Consideraciones y limitaciones.

Un apartado importante dentro del estudio molecular de la enfermedad son aquellos casos que llegan en busca de asesoramiento genético de cara a un diagnóstico prenatal o preimplantacional.

El asesoramiento genético es el proceso de proporcionar a los individuos y las familias información sobre la naturaleza, la herencia y las implicaciones de los trastornos genéticos para ayudarlos a tomar decisiones médicas y personales informadas. La siguiente sección trata sobre la evaluación del riesgo genético y el uso de la historia familiar y las pruebas genéticas para aclarar el estado genético de los miembros de la familia en la DFEH.

Es vital conocer bien la historia familiar, incluyendo la información clínica completa: sexo, fecha de nacimiento, edad de inicio de los síntomas y cuáles fueron, progresión de la enfermedad y síntomas actuales y los antecedentes familiares. Si en una familia dada podemos establecer con nitidez que la transmisión sigue un patrón de herencia autosómica dominante, podemos establecer que el riesgo para la descendencia de un caso dado como DFEH1 es del 50%. Sin embargo, y dada la complejidad de los entresijos moleculares de la condición, hay que ser concienzudo en la caracterización molecular del caso y /o su familia y ser muy cauto en el consejo cuando los datos preliminares son escasos o ausentes.

En los casos prenatales hay que apoyarse en todo el arsenal de herramientas técnicas explicadas en el apartado de problemas en el diagnóstico para dar un resultado con la mayor fiabilidad posible. Para ello se realizará el diagnóstico con LGE, triple digestión y se apoyará el resultado con marcadores (ver **ANEXO 5**) y SSLP. En cualquier caso, lo realmente crítico en los casos prenatales es tener información exhaustiva de los progenitores, especialmente del afecto, y una muestra de ADN de alta calidad. Los requerimientos comentados en cuanto a calidad del ADN se vuelven críticos al abordar un diagnóstico prenatal. Debido a la gran heterogeneidad clínica incluso dentro de la misma familia es muy complicado hacer un

asesoramiento genético respecto a la expresión clínica ya que es imposible predecir si el descendiente presentará más o menos clínica que el progenitor afecto a pesar de tener el mismo fragmento patológico. Además, hemos observado que es bastante frecuente la concentración de casos asintomáticos dentro de una misma familia que según nuestros datos es más frecuente además en los tamaños en tamaños de fragmentos entre 22kb-33kb.

En relación a las cuestiones relacionadas con el asesoramiento genético podemos establecer las siguientes condiciones:

Pruebas de individuos en riesgo. Las pruebas genéticas moleculares para los familiares adultos en situación de riesgo asintomáticos son posibles, pero con carácter general se desaconseja la prueba de niños menores de 18 años en situación de riesgo no afectados porque no hay tratamiento disponible. En una familia con un diagnóstico establecido de DFEH, es posible considerar la realización de las pruebas de individuos sintomáticos independientemente de la edad.

Consideraciones en familias con una aparente variante patogénica *de novo*. Es probable que estemos ante un caso de novo cuando ninguno de los progenitores del probando porta el fragmento patológico ni posee evidencia clínica del trastorno.

Respecto al diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en la DFEH puede ser una opción para las familias en las que se ha identificado el fragmento patológico y en la que existen varios miembros afectados y sanos para poder determinar el haplotipo patológico asociado al # 4 en los individuos afectados de la familia. Existe un solo artículo que trata este tema (Barat-Houari y cols., 2010) que probó varios marcadores polimórficos en la región D4Z4 a una distancia considerable del fragmento (0.55-1.88 Mb) y aunque cumplían técnicamente los requisitos para el análisis en una única célula, el riesgo relativamente alto de recombinación que mostraron dificulta su aplicación al DGP, así como la ausencia de marcadores distales a las repeticiones.

En algunos centros se oferta esta opción, pero sabiendo e informando de sus limitaciones, que son:

- 1.- Tiene que ser un caso familiar puesto que necesitamos establecer el haplotipo a riesgo.
- 2.- Debido a la localización telomérica de la región responsable de la enfermedad, solo es posible analizar marcadores en uno de los lados y, por lo tanto, existe un riesgo de error de diagnóstico debido a una potencial recombinación, que lamentablemente no se puede controlar.

3.- Es importante contar con varios afectados puesto que, si solo se dispone de un padre y un hijo y hubiera ocurrido una recombinación en el hijo, el diagnóstico se realizará completamente al revés puesto que el haplotipo sería el contrario.

4.- La fiabilidad del DGP para esta enfermedad es inferior a la normal (en torno al 95%) debido a esta posibilidad de recombinación.

Debido al riesgo de recombinación y la ausencia de marcadores polimórficos distales flanqueantes, no se recomienda el DGP para DFEH1 (Lemmers RJ y cols., 2012).

4. El proceso diagnóstico

Aspectos técnicos

Aunque el diagnóstico molecular para la DFEH puede realizarse con un 98% de seguridad, todavía existe un margen de mejora ya que está basado en el uso del análisis por Southern blot. La mayoría de estudios genéticos basados en PCR y secuenciación se pueden resolver en 1-2 días mientras que para la DFEH se requieren 10-15 días para obtener un resultado. Para abordar estos retos han ido surgiendo en los últimos años nuevas aproximaciones técnicas que intentan dar solución a estos problemas.

En el caso de pacientes con clínica segura de DFEH y resultado negativo en LGE, y negativo en PFGE (mediante las digestiones de rutina y la posterior hibridación con la sonda 4qA para descartar deleciones), el siguiente paso sería sospechar que se trata de un caso de DFEH2. De acuerdo a Tawil R y cols. (2015), el estudio de la variante A/B no se incluye en el diagnóstico de rutina ya que los pacientes que van a llegar al laboratorio han sido enviados por tener una sospecha clara de DFEH. En estos casos que envían con fenotipo clínico de DFEH, realizar el estudio de si la contracción ocurre en un entorno genético permisivo (variante A) no parece que mejore la especificidad del diagnóstico. (Figura 56).

Hace unos años se comercializó una técnica denominada “molecular combing” que se empleaba para ver reordenamientos cromosómicos y se enfocó al diagnóstico molecular de la DFEH (Nguyen K y cols., 2011 y 2017). En esta técnica se extiende la molécula de ADN y gracias a la hibridación de sondas fluorescentes en moléculas de ADN individuales permite caracterizar las repeticiones D4Z4 y las secuencias de los haplotipos qA y qB localizadas en las regiones subteloméricas de los cromosomas 4 y 10. De momento su uso se restringe a pocos laboratorios, y la técnica preferente en el diagnóstico sigue siendo el Southern blot. Recientemente se ha descrito una técnica basada en el mapeo óptico de una sola molécula

(*single-molecule optical mapping*) que da una medida cuantitativa del número de repeticiones D4Z4 con la configuración alélica 4qA, pero todavía no se ha establecido en los laboratorios de diagnóstico (Dai Y y cols., 2020).

Otra mejora en el diagnóstico, a pesar de seguir utilizando el Southern blot, es utilizar un sistema de marcaje no radiactivo. En la reunión para llegar a un consenso de “buenas prácticas” en el diagnóstico de la DFEH que tuvo lugar en Leiden (Holanda) en 2010 la mayoría de laboratorios seguían utilizando la radiactividad porque la señal de la impresión de la banda era mejor que con el no radiactivo.

Los pacientes con DFEH1 son clínicamente indistinguibles de los pacientes con DFEH2 (Referencia 2 del anexo de publicaciones derivadas de esta tesis). Para determinar si es así, se debe realizar el análisis de metilación.

Metilación

La correlación entre la clínica y la metilación es controvertida en DFEH1. La investigación de la posible correlación del nivel de metilación con la gravedad de la enfermedad reveló que los varones predominaban en el grupo con un curso más grave de la enfermedad e hipometilación de la región de repeticiones D4Z4 (Balog J y cols., 2012). Sin embargo, en 2015 en una muestra de más de 500 pacientes, los niveles de metilación no diferían estadísticamente entre los dos sexos (Lemmers RJ y cols., 2015). Nosotros participamos en esta publicación con una familia de nuestra serie (Referencia 9 del anexo de publicaciones derivadas de esta tesis). En este trabajo se correlacionaba el tamaño de fragmento con el nivel de metilación tanto en DFEH1 como DFEH2. Se observó que además del tamaño del fragmento en estos pacientes también influyó el tipo de mutación (las que tienen un efecto dominante son más deletéreas que las que causan haploinsuficiencia). En este trabajo se postulaba un factor denominado valor delta, que es la diferencia entre la metilación observada (por el método tradicional) y la metilación predicha según el tamaño de los cuatro alelos, los dos del # 4 y los dos del # 10. Si este valor se acerca al 0%, esperamos que este individuo no tenga mutación en SMCHD1. Los pacientes con DFEH2 tienen un valor para Delta1 <-22% sugiriendo una fuerte contribución de la mutación en SMCHD1 a la hipometilación en D4Z4. Al igual que pasa en controles, en los pacientes con DFEH1 este factor Delta1 es próximo a 0 ya que en los DFEH1 solamente el alelo contraído del # 4 participa en la reducción de metilación. La única excepción son los pacientes con tamaños entre las 28kb-38kb (7-10 repeticiones) entre los que se encuentra una gran variabilidad clínica que tienen un Delta1

menor del esperado por el tamaño de los 4 alelos (-7.6) señalando de que existe otros factores que participan en la reducción de la metilación. Sin embargo, los familiares asintomáticos de estos individuos, también portadores de estos fragmentos entre 28kb-38kb tenían un valor de Delta 1 similar a los controles, próximo a 0. Esto sugiere que, en este rango de 7-10 repeticiones, los pacientes con clínica son más susceptibles a la presentación de la enfermedad que sus familiares portadores asintomáticos. Por ello calcular este valor Delta1 es un dato predictivo muy importante, pero para ello debemos contar con el tamaño de los dos fragmentos del # 4 y de los dos del # 10.

En el estudio de metilación que hemos realizado en 525 individuos, hemos encontrado 72 pacientes DFEH2 con mutaciones en los genes SMCHD1 y DNMT3B (13.7%) y en 29 pacientes (5.5%) cumplen los requisitos para ser DFEH2 (haplotipo permisivo e hipometilación <25%) pero no hemos encontrado mutaciones en estos genes. Tenemos que analizar el gen LRIF1 en estos casos, pero seguramente estemos ante casos que se expliquen mediante otra regulación epigenética que a día de hoy todavía desconocemos, que existan otros genes que pueden explicar un fenotipo DFEH cuya vinculación con esta distribución topográfica de la debilidad es también otra cuestión a resolver.

En los casos de DFEH2 de nuestra serie, el % de metilación medio encontrado es de 11% (SD 5.6%) frente al valor de 12.1 % encontrado por Lemmers RJ (2015) en 83 portadores de mutaciones en SMCHD1. Los valores medios de metilación en las DFEH1 <34 kb y las DFEH1 en la zona gris son muy similares, 29.6% (SD 10.5) y 31.6% (SD 12.2) respectivamente. Los pacientes con >38 kb tienen un valor medio de metilación de 39.7% (SD 14.1). Basándonos en estos resultados, no podemos hacer uso de la metilación como herramienta para distinguir fehacientemente un caso de DFEH1, incluso en la zona gris, de un paciente sin DFEH. La metilación sólo es significativa y permite detectar a los pacientes con DFEH2.

En relación a la gravedad clínica de los casos con DFEH2, se ha descrito que ésta viene determinada en parte por el tamaño del alelo permisivo y por otra parte por el tipo de mutación (factor Delta2) (Lemmers RJ y cols., 2015 y 2018). El tamaño medio del fragmento con haplotipo permisivo es de 115 kb (33 repeticiones) en los controles y de 60 kb (16 repeticiones) en los DFEH2. Entre los pacientes con DFEH2 de nuestra serie, los tamaños de los fragmentos del alelo con haplotipo permisivo tienen en su mayoría (85.7%) tamaños menores a 20 repeticiones, próximos a la media de 16 repeticiones comentada por Lemmers RJ y cols. (2015 y 2018). En 8 de nuestros pacientes (14.3%) el tamaño es algo mayor (en tres casos 21 repeticiones, en dos casos 22 repeticiones, y en otros tres casos, 25, 31 y 34 repeticiones respectivamente). Respecto al tipo de mutación, como se ha comentado anteriormente, las

mutaciones P-ORF (mutaciones sin sentido) dan un fenotipo más grave que las mutaciones D-ORF (cambio de pauta de lectura, codón stop). En nuestra serie sólo contábamos con la edad de inicio en 14 de los casos (8 mujeres y 6 varones), 9 con mutaciones P-ORF y 6 con mutaciones D-ORF y no se aprecian diferencias en las edades de inicio, aunque tampoco contamos con información clínica para valorar la severidad de los síntomas que presentan.

En la misma línea, Sacconi y cols., 2019 describieron las dos condiciones, la DFEH1 y la DFEH2, como un continuo de la presentación de la misma enfermedad con 2 patologías moleculares diferentes pero interconectadas. Las mutaciones en SMCHD1 sólo se encuentran en portadores de fragmentos entre las 34kb-38kb (8-10 repeticiones) y en ninguno con menos de 8 repeticiones. La mayoría de estos pacientes tenían un alelo permisivo que va desde las 8 a las 20 repeticiones, mientras que los portadores de >20 repeticiones normalmente se encuentran asintomáticos. Este dato sugiere que quizás la búsqueda de casos de DFEH2 debería concentrarse en la zona gris como ocurrió en nuestro caso de falso diagnóstico. En nuestra serie de 72 pacientes con mutaciones en SMCHD1 (Tabla 37, **ANEXO 6**), 8 de ellas poseen además un fragmento entre las 8 y 10 repeticiones siendo factible catalogarlas como posibles casos de doble patología molecular (DFEH1+DFEH2). Sin embargo, no hemos podido validar si el hecho de tener las dos condiciones les hace tener un fenotipo más grave que individuos en su misma familia con una sola condición (mutación en SMCHD1 o fragmento en la zona gris) porque no disponemos de la suficiente información clínica de los casos.

Adicionalmente tenemos un caso (DFEH1+DFEH2) con un fragmento de 34 kb y con una mutación en el gen DNMT3B. Desgraciadamente, en este caso tampoco podemos correlacionar con la clínica porque carecemos de ella.

En estos casos con las dos condiciones, el fragmento *EcoRI* en la zona gris y la mutación en SMCHD1 o DNMT3B, no hemos encontrado diferencias en los niveles de metilación encontrados en los pacientes con sólo la mutación en SMCHD1 o DNMT3B.

Por lo comentado hasta ahora, si la presentación neuromuscular es típica de DFEH, pero es significativamente más severa de lo que cabría esperar para ese tamaño de fragmento, se debe considerar la posibilidad de que se trate de una DFEH2 o de un caso de DFEH1+DFEH2.

Diagnóstico diferencial

En el año 2012 en colaboración con la Dra. Sabrina Sacconi ya reportamos la importancia del hecho de que cuando ya se hayan descartado casos de fragmentos híbridos, deleciones de la región de la sonda e hipometilación en los casos de DFEH tipo 2 sin

contracción, se deberían estudiar otras entidades que pueden compartir un fenotipo similar a la DFEH como son: mutaciones en el gen de la calpaína (CAPN3) incluso en ausencia de déficit de proteína en el Western blot y mutaciones en el gen VCP relacionado con el síndrome IBMPFTD (Miopatía de cuerpos de inclusión, enfermedad de Paget y demencia frontotemporal) (Referencia 7 del anexo de artículos derivados de esta tesis). Cuando los pacientes con mutaciones en este último gen tienen preferentemente síntomas miopáticos, el patrón de debilidad muscular puede asemejarse al de una DFEH. De hecho, en nuestra serie hemos encontrado varios casos de mutaciones en VCP. El análisis de este gen en nuestra serie ha permitido caracterizar 3 nuevas mutaciones (Referencias 4, 8 y 12 del anexo de artículos derivados de esta tesis).

Algoritmo diagnóstico

En 2012 Lemmers RJ et al., publicó en *Neuromuscular Disorders* un trabajo en el que se sentaron las bases del diagnóstico molecular de la DFEH que en gran parte sigue vigente en la actualidad. Basándose en esa guía, el genetista molecular puede decidir si tras un resultado negativo debe realizar análisis genéticos adicionales o no continuar con el estudio. En esta revisión de buenas prácticas se presentó un diagrama del flujo de una muestra que llega al laboratorio para estudio de confirmación o exclusión.

En otros estudios posteriores se propusieron otras variantes de flujo de trabajo (Sacconi S y cols., 2012). En el de Larsen M y cols., 2015 ya se incluía la posibilidad de ser DFEH1 + DFEH2; Posteriormente Tawil R y cols., 2015 y más recientemente Hamel J y cols., 2020 y Rieken A y cols., 2021, han revisado la cuestión. En este último trabajo sobre la base de los estudios diagnósticos que han realizado en la Universidad de Iowa durante el periodo de enero 2015 – julio 2019), se plantea como umbral para la metilación de los pacientes con DFEH2 un valor <28% en vez del 25% (que es el que está establecido para el estudio de metilación mediante la enzima *FseI* y es el que nosotros utilizamos).

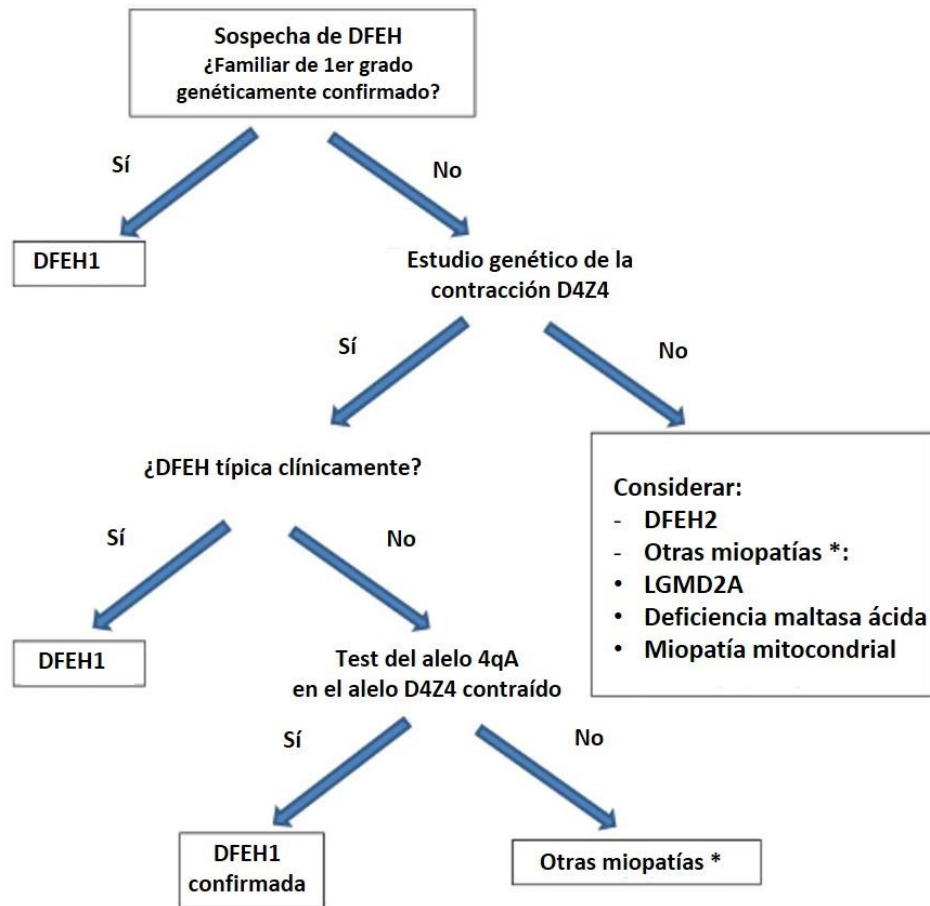


Figura 56. Flujo de diagnóstico recomendado para la DFEH (Ilustración modificada de Tawil R y cols., 2015).

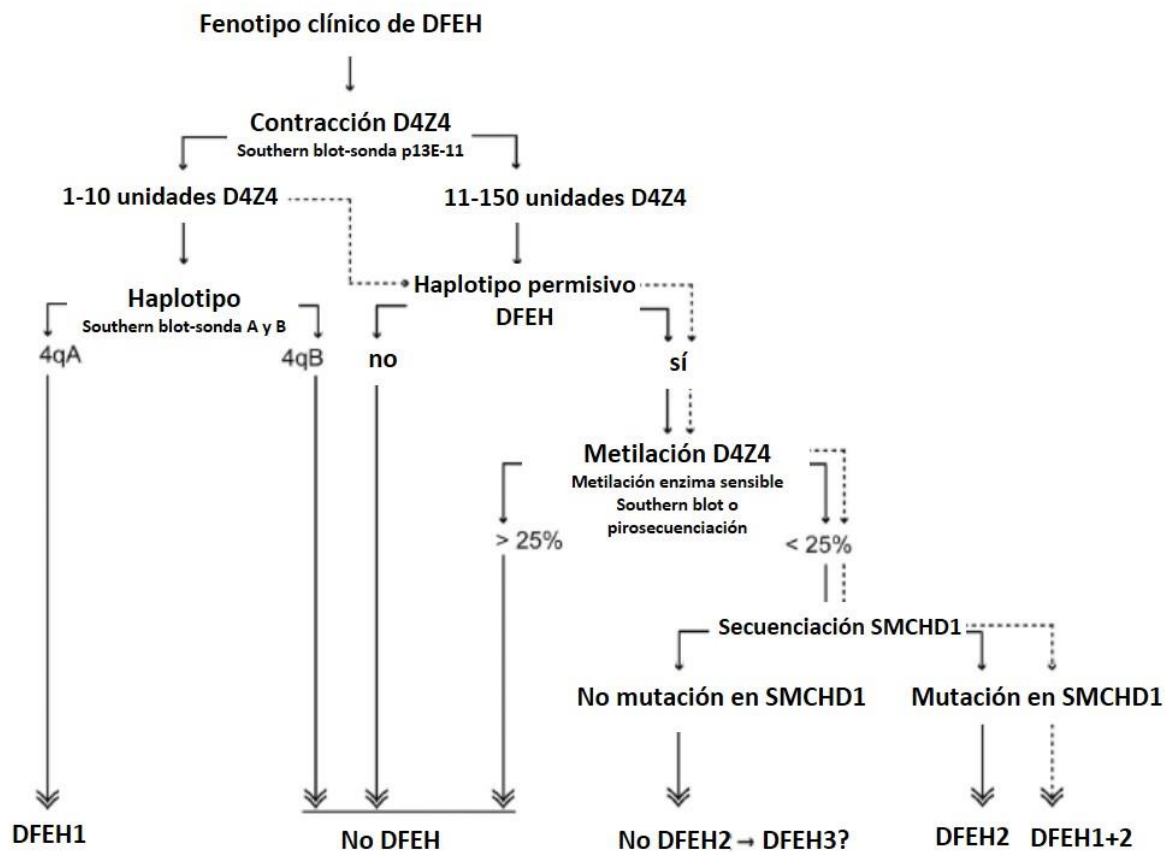


Figura 57. Flujo de trabajo para el diagnóstico de un paciente con un fenotipo típico de DFEH (Imagen modificada de Larsen M y cols., 2015).

En nuestro laboratorio, hemos trabajado con un algoritmo que se refleja en la Figura 58. Como ya se ha comentado, el gran problema para orientar los casos es la falta de información clínica por lo que, ante un resultado de un fragmento en la zona gris, directamente se informa que un fragmento con ese tamaño no nos permite confirmar el diagnóstico molecular de DFEH1, ya que existen individuos en población control que portan esos tamaños de fragmento, y que debe valorarse el caso con cautela dentro del contexto clínico.

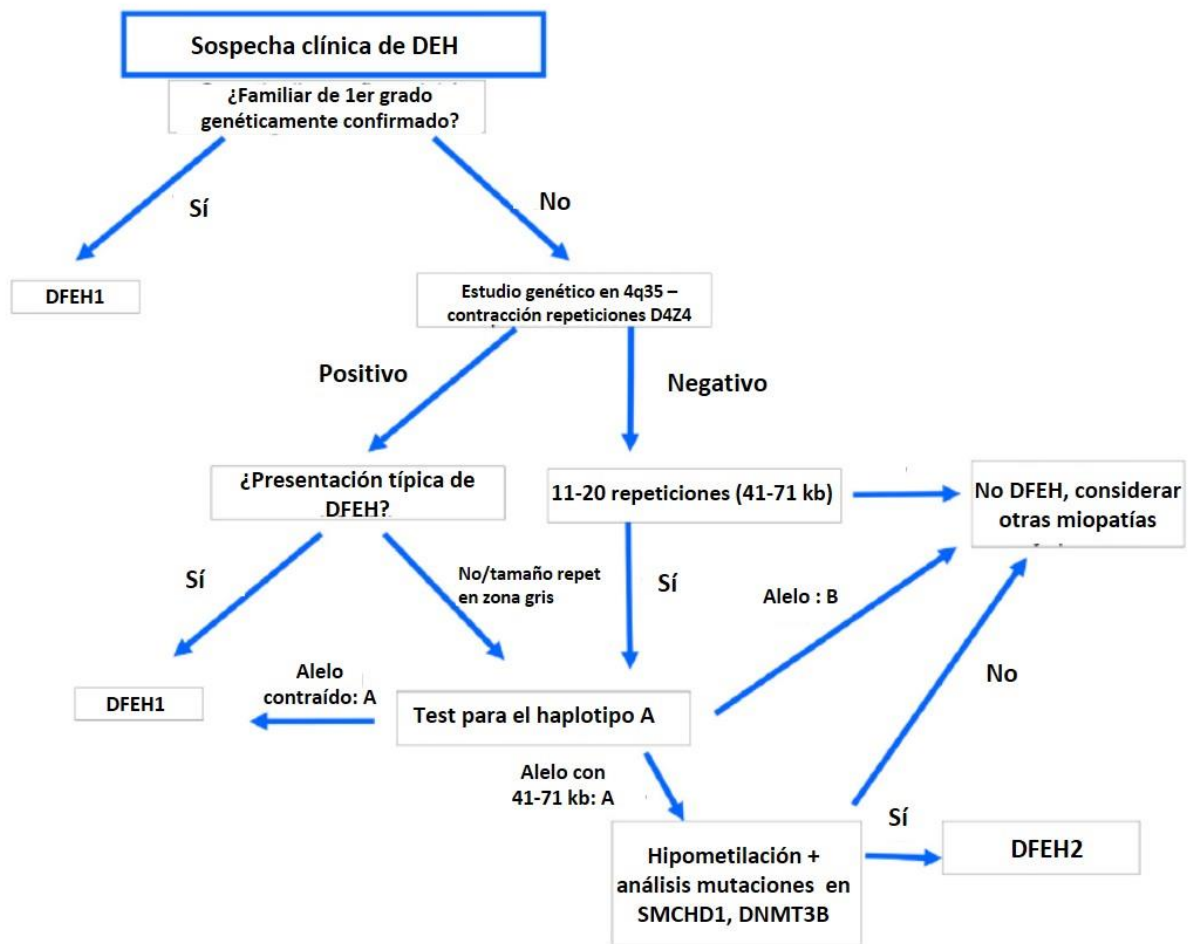


Figura 58. Algoritmo diagnóstico para la confirmación de la DFEH (Ilustración modificada de Hamel J y cols., 2020 y adaptada de Tawil R y cols., 2015))

Sin embargo y como fruto de la revisión de nuestra serie hemos elaborado un algoritmo propio derivado del anterior que concreta un poco más las distintas situaciones que pueden darse, dependiendo de las configuraciones alélicas de los fragmentos encontrados, las técnicas utilizadas y partiendo de si el individuo a estudio tiene sintomatología o no (Figura 59).

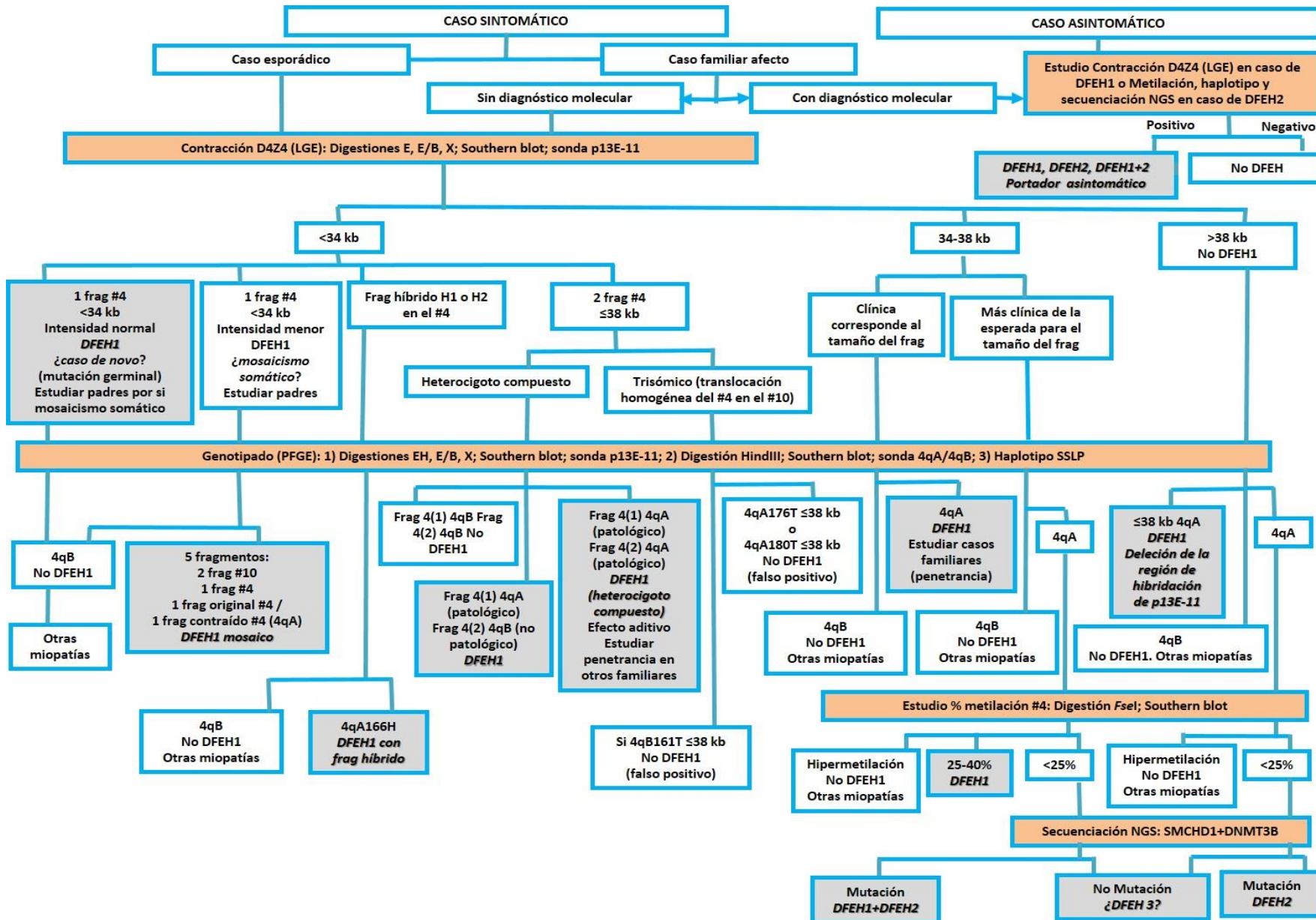


Figura 59. Algoritmo diagnóstico (original) (8 repeticiones D4Z4 = 34 kb; 10 repeticiones D4Z4 = 38 kb).

5. Perspectivas futuras. Estrategias terapéuticas.

De momento no hay una cura para la DFEH pero se están llevando a cabo actualmente distintas estrategias con el objetivo de silenciar el gen DUX4 y así evitar la producción de la proteína tóxica DUX4-fl, atacando en distintos puntos del proceso de expresión de DUX4, bien aguas arriba o aguas abajo (por ejemplo compactando la cromatina para evitar que se copie DUX4, enfocadas a destruir el ARN para evitar la producción de proteína, a eliminar DUX4 del núcleo para evitar la toxicidad de la proteína o a corregir directamente el ADN para destruir la señal polyA al final del gen, etc.) (Le Gall L y cols., 2020).

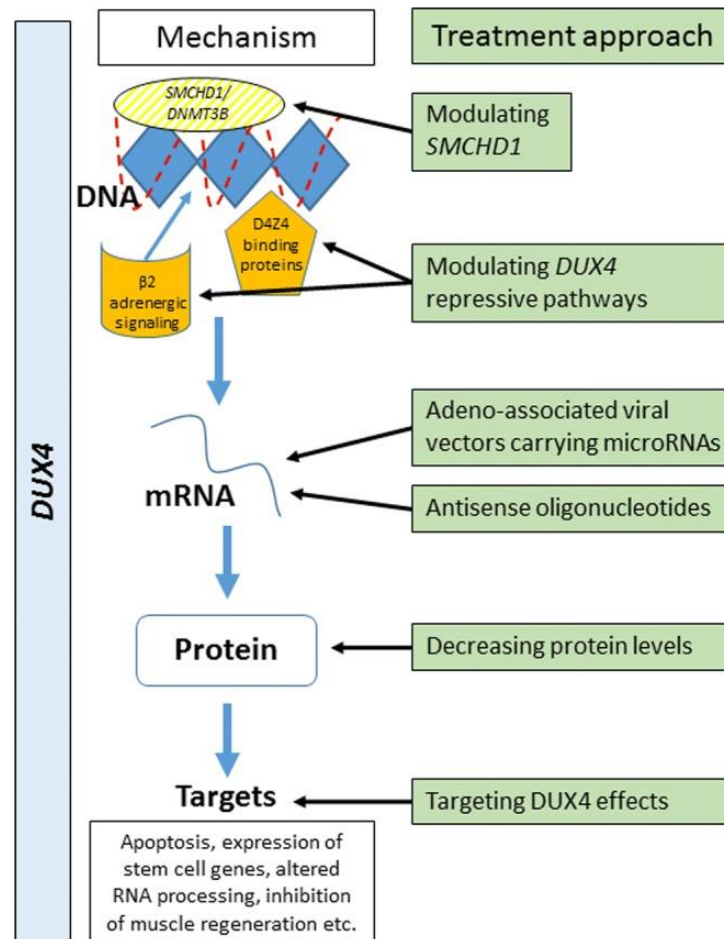


Figura 60. Diferentes aproximaciones para un tratamiento dirigido en la DFEH: modificando la represión epigenética de DUX4, dirigidas al ARNm, hacia la proteína DUX4, o a los efectos celulares posteriores a la expresión de DUX4 (Ilustración tomada de Hamel J y Tawil R 2018).

Resumiendo lo esencial de estas aproximaciones podemos establecer:

-
- 1) Aproximaciones aguas arriba: dirigidas a la transcripción de DUX4
- Destinadas a restaurar el estado epigenético reprimido de DUX4
 - Utilizando un ARNsg (*single guide RNA*) que dirige el sistema dCas9-KRAB al promotor o al exón 1 de DUX4 se consigue reducir el nivel endógeno de DUX4-fl en miocitos de pacientes con DFEH (Gilbert LA y cols., 2013).
 - Inhibiendo transcripcionalmente DUX4 mediante el sistema CRISPR/dCas9 dirigido a las repeticiones D4Z4 y alterando la cromatina (Himeda CL y cols., 2016).
 - Utilizando también un ARNsi (*small interfering*) contra la región promotora de DUX4 se induce un silenciamiento transcripcional epigenético dependiente del sistema DICER/AGO (Lim JW y cols., 2015).
 - Se han intentado silenciar varios factores de regulación epigenética de DUX4 (ASH1L, BRD2, KDM4C y SMARC5) utilizando técnicas de ARN interferente mediante ARNsh (*short hairpin*) o una aproximación de silenciamiento mediante la técnica de dCasP-KRAB (Himeda CL y cols., 2018).
 - Se ha aumentado la actividad represora de dos factores silenciadores de DUX4 que se unen al grupo de repeticiones D4Z4 (NuRD y CAF-1) (Campbell AE y cols., 2018).
 - Destinadas a reducir los niveles de transcripción de DUX4
 - Se han identificado inhibidores de las proteínas de bromodominio extra terminal (BET) y agonistas del receptor beta-2 adrenérgico (Campbell AE y cols., 2017) e inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) como represores de la expresión de DUX4 (Cruz JM y cols., 2018).
 - Se han identificado las moléculas MAPKs, p38 α y p38 β , como supresoras de la expresión de DUX4 en miotubos y mioblastos de pacientes con DFEH y modelos animales (Oliva J y cols., 2019). Se han identificado inhibidores de p38, en especial uno que se utilizaba ya para tratar enfermedades cardiovasculares, Losmapimod, que disminuía de manera dosis dependiente los niveles de ARNm de DUX4 y de sus genes diana (Oliva J y cols., 2019). Esta molécula está actualmente bajo evaluación en un ensayo clínico en fase 2 en pacientes con DFEH (*Clinicaltrials.gov Id: NCT04264442*) que se espera terminar en 2025 y en el que han entrado a formar parte pacientes incluidos en la serie de este trabajo.
 - Activando la ruta de Wnt se reduce la expresión de DUX4 (Block GJ y cols., 2013).
 - Inhibiendo PARP1, que es una proteína que se une al promotor de DUX4, se suprime su expresión y la de genes diana de DUX4 (Sharma V y cols., 2016).

- Se han encontrado estructuras denominadas G-cuadruplex (GQ) formadas por ADN o ARN dentro del potenciador, promotor y transcritos de DUX4 (Ciszewski L y cols., 2020) y se ha visto que la sustancia Berberina (alcaloide extraído de las plantas) se une a los GQ e inhibe la expresión de DUX4, pero no se han visto resultados *in vivo* tras una inyección local de un virus adenoasociado DUX4 (AAV-DUX4) seguida de varias inyecciones intraperitoneales con Berberina (Ciszewski L y cols., 2020).
- 2) Aproximaciones dirigidas al ARNm de DUX4
- Métodos basados en ARNi (tanto los ARNsi como los ARNm son los ARN pequeños más populares utilizados para silenciar la expresión de genes).
 - Se ha conseguido disminuir los niveles de ARNm y de proteína de DUX4 después de transfectar miotubos primarios de pacientes con ARNsi contra DUX4 (Vanderplanck C y cols., 2011) y también después de inyectar varios ARNm dirigidos específicamente contra DUX4 en un modelo de ratón que expresaba DUX4 (Wallace LM y cols., 2012; Giesige CR y cols., 2018).
 - Métodos basados en oligonucleótidos antisentido (AOs):
 - Se empezó hace diez años tratando miotubos de pacientes DFEH con bases 2'-O-metilo en una cadena de fosforotioato dirigidas a los sitios de empalme de los exones 2 y 3 de DUX4 y se redujo su expresión en un 50% (Vanderplanck C y cols., 2011).
 - Posteriormente se usó un vivo-PMO (*phosphorodiamidate morpholino oligomer*) dirigido al exón 3 de DUX4 y se consiguió reducir 30 veces la expresión de su ARNm (Ansseau E y cols., 2017).
 - Desde el desarrollo de los AO de tercera generación (PMO), se han utilizado distintas estrategias dirigidas al sitio de señal de poliadenilación en la transcripción de DUX4, demostrando su eficacia en la inhibición de DUX4 de una manera dependiente de la dosis en mioblastos primarios de pacientes (Chen JC y cols., 2016), en clones inmortalizados de pacientes (Marsollier AC y cols., 2016) y en un modelo de ratón de xenoinjerto (Zhang Y y cols., 2014). Todos los modelos *in vitro* e *in vivo* de DFEH han confirmado una disminución de la expresión de los niveles de DUX4-fl y de sus genes diana (TRIM43, MBD3L2 y ZSCAN4) (Marsollier AC y cols., 2016), lo que confirma las propiedades terapéuticas de los AO y los morfolinós en corregir la toxicidad mediada por DUX4 en el músculo esquelético.

-
- Se ha diseñado un oligonucleótido antisentido (*gapmer*) con un ácido nucleico bloqueado (LNA) para silenciar DUX4 (Lim KRQ y cols., 2020) que tiene una mayor afinidad por el ARN diana. Su eficacia ha sido probada en un modelo de ratón FLExDUX4 que expresa niveles muy bajos de DUX4, y los consiguieron reducir en un 70%.
- 3) Aproximaciones aguas abajo: dirigidas a la toxicidad de la proteína DUX4-fl
- Bloqueando la actividad de la proteína DUX4
 - Se ha utilizado la isoforma DUX4-s (no tóxica) como agonista de DUX4-fl. Es un sistema que utiliza la sobreexpresión de DUX4-s en un modelo de pez cebra con DFEH para prevenir la unión de DUX4-fl a ADN y bloquear al final su actividad transcripcional (Mitsubishi H y cols., 2018). Utiliza a DUX4-s como inhibidor que compite con DUX4-fl para reducir su toxicidad.
 - Se han utilizado aptámeros (moléculas de ADN o de ARN con capacidad para unirse específicamente a proteínas, pequeños péptidos o incluso a células enteras) dirigidos específicamente a la proteína DUX4 (Klingler C y cols., 2020). La estructura especial de estos aptámeros (tamaño de secuencia optimizado y dominios en forma de horquilla y secuencias en bucle) aumenta su actividad de unión a DUX4.
 - Dirigiendo estrategias contra los cofactores de DUX4: p300 y CBP son dos proteínas con actividad histona acetiltransferasa (HAT) que interactúan con el dominio C terminal de DUX4 y se reclutan en los sitios de unión a proteínas diana de DUX4 lo que resulta en una mayor acetilación y expresión de los genes diana. Dirigirse y controlar la interacción DUX4/p300 y/o DUX4/CBP o la actividad HAT de esos factores de unión a DUX4 constituyen un punto de control importante para controlar la actividad de DUX4 (Choi SH y cols., 2016). Se ha utilizado el compuesto iP300w dirigido contra la actividad HAT para regular la citotoxicidad de DUX4 en el músculo esquelético, aunque parece que puede haber una regulación alternativa para los genes diana de DUX4 porque no todos disminuyen su expresión, como por ejemplo ZSCAN4 (Bosnakovski D y cols., 2019).
 - Dirigidas a las vías de señalización mediadas por DUX4.
 - La expresión de DUX4 en células musculares esqueléticas induce a una citotoxicidad debido a una acumulación anormal de niveles de ácido hialurónico (HA) (DeSimone AM y cols., 2019). Esta acumulación de HA produce varias anomalías como la inducción de focos de ARNs o agregación de FUS (proteína de

unión al ARN). Se ha utilizado la molécula 4MU (4-metilumbeliferona) como inhibidor competitivo de la biosíntesis de HA para evitar esas patologías nucleares y reducir la citotoxicidad de DUX4. A pesar de que 4MU tuvo un bajo impacto en la expresión de DUX4, consiguió reducir la expresión de genes diana como LEUTX y MBD3L2.

En los últimos años se ha acelerado todas estas líneas de investigación gracias a la colaboración de las empresas farmacéuticas y biomédicas.

El campo enfocado a terapia está evolucionando muy rápidamente y hay resultados esperanzadores que apuntan a que en un lapso breve de tiempo se va a encontrar una estrategia terapéutica, que consiga detener o frenar los efectos deletéreos de este fallo en el sistema de represión de la célula que permiten la expresión perjudicial de DUX4 en el músculo.

Todo ello sin olvidar otras aproximaciones comunes a otras distrofias dirigidas a neutralizar o compensar los fallos en cadena que se producen aguas abajo de la desrepresión de DUX4 que conducen a la apoptosis muscular.

Es por eso que he introducido la palabra “inacabada” en el título de esta tesis, porque seguramente aún queda una o más matrioshkas por descubrir en la DFEH.

Desde nuestro punto de vista y de cara al futuro próximo, nos planteamos una serie de temas interesantes de abordar en nuestra serie de pacientes:

- Realizar una búsqueda más exhaustiva de pacientes con clínica característica de DFEH1 sin contracción y que mediante la PFGE no hayamos podido visualizar uno de los alelos del # 4 en busca de candidatos de delección de la región donde hibrida la sonda p13E-11.
- Secuenciar el gen LRIF1 en los pacientes que han sido negativos para la DFEH1 y que cumplen los requisitos de una DFEH2 (hipometilación muy marcada y haplotipo permisivo).
- Dentro de los casos en los que hemos obtenido un fragmento *EcoRI* en la zona gris, habría que hacer revisar bien la clínica y estudiar la metilación en los casos con más síntomas que los que corresponderían con un fragmento de ese tamaño por si estamos antes casos de DFEH1 (con un fragmento de 8-10 repeticiones) y de DFEH2 (que se secuenciaría en los casos en que la metilación fuera <25%).

Quedan aún muchas cuestiones por resolver como por ejemplo la posible impronta del sexo sobre la expresión clínica, dilucidar definitivamente si existe un fenómeno de anticipación o el papel regulador del fenotipo que pueden jugar los demás genes relacionados con DFEH2 u otros que pudieran descubrirse.

A este respecto creemos que aquellos pacientes con un fragmento en la zona gris con hipometilación y sin mutaciones en los 3 genes DFEH deberían ser tributarios de un rastreo genómico con NGS para buscar nuevos genes relacionados con la condición.

Por último y aunque esto no es solo importante para la DFEH, sería muy importante establecer las razones por las que determinados músculos se afectan selectivamente en esta condición así como el papel que puede jugar la inflamación como agente efector del daño muscular desencadenado por la desrepresión de DUX4.

Aunque los ensayos clínicos ya están aquí no hay que dejar de perseverar por encontrar modelos animales más adecuados que los actuales para mejorar la comprensión de esta enigmática enfermedad.

Queda pues mucho trabajo por hacer hasta descubrir la última sorpresa que a buen seguro nos deparará esta enfermedad.

CONCLUSIONES



1. El diagnóstico molecular de la DFEH supone un reto técnico cuya complejidad ha podido ser abordada en los últimos años pero que a diferencia de otras enfermedades genéticas no se ha beneficiado tanto de las técnicas de NGS y precisa de un abordaje específico para cada contexto y depende de la información clínica del caso y/o familia.
2. El porcentaje de casos con diagnóstico molecular de DFEH confirmado en series de casos generados por diferentes hospitales, está en torno al 50% en España y se mantiene estable en los últimos 20 años, lo que puede ser interpretado como signo de un conocimiento defectuoso de la clínica por parte de los clínicos y/o un amplio solapamiento con otras miopatías con perfil clínico cercano.
3. La distribución de los alelos patológicos en los casos DFEH1 sigue una distribución normal, agrupándose el 50% de los individuos entre los tamaños de 20 kb-28 kb y un 6.2% concentrándose en el rango de la “zona gris” (34kb-38kb).
4. El 8.4 % de los casos DFEH1 son *de novo*, esto es, sin antecedentes familiares de la enfermedad, y presentan un fragmento contraído de menor tamaño comparado con los casos familiares (18 kb frente a 25 kb). Estos casos *de novo*, presentan una edad de inicio más temprana (19.89 años frente a 25 años) que los familiares.
5. A pesar de no contar con datos clínicos de muchos pacientes corroboramos en nuestra serie que existe una correlación directa entre la edad de inicio y el tamaño de fragmento en casos familiares, sin embargo, esta correlación desaparece en los casos *de novo* con fragmentos por encima de las 24 kb. Por debajo de las 24 kb se mantiene una correlación inversa entre la gravedad y el tamaño del fragmento que también desaparece con fragmentos mayores.
6. En 557 familias estudiadas en nuestra serie con al menos dos individuos estudiados molecularmente, 72 individuos (3.7%) que han sido portadores del fragmento patológico familiar, permanecen asintomáticos. Existe una mayor proporción de mujeres asintomáticas (62.5%) en los rangos intermedios de delección (22kb-33kb) en los casos familiares de la enfermedad.

8. El síntoma de inicio más común en los pacientes DFEH1 es la debilidad de miembros superiores (31.66% de los casos) seguido de debilidad de miembros inferiores (12.23%) y de debilidad de la cintura escapular (11.29%). En la DFEH2 el orden se invierte, el primer síntoma es la debilidad de miembros inferiores (28.57% de los casos), seguido de debilidad de miembros superiores y de debilidad de cintura escapular (19.05% en ambos casos). Aunque estos datos no tienen significación estadística apuntan a que en contra de lo publicado por nosotros mismos hace años el fenotipo de la DFEH2 puede ser diferente a la DFEH1 (afectación de inicio topográfico diferente y más simétrica).
9. En la población española no afecta con DFEH, la combinación de alelos del # 4 más común es A161/B163 (29.38%) seguida de la A161/A161 (15.82%). La combinación de alelos del # 4 más común en los pacientes con DFEH1 es A161/A161 (30.23%) seguida de A161/B163 (27.13%).
10. La mayoría de los pacientes de nuestra población con DFEH1 (76.5%) tienen una configuración estándar para los alelos del # 4 y # 10 (disomía), sin embargo, el 23.5% restante sufre reordenamientos cromosómicos (híbridos H1 y H2, translocaciones homogéneas de repeticiones del # 4 al # 10 y viceversa, mosaicismo, reordenamientos complejos). De esos reordenamientos subteloméricos, solamente el 1.5% fueron los causales de la DFEH1 en nuestra serie de pacientes. Estos reordenamientos precisan un estudio mediante PFGE para ser resueltos.
11. En nuestra población, como en otras series publicadas, hemos encontrado dentro de nuestra serie de pacientes con DFEH1 casos de heterocigotos compuestos (0.5%) que portan dos fragmentos del # 4 en el rango patológico.
12. De los individuos con fenotipo sugestivo de DFEH pero con diagnóstico molecular negativo para DFEH1, el 27.6 % de los casos (72) han sido diagnosticados de DFEH2 por portar mutaciones en SMCDH1 (70 casos) y en DNMT3B (2 casos). De estos 72 casos, 8 presentan además un fragmento en la zona gris (34-38Kb) y son por lo tanto DFEH1 + DFEH2. Los 72 casos presentan una hipometilación muy marcada (<25%).

13. De los 130 pacientes con fragmentos en la zona gris en los que hemos estudiado la metilación, hay un 18% de casos con un porcentaje de metilación <25%, que tiene un haplotipo permisivo y en los que se han descartado mutaciones en los genes SMCHD1 y DNMT3B. Seguramente entre estos individuos se encuentren pacientes con una DFEH3 de la que todavía desconocemos la alteración genética o epigenética subyacente.
14. Así como en los pacientes con DFEH2 la metilación es una herramienta indicativa del proceso epigenético subyacente y es <25% en todos los casos, en los pacientes con DFEH1 no se puede utilizar como herramienta diagnóstica, ya que los rangos de metilación de los pacientes con DFEH1 y los controles se solapan.
15. En el diagnóstico prenatal es vital la información clínica y la calidad y cantidad de la muestra recibida (de vellosidad corial, de líquido amniótico o de ADN fetal extraído). El diagnóstico además debe apoyarse cuando se pueda (en casos familiares en los que se cuente con al menos dos individuos afectados) en técnicas complementarias como los marcadores indirectos y el haplotipo SSLP que requieren una menor cantidad de ADN. En nuestra serie hemos realizado el estudio indirecto en paralelo al Southern blot en el 25% de los casos prenatales estudiados (93), siendo informativos los marcadores en todos ellos.

PUBLICACIONES
DERIVADAS DE LA TESIS

1. Ehrlich M, Jackson K, Tsumagari K, **Camano P**, Lemmers RJ. Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linked to FSHD. *Chromosoma* 2007 Apr;116(2):107-16.
2. Quinzii C, Bonilla E, Vu T, Grewal R, Tanji K, Kattah A, **Camano P**, Otaegui D, Blake D, Wilhelmsen K, Rowland L, Hays A, Hirano M. Clinical and genetic characterization of a new X-linked dominant scapuloperoneal myopathy. *American Journal of Human Genetics* 2008 Jan; 82(1):208-13
3. Sistiaga A, **Camaño P**, Otaegui D, Ibáñez B, Ruiz-Martinez J, Martí-Massó JF, López de Munain A. Cognitive function in facioscapulohumeral dystrophy correlates with the molecular defect. *Genes Brain Behav.* 2009 Feb;8(1):53-9
4. Stojkovic T, Hammouda EH, Richard P, López de Munain A, Ruiz-Martínez J, **Camaño P**, Laforêt P, Péniisson-Besnier I, Ferrer X, Lacour A, Lacomblez L, Claeys KG, Maurage C, Fardeau M, Eymard B. Clinical outcome in 19 French and Spanish patients with valosin-containing protein myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia. *Neuromusc Disord* 2009 May;19(5); 316-323.
5. Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, **Camaño P**, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R, Frants RR, van der Maarel SM. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science*. 2010 Sep 24;329(5999):1650-3
6. de Greef JC, Lemmers RJ, **Camaño P**, Day JW, Sacconi S, Dunand M, van Engelen BG, Kiuru-Enari S, Padberg GW, Rosa AL, Desnuelle C, Spuler S, Tarnopolsky M, Venance SL, Frants RR, van der Maarel SM, Tawil R. Clinical features of facioscapulohumeral dystrophy 2. *Neurology*. 2010 Oct 26;75(17):1548-54
7. Sacconi S, **Camaño P**, de Greef JC, Lemmers RJLF, Salviati L, Boileau C, López de Munain A, van der Maarel S, Desnuelle C. Patients with a phenotype consistent with facioescapulohumeral muscular dystrophy display genetic and epigenetic heterogeneity. *J Med Genet*. 2012 Jan; 49(1):41-6.
8. Peyer AK, Kinter J, Hench J, Frank S, Fuhr P, Thomann S, Fischmann A, Kneifel S, **Camaño P**, Munain AL, Sinnreich M, Renaud S. Novel valosin containing protein mutation in a Swiss family with hereditary inclusion body myopathy and dementia. *Neuromuscul Disord*. 2013 Feb;23(2):149-154

9. Lemmers RJ, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, **Camano P**, Ramos Arroyo MA, Jerico I, Rogers MT, Miller DG, Upadhyaya M, Verschuuren JJ, Lopez de Munain Arregui A, van Engelen BG, Padberg GW, Sacconi S, Tawil R, Tapscott SJ, Bakker B, van der Maarel SM. Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2. *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 1;24(3):659-69.
10. van den Boogaard M, Lemmers RJ, **Camano P**, van der Vliet PJ, Voermans N, van Engelen BG, López de Munain A, Tapscott SJ, van der Stoep N, Tawil R, van der Maarel SM. Double *SMCHD1* variants in FSHD2: the synergistic effect of two *SMCHD1* mutations on D4Z4 hypomethylation and disease penetrance in FSHD2. *Eur J Hum Genet.* 2016 Jan;24(1):78-85
11. Fernández-Torrón R, López de Munain A, **Camaño P**, García-Bragado F. Rapidly Reversible Winging Scapula. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Sep;67(9):2502.
12. Lucente G, Almendrote M, Ramos-Fransi A, Martínez-Piñeiro A, **Camaño P**, Ballester-Lopez A, Lucia A, Carrato C, Nogales-Gadea G, Coll-Cantí J. A novel mutation in the valosin-containing-protein gene found in a Spanish family. *J Neurol Sci.* 2018 Aug 15;391:112-113.
13. Giacomucci G, Monforte M, Diaz-Manera J, Mul K, Fernandez Torrón R, Maggi L, CM Bettolo, Dahlqvist JR, Haberlova J, **Camaño P**, Gros M, Tartaglione T, Cristiano L, Gerevini S, Calandra P, Deidda G, Giardina E, Sacconi S, Straub V, Vissing J, Van Engelen B, Ricci E, Tasca G. Deep phenotyping investigation of FSHD2 by MRI: refining the FSHD-related disease spectrum. *Eur J Neurol.* 2020 Dec;27(12):2604-2615.

Capítulo de libro

14. Manual de Enfermedades Neuromusculares. Capítulo 48 Distrofia Facioescapulohumeral y síndromes relacionados. **Camano P**, Fernández-Torrón R, Lemmers RJ, Sacconi S, Sistiaga S, López de Munain A (2017). Editor: Eduardo Gutiérrez Rivas. Referencia: 9788416732135. ISBN: 978-84-16732-35-7

BIBLIOGRAFÍA

Adams V, Mathisen B, Baines S, Lazarus C, Callister R. Reliability of measurements of tongue and hand strength and endurance using the Iowa Oral Performance Instrument with elderly adults. *Disabil Rehabil.* 2015;37(5):389-95.

Anseau E, Vanderplanck C, Wauters A, Harper SQ, Coppée F, Belayew A. Antisense Oligonucleotides Used to Target the DUX4 mRNA as Therapeutic Approaches in FacioscapuloHumeral Muscular Dystrophy (FSHD). *Genes (Basel).* 2017 Mar 3;8(3):93

Bakker E, Van der Wielen MJ, Voorhoeve E, Ippel PF, Padberg GW, Frants RR, Wijmenga C. Diagnostic, predictive, and prenatal testing for facioscapulohumeral muscular dystrophy: diagnostic approach for sporadic and familial cases. *J Med Genet.* 1996 Jan;33(1):29-35.

Bakker E, Wijmenga C, Vossen RH, Padberg GW, Hewitt J, van der Wielen M, Rasmussen K, Frants RR. The FSHD-linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter. *Muscle Nerve.* 1995;2:S39-44.

Balog J, Thijssen PE, de Greef JC, Shah B, van Engelen BG, Yokomori K, Tapscott SJ, Tawil R, van der Maarel SM. Correlation analysis of clinical parameters with epigenetic modifications in the DUX4 promoter in FSHD. *Epigenetics.* 2012;7(6):579-84.

Balog J, Thijssen PE, Shadle S, et al. Increased DUX4 expression during muscle differentiation correlates with decreased SMCHD1 protein levels at D4Z4. *Epigenetics.* 2015;10(12):1133-1142.

Balog J, Goossens R, Lemmers R, et al. Monosomy 18p is a risk factor for facioscapulohumeral dystrophy. *J Med Genet.* 2018;55:469-478.

Barat-Houari M, Nguyen K, Bernard R, Fernandez C, Vovan C, Bareil C, Khau Van Kien P, Thorel D, Tuffery-Giraud S, Vasseur F, Attarian S, Pouget J, Girardet A, Lévy N, Claustres M. New multiplex PCR-based protocol allowing indirect diagnosis of FSHD on single cells: can PGD be offered despite high risk of recombination? *Eur J Hum Genet.* 2010 May;18(5):533-8.

Becker PE. *Dystrophia Musculorum Progressiva. Eine genetische und klinische Untersuchung der Muskeldystrophen.* Georg Thieme Verlag, 1953, Stuttgart, Germany.

Belayew A. [Functional study of a gene candidate for Landouzy-Dejerine muscular dystrophy]. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2004;159(5-6):343-8; discussion 348-9.

Bersano A, Del Bo R, Lamperti C, Ghezzi S, Fagiolari G, Fortunato F, Ballabio E, Moggio M, Candelise L, Galimberti D, Virgilio R, Lanfranconi S, Torrente Y, Carpo M, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Inclusion body myopathy and frontotemporal dementia caused by a novel VCP mutation. *Neurobiol Aging.* 2009 May;30(5):752-8.

Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Nov;14(11):1008-16.

Blewitt ME, Gendrel AV, Pang Z et al: SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nat Genet.* 2008;40: 663–669.

Block, G.J.; Narayanan, D.; Amell, A.M.; Petek, L.M.; Davidson, K.C.; Bird, T.D.; Tawil, R.; Moon, R.T.; Miller, D.G. Wnt/beta-catenin signaling suppresses DUX4 expression and prevents apoptosis of FSHD muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 2013, 22, 390–396.

Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, Meneveri R, Marozzi A, Mueller S, Battaglioli E, Ginelli E. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC Biol.* 2009 Jul 16;7:41.

Bosnakovski D, Xu Z, Gang EJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppée F, Belayew A, Perlingeiro RR, Kyba M. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *EMBO J.* 2008 Oct 22;27(20):2766-79.

Bosnakovski D, Toso EA, Hartweck LM, Magli A, Lee HA, Thompson ER, Dandapat A, Perlingeiro RCR, Kyba M. The DUX4 homeodomains mediate inhibition of myogenesis and are functionally exchangeable with the Pax7 homeodomain. *J Cell Sci.* 2017 Nov 1;130(21):3685-3697.

Bosnakovski D, da Silva MT, Sunny ST, Ener ET, Toso EA, Yuan C, Cui Z, Walters MA, Jadhav A, Kyba M. A novel P300 inhibitor reverses DUX4-mediated global histone H3 hyperacetylation, target gene expression, and cell death. *Sci Adv.* 2019 Sep 11;5(9):eaaw7781

Brideau NJ, Coker H, Gendrel AV, et al. Independent mechanisms target SMCHD1 to H3K9me3-modified chromatin and the inactive X chromosome. *Mol Cell Biol.* 2015;35:4053-4068.

Brooke MH. Clinical examination of patients with neuromuscular disease. *Adv Neurol.* 1977;17:25-39.

Bushby KM, Pollitt C, Johnson MA, Rogers MT, Chinnery PF. Muscle pain as a prominent feature of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): four illustrative case reports. *Neuromuscul Disord.* 1998 Dec;8(8):574-9.

Busse K, Köhler J, Stegmann K, Pongratz D, Koch MC, Schreiber H. An inherited 4q35-EcoRI-DNA-fragment of 35 kb in a family with a sporadic case of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscul Disord.* 2000 Mar;10(3):178-81.

Butz M, Koch MC, Müller-Felber W, Lemmers RJ, van der Maarel SM, Schreiber H. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Phenotype-genotype correlation in patients with borderline D4Z4 repeat numbers. *J Neurol*. 2003 Aug;250(8):932-7.

Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, Gabellini D. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell*. 2012 May 11;149(4):819-31.

Cacurri S, Piazza N, Deidda G, Vigneti E, Galluzzi G, Colantoni L, Merico B, Ricci E, Felicetti L. Sequence homology between 4qter and 10qter loci facilitates the instability of subtelomeric KpnI repeat units implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 1998 Jul;63(1):181-90.

Campbell, A.E.; Oliva, J.; Yates, M.P.; Zhong, J.W.; Shadle, S.C.; Snider, L.; Singh, N.; Tai, S.; Hiramuki, Y.; Tawil, R.; et al. BET bromodomain inhibitors and agonists of the beta-2 adrenergic receptor identified in screens for compounds that inhibit DUX4 expression in FSHD muscle cells. *Skelet. Muscle* 2017, 7, 16.

Campbell AE, Shadle SC, Jagannathan S, Lim JW, Resnick R, Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ. NuRD and CAF-1-mediated silencing of the D4Z4 array is modulated by DUX4-induced MBD3L proteins. *Elife*. 2018 Mar 13;7:e31023.

Caughey JE, Gwynne JF, Jefferson NR. Dystrophia myotonica associated with familial Paget's disease (osteitis deformans) with sarcomata. *J Bone Joint Surg Br*. 1957 May;39-B(2):316-25.

Cella D, Riley W, Stone A, Rothrock N, Reeve B, Yount S, Amtmann D, Bode R, Buysse D, Choi S, Cook K, Devellis R, DeWalt D, Fries JF, Gershon R, Hahn EA, Lai JS, Pilkonis P, Revicki D, Rose M, Weinfurt K, Hays R; PROMIS Cooperative Group. The Patient-Reported Outcomes Measurement Information System (PROMIS) developed and tested its first wave of adult self-reported health outcome item banks: 2005-2008. *J Clin Epidemiol*. 2010 Nov;63(11):1179-94.

Chen DH, Raskind WH, Parson WW, et al. A novel mutation in FHL1 in a family with X-linked scapuloperoneal myopathy: phenotypic spectrum and structural study of FHL1 mutations. *J Neurol Sci*. 2010;296(1-2):22-9.

Chen JC, King OD, Zhang Y, Clayton NP, Spencer C, Wentworth BM, Emerson CP Jr, Wagner KR. Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics. *Mol Ther*. 2016 Aug;24(8):1405-11.

Chesworth BM, Hamilton CB, Walton DM, Benoit M, Blake TA, Bredy H, Burns C, Chan L, Frey E, Gillies G, Gravelle T, Ho R, Holmes R, Lavallée RL, MacKinnon M, Merchant AJ, Sherman T, Spears K, Yardley D. Reliability and validity of two versions of the upper extremity functional index. *Physiother Can*. 2014 Summer;66(3):243-53.

BIBLIOGRAFÍA

Choi SH, Gearhart MD, Cui Z, Bosnakovski D, Kim M, Schennum N, Kyba M. DUX4 recruits p300/CBP through its C-terminus and induces global H3K27 acetylation changes. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 20;44(11):5161-73.

Chung CS, Morton NE. Discrimination of genetic entities in muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1959 Dec;11:339-59.

Ciszewski L, Lu-Nguyen N, Slater A, Brennan A, Williams HEL, Dickson G, Searle MS, Popplewell L. G-quadruplex ligands mediate downregulation of DUX4 expression. *Nucleic Acids Res.* 2020 May 7;48(8):4179-4194.

Cohen J, DeSimone A, Lek M, Lek A. Therapeutic Approaches in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Trends Mol Med.* 2021 Feb;27(2):123-137.

Cowling BS, Cottle DL, Wilding BR, D'Arcy CE, Mitchell CA, McGrath MJ. Four and a half LIM protein 1 gene mutations cause four distinct human myopathies: a comprehensive review of the clinical, histological and pathological features. *Neuromuscul Disord.* 2011 Apr;21(4):237-51.

Cruz, J.M.; Hupper, N.; Wilson, L.S.; Concannon, J.B.; Wang, Y.; Oberhauser, B.; Patora-Komisarska, K.; Zhang, Y.; Glass, D.J.; Trendelenburg, A.U.; et al. Protein kinase A activation inhibits DUX4 gene expression in myotubes from patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 2018, 293, 11837–11849.

Dai Y, Li P, Wang Z, Liang F, Yang F, Fang L, Huang Y, Huang S, Zhou J, Wang D, Cui L, Wang K. Single-molecule optical mapping enables quantitative measurement of D4Z4 repeats in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet.* 2020 Feb;57(2):109-120.

de Greef JC, Wohlgemuth M, Chan OA, Hansson KB, Smeets D, Frants RR, Weemaes CM, Padberg GW, van der Maarel SM. Hypomethylation is restricted to the D4Z4 repeat array in phenotypic FSHD. *Neurology.* 2007 Sep 4;69(10):1018-26.

de Greef JC, Frants RR, van der Maarel SM. Epigenetic mechanisms of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Mutat Res.* 2008 Dec 1;647(1-2):94-102.

de Greef JC, Lemmers RJ, van Engelen BG, Sacconi S, Venance SL, Frants RR, Tawil R, van der Maarel SM. Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD. *Hum Mutat.* 2009 Oct;30(10):1449-59.

de Greef JC, Lemmers RJ, **Camaño P**, Day JW, Sacconi S, Dunand M, van Engelen BG, Kiuru-Enari S, Padberg GW, Rosa AL, Desnuelle C, Spuler S, Tarnopolsky M, Venance SL, Frants RR, van der Maarel SM,

Tawil R. Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2. *Neurology*. 2010 Oct 26;75(17):1548-54.

Deidda G, Cacurri S, Grisanti P, Vigneti E, Piazza N, Felicetti L. Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter. *Eur J Hum Genet*. 1995;3(3):155-67.

Deidda G, Cacurri S, Piazza N, Felicetti L. Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet*. 1996 May;33(5):361-5.

Deenen JCW, Arnts H, van der Maarel SM, Padberg GW, Verschuuren JJGM, Bakker E, et al. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology*. 2014;83:1056–9.

DeSimone AM, Leszyk J, Wagner K, Emerson CP Jr. Identification of the hyaluronic acid pathway as a therapeutic target for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Sci Adv*. 2019 Dec 11;5(12):eaaw7099

Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 13;104(46):18157-62.

Dmitriev P, Bou Saada Y, Dib C, Anseau E, Barat A, et al. 2016. DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients. *Free Radic. Biol. Med*. 99:244–58

Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*. 2002 Mar;3(3):224-9.

Ehrlich M, Jackson K, Tsumagari K, **Camaño P**, Lemmers RJ. Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linked to FSHD. *Chromosoma*. 2007 Apr;116(2):107-16.

Eichinger K, Heatwole C, Iyadurai S, King W, Baker L, Heining S, Bartlett A, Dilek N, Martens WB, Mcdermott M, Kissel JT, Tawil R, Statland JM. Facioscapulohumeral muscular dystrophy functional composite outcome measure. *Muscle Nerve*. 2018 Jan 30;10.1002/mus.26088.

Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord*. 1991;1(1):19-29. Review.

Ferreboeuf M, Mariot V, Furling D, Butler-Browne G, Mouly V, Dumonceaux J. Nuclear protein spreading: implication for pathophysiology of neuromuscular diseases. *Hum Mol Genet*. 2014 Aug 1;23(15):4125-33.

BIBLIOGRAFÍA

Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Apr;15(2):172-83.

Fitzsimons RB, Gurwin EB, Bird AC. Retinal vascular abnormalities in facioscapulohumeral muscular dystrophy. A general association with genetic and therapeutic implications. *Brain.* 1987 Jun;110 (Pt 3):631-48.

Fitzsimons RB. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* 1999 Oct;12(5):501-11

Fitzsimons RB. Retinal vascular disease and the pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. A signalling message from WNT? *Neuromuscul Disord* 2011;21:263–71.

Frisullo G, Frusciante R, Nociti V, et al. CD8(+) T cells in facioscapulohumeral muscular dystrophy patients with inflammatory features at muscle MRI. *J Clin Immunol.* 2011;31(2):155–166.

Funakoshi M, Goto K, Arahata K. Epilepsy and mental retardation in a subset of early onset 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology.* 1998 Jun;50(6):1791-4.

Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* 2002 Aug 9;110(3):339-48.

Gabellini D, Tupler R, Green MR. Transcriptional derepression as a cause of genetic diseases. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Jun;13(3):239-45.

Gardner-Medwin D, Walton JN, The clinical examination of the voluntary muscles. In Walton JN, editor. Disorders of voluntary muscles. 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1974, pp 517-560

Gaszner M, Felsenfeld G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet.* 2006 Sep;7(9):703-13.

Gendrel, A.V., Apedaile, A., Coker, H., Termanis, A., Zvetkova, I., Godwin, J., Tang, Y.A., Huntley, D., Montana, G., Taylor, S., et al. (2012). Smchd1-dependent and -independent pathways determine developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome. *Dev. Cell* 23, 265–279.

Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell.* 2012 Jan 17;22(1):38-51.

Gerevini S, Scarlato M, Maggi L, Cava M, Caliendo G, Pasanisi B, Falini A, Previtali SC, Morandi L. Muscle MRI findings in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Eur Radiol.* 2016 Mar;26(3):693-705.

- Ghirlando R, Felsenfeld G. CTCF: making the right connections. *Genes Dev.* 2016 Apr 15;30(8):881-91.
- Giacomucci G, Monforte M, Diaz-Manera J, Mul K, Fernandez Torrón R, Maggi L, CM Bettolo, Dahlqvist JR, Haberlova J, **Camaño P**, Gros M, Tartaglione T, Cristiano L, Gerevini S, Calandra P, Deidda G, Giardina E, Sacconi S, Straub V, Vissing J, Van Engelen B, Ricci E, Tasca G. Deep phenotyping investigation of FSHD2 by MRI: refining the FSHD-related disease spectrum. *Eur J Neurol.* 2020 Dec;27(12):2604-2615.
- Giesige CR, Wallace LM, Heller KN, Eidahl JO, Saad NY, Fowler AM, Pyne NK, Al-Kharsan M, Rashnonejad A, Chermahini GA, Domire JS, Mukweyi D, Garwick-Coppens SE, Guckes SM, McLaughlin KJ, Meyer K, Rodino-Klapac LR, Harper SQ. AAV-mediated follistatin gene therapy improves functional outcomes in the TIC-DUX4 mouse model of FSHD. *JCI Insight.* 2018 Nov 15;3(22):e123538.
- Gilbert JR, Stajich JM, Speer MC, Vance JM, Stewart CS, Yamaoka LH, Samson F, Fardeau M, Potter TG, Roses AD, et al. Linkage studies in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Am J Hum Genet.* 1992 Aug;51(2):424-7.
- Gilbert JR, Stajich JM, Wall S, Carter SC, Qiu H, Vance JM, Stewart CS, Speer MC, Pufky J, Yamaoka LH, Rozear M, Samson F, Fardeau M, Roses AD, Pericak-Vance MA. Evidence for heterogeneity in facioscapulohumeral muscular-dystrophy (DFEH). *Am J Hum Genet.* 1993;53:401-408.
- Gilbert JR, Speer MC, Stajich J, Clancy R, Lewis K, Qiu H, Yamaoka L, Kumar A, Vance J, Stewart C, Rozear M, Roses AD, Pericak-Vance MA. Exclusion mapping of chromosomal regions which cross hybridize to FSHD1A associated markers in FSHD1B. *J Med Genet* 1995 Oct;32(10):770-73.
- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 2013 Jul 18;154(2):442-51.
- Gordon,C.T., Xue,S., Yigit,G., Filali,H., Chen,K., Rosin,N., Yoshiura,K.I., Oufadem,M., Beck,T.J., McGowan,R. *et al.* (2017) De novo mutations in SMCHD1 cause Bosma arhinia microphthalmia syndrome and abrogate nasal development. *Nat. Genet.*, 49, 249–255.
- Goselink RJM, van Kernebeek CR, Mul K, et al. A 22-year follow-up reveals a variable disease severity in early-onset facioscapulohumeral dystrophy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2018;22:782-785.
- Goto K, Lee JH, Matsuda C, Hirabayashi K, Kojo T, Nakamura A, Mitsunaga Y, Furukawa T, Sahashi K, Arahata K. DNA rearrangements in Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients: clinical correlations. *Neuromuscul Disord.* 1995 May;5(3):201-8.
- Gueneau L, Bertrand AT, Jais JP, et al. Mutations of the FHL1 gene cause Emery–Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2009;85(3):338–53.

BIBLIOGRAFÍA

Gurzau,A.D., Chen,K., Xue,S., Dai,W., Lucet,I.S., Ly,T.T.N., Reversade,B., Blewitt,M.E. and Murphy,J.M. (2018) FSHD2- and BAMS-associated mutations confer opposing effects on SMCHD1 function. *J. Biol. Chem.*, 293, 9841–9853.

Guyant-Maréchal L, Laquerrière A, Duyckaerts C, Dumanchin C, Bou J, Dugny F, Le Ber I, Frébourg T, Hannequin D, Campion D. Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features. *Neurology*. 2006 Aug 22;67(4):644-51.

Hamanaka K, Goto K, Arai M, et al. Clinical, muscle pathological, and genetic features of Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 (FSHD2) patients with SMCHD1 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(4–5):300-308.

Hamanaka K, Šikrová D, Mitsushashi S, Masuda H, Sekiguchi Y, Sugiyama A, Shibuya K, Lemmers RJLF, Goossens R, Ogawa M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Kuwabara S, Balog J, Nishino I, van der Maarel SM. Homozygous nonsense variant in *LRIF1* associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 2020 Jun 9;94(23):e2441-e2447.

Hamel J, Tawil R. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Update on Pathogenesis and Future Treatments. *Neurotherapeutics*. 2018 Oct;15(4):863-871.

Hamel J, Johnson N, Tawil R, Martens WB, Dilek N, McDermott MP, Heatwole C. Patient-Reported Symptoms in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (PRISM-FSHD). *Neurology*. 2019 Sep 17;93(12):e1180-e1192.

Hamel J, Tawil R. Case Studies on the Genetic and Clinical Diagnosis of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Neurol Clin*. 2020 Aug;38(3):529-540.

Hamilton CB, Chesworth BM. A Rasch-validated version of the upper extremity functional index for interval-level measurement of upper extremity function. *Phys Ther*. 2013 Nov;93(11):1507-19.

Han JJ, Kurillo G, Abresch RT, Nicorici A, Bajcsy R. Validity, Reliability, and Sensitivity of a 3D Vision Sensor-based Upper Extremity Reachable Workspace Evaluation in Neuromuscular Diseases. *PLoS Curr*. 2013 Dec 12;5:ecurrents.md.f63ae7dde63caa718fa0770217c5a0e6.

Han JJ, De Bie E, Nicorici A, Abresch RT, Bajcsy R, Kurillo G. Reachable workspace reflects dynamometer-measured upper extremity strength in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2015 Dec;52(6):948-55.

Hanson PA, Rowland LP. Möbius syndrome and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Arch Neurol*. 1971 Jan;24(1):31-9.

Hartweck LM, Anderson LJ, Lemmers RJ, Dandapat A, Toso EA, Dalton JC, Tawil R, Day JW, van der Maarel SM, Kyba M. A focal domain of extreme demethylation within D4Z4 in FSHD2. *Neurology*. 2013 Jan 22;80(4):392-9.

Haubenberger D, Bittner RE, Rauch-Shorny S, Zimprich F, Mannhalter C, Wagner L, Mineva I, Vass K, Auff E, Zimprich A. Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene. *Neurology*. 2005 Oct 25;65(8):1304-5.

Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, Stajich JM, Gaskell PC, Gilbert JR, Vance JM, Pericak-Vance MA, Carpen O, Westbrook CA, Speer MC. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet*. 2000 Sep 1;9(14):2141-7.

Hendrickson PG, Doráis JA, Grow EJ, Whiddon JL, Lim JW, Wike CL, Weaver BD, Pflueger C, Emery BR, Wilcox AL, Nix DA, Peterson CM, Tapscott SJ, Carrell DT, Cairns BR. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons. *Nat Genet*. 2017 Jun;49(6):925-934.

Hewitt JE, Lyle R, Clark LN, Valleley EM, Wright TJ, Wijmenga C, van Deutekom JC, Francis F, Sharpe PT, Hofker M, et al. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 1994 Aug;3(8):1287-95.

Himeda CL, Debarnot C, Homma S, Beermann ML, Miller JB, Jones PL, Jones TI. Myogenic enhancers regulate expression of the facioscapulohumeral muscular dystrophy-associated DUX4 gene. *Mol Cell Biol*. 2014 Jun;34(11):1942-55.

Himeda CL, Jones TI, Jones PL. CRISPR/dCas9-mediated Transcriptional Inhibition Ameliorates the Epigenetic Dysregulation at D4Z4 and Represses DUX4-fl in FSH Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. 2016 Mar;24(3):527-35.

Himeda CL, Jones TI, Virbasius CM, Zhu LJ, Green MR, Jones PL. Identification of Epigenetic Regulators of DUX4-fl for Targeted Therapy of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1797-1807.

Himeda CL, Jones PL. The Genetics and Epigenetics of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2019 Aug 31;20:265-291.

Homma S, Beermann ML, Boyce FM, Miller JB. Expression of FSHD-related DUX4-FL alters proteostasis and induces TDP-43 aggregation. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Feb;2(2):151-66.

BIBLIOGRAFÍA

Huichalaf, C.; Micheloni, S.; Ferri, G.; Caccia, R.; Gabellini, D. DNA methylation analysis of the macrosatellite repeat associated with FSHD muscular dystrophy at single nucleotide level. *PLoS ONE*. 2014, 9, e115278.

Iqbal I. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Pak Med Assoc*. 1992 Aug;42(8):199-201.

Isozumi K, DeLong R, Kaplan J, Deng HX, Iqbal Z, Hung WY, Wilhelmssen KC, Hentati A, Pericak-Vance MA, Siddique T. Linkage of scapuloperoneal spinal muscular atrophy to chromosome 12q24.1-q24.31. *Hum Mol Genet*. 1996 Sep;5(9):1377-82.

Jardine PE, Koch MC, Lunt PW, Maynard J, Bathke KD, Harper PS, Upadhyaya M. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy defined by DNA probe p13E-11 (D4F104S1). *Arch Dis Child*. 1994 Sep;71(3):221-7.

Jensen MP, Hoffman AJ, Stoelb BL, Abresch RT, Carter GT, McDonald CM. Chronic pain in persons with myotonic dystrophy and facioscapulohumeral dystrophy. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008 Feb;89(2):320-8.

Jiang G, Yang F, van Overveld PG, Vedanarayanan V, van der Maarel S, Ehrlich M. Testing the position-effect variegation hypothesis for facioscapulohumeral muscular dystrophy by analysis of histone modification and gene expression in subtelomeric 4q. *Hum Mol Genet*. 2003 Nov 15;12(22):2909-21.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):683-92.

Jones TI, King OD, Himeda CL, et al. Individual epigenetic status of the pathogenic D4Z4 macrosatellite correlates with disease in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Clin Epigenetics*. 2015;7:37.

Johnson NE, Quinn C, Eastwood E, Tawil R, Heatwole CR. Patient-identified disease burden in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2012 Dec;46(6):951-3.

Kaeser HE. Scapuloperoneal muscular atrophy. *Brain*. 1965 Jun;88(2):407-18.

Kazakov VM, Bogorodinsky DK, Skorometz AA. Myogenic scapuloperoneal syndrome - muscular dystrophy in the K. kindred. Reexamination of the K. family described for the first time by Oransky in 1927. *Eur Neurol*. 1975;13(4):350-9.

Kissel, J. T., McDermott, M. P., Mendell, J. R., King, W. M., Pandya, S., Griggs, R. C., Tawil, R., and Group, F.-D. (2001) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* 57, 1434-1440.

Knopp P, Krom YD, Banerji CR, Panamarova M, Moyle LA, et al. 2016. DUX4 induces a transcriptome more characteristic of a less-differentiated cell state and inhibits myogenesis. *J. Cell Sci*. 129:3816–31.

Klingler C, Ashley J, Shi K, Stiefvater A, Kyba M, Sinnreich M, Aihara H, Kinter J. DNA aptamers against the DUX4 protein reveal novel therapeutic implications for FSHD. *FASEB J*. 2020 Mar;34(3):4573-4590.

Klooster R, Straasheijm K, Shah B, Sowden J, Frants R, Thornton C, Tawil R, van der Maarel S. Comprehensive expression analysis of FSHD candidate genes at the mRNA and protein level. *Eur J Hum Genet*. 2009 Dec;17(12):1615-24.

Kondo T, Bobek MP, Kuick R, et al. Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum Mol Genet*. 2000;9:597-604.

Kovach MJ, Waggoner B, Leal SM, Gelber D, Khardori R, Levenstien MA, Shanks CA, Gregg G, Al-Lozi MT, Miller T, Rakowicz W, Lopate G, Florence J, Glosser G, Simmons Z, Morris JC, Whyte MP, Pestronk A, Kimonis VE. Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia. *Mol Genet Metab*. 2001 Dec;74(4):458-75.

Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Mattéotti C, Arias C, Corona ED, Nuñez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Rosa AL. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*. 2007 Aug;17(8):611-23.

Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Jun;14(3):286-98. Review.

Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 2003 Jun 1;116(Pt 11):2117-24.

Laforêt P, de Toma C, Eymard B, Becane HM, Jeanpierre M, Fardeau M, Duboc D. Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 1998 Nov;51(5):1454-6.

Lamperti C, Fabbri G, Vercelli L, D'Amico R, Frusciante R, Bonifazi E, Fiorillo C, Borsato C, Cao M, Servida M, Greco F, Di Leo R, Volpi L, Manzoli C, Cudia P, Pastorello E, Ricciardi L, Siciliano G, Galluzzi G, Rodolico C, Santoro L, Tomelleri G, Angelini C, Ricci E, Palmucci L, Moggio M, Tupler R. A standardized clinical evaluation of patients affected by facioscapulohumeral muscular dystrophy: The FSHD clinical score. *Muscle Nerve*. 2010 Aug;42(2):213-7.

Larsen M, Rost S, El Hajj N, Ferbert A, Deschauer M, Walter MC, Schoser B, Tacik P, Kress W, Müller CR. Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1. *Eur J Hum Genet*. 2015 Jun;23(6):808-16.

Le Ber I, Martinez M, Champion D, Laquerrière A, Bétard C, Bassez G, Girard C, Saugier-Veber P, Raux G, Sergeant N, Magnier P, Maisonobe T, Eymard B, Duyckaerts C, Delacourte A, Frebourg T, Hannequin D. A

BIBLIOGRAFÍA

non-DM1, non-DM2 multisystem myotonic disorder with frontotemporal dementia: phenotype and suggestive mapping of the DM3 locus to chromosome 15q21-24. *Brain*. 2004 Sep;127(Pt 9):1979-92.

Le Gall L, Sidlauskaitė E, Mariot V, Dumonceaux J. Therapeutic Strategies Targeting DUX4 in FSHD. *J Clin Med*. 2020 Sep 7;9(9):2886.

Lee JH, Goto K, Matsuda C, Arahata K. Characterization of a tandemly repeated 3.3-kb KpnI unit in the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) gene region on chromosome 4q35. *Muscle Nerve*. 1995;2:S6-13.

Lemmers RJ, van der Maarel SM, van Deutekom JC, van der Wielen MJ, Deidda G, Dauwerse HG, Hewitt J, Hofker M, Bakker E, Padberg GW, Frants RR. Inter- and intrachromosomal sub-telomeric rearrangements on 4q35: implications for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) aetiology and diagnosis. *Hum Mol Genet*. 1998 Aug;7(8):1207-14.

Lemmers RJL, de Kievit P, van Geel M, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Complete allele information in the diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by triple DNA analysis. *Ann Neurol*. 2001 Dec;50(6):816-9.

Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet*. 2002 Oct;32(2):235-6.

Lemmers RJ, Osborn M, Haaf T, Rogers M, Frants RR, Padberg GW, Cooper DN, van der Maarel SM, Upadhyaya M. D4F104S1 deletion in facioscapulohumeral muscular dystrophy: phenotype, size, and detection. *Neurology*. 2003 Jul 22;61(2):178-83.

Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Somatic mosaicism in DFEH often goes undetected. *Ann Neurol*. 2004 Jun;55(6):845-50.

Lemmers RJ, Van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2004 Jul;75(1):44-53.

Lemmers RJ, Wohlgemuth M, van der Gaag KJ, van der Vliet PJ, van Teijlingen CM, de Knijff P, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2007 Nov;81(5):884-94.

Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, **Camaño P**, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R, Frants RR, van der Maarel SM. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science*. 2010 Sep 24;329(5999):1650-3.

Lemmers RJ, van der Vliet PJ, van der Gaag KJ, Zuniga S, Frants RR, de Knijff P, van der Maarel SM. Worldwide population analysis of the 4q and 10q subtelomeres identifies only four discrete interchromosomal sequence transfers in human evolution. *Am J Hum Genet.* 2010 Mar 12;86(3):364-77.

Lemmers RJ, O'Shea S, Padberg GW, Lunt PW, van der Maarel SM. Best practice guidelines on genetic diagnostics of Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Workshop 9th June 2010, LUMC, Leiden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2012 May;22(5):463-70.

Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, Sun Y, den Dunnen JT, Helmer Q, Donlin-Smith CM, Padberg GW, van Engelen BG, de Greef JC, Aartsma-Rus AM, Frants RR, de Visser M, Desnuelle C, Sacconi S, Filippova GN, Bakker B, Bamshad MJ, Tapscott SJ, Miller DG, van der Maarel SM. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12):1370-4.

Lemmers RJ, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, **Camano P**, Ramos Arroyo MA, Jerico I, Rogers MT, et al. Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2. *Hum Mol Genet.* 2015;24(3):659–69.

Lemmers R.J., van den Boogaard, M.L., van der Vliet, P.J., Donlin-Smith, C.M., Nations, S.P., Ruivenkamp, C.A., Heard, P., Bakker, B., Tapscott, S., Cody, J.D. et al. Hemizygoty for SMCHD1 in facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2: consequences for 18p deletion syndrome. *Hum. Mutat.* 2015; 36, 679–683.

Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Balog J, et al. Deep characterization of a common D4Z4 variant identifies biallelic DUX4 expression as a modifier for disease penetrance in FSHD2. *Eur J Hum Genet.* 2018; 26(1):94-106.

Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Vreijling JP, et al. Cis D4Z4 repeat duplications associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Hum Mol Genet.* 2018;27(20):3488-3497.

Lim JW, Snider L, Yao Z, Tawil R, Van Der Maarel SM, Rigo F, Bennett CF, Filippova GN, Tapscott SJ. DICER/AGO-dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD. *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1;24(17):4817-28.

Lim KRQ, Maruyama R, Echigoya Y, Nguyen Q, Zhang A, Khawaja H, Sen Chandra S, Jones T, Jones P, Chen YW, Yokota T. Inhibition of DUX4 expression with antisense LNA gapmers as a therapy for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jul 14;117(28):16509-16515.

Lunt PW, Compston DA, Harper PS. Estimation of age dependent penetrance in facioscapulohumeral muscular dystrophy by minimising ascertainment bias. *J Med Genet.* 1989 Dec;26(12):755-60.

BIBLIOGRAFÍA

Lunt PW, Harper PS. Genetic counselling in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Med Genet.* 1991 Oct;28(10):655-64.

Lunt PW, Jardine PE, Koch MC, Maynard J, Osborn M, Williams M, Harper PS, Upadhyaya M. Correlation between fragment size at D4F104S1 and age at onset or at wheelchair use, with a possible generational effect, accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Hum Mol Genet.* 1995 May;4(5):951-8. Erratum in: *Hum Mol Genet* 1995 Jul;4(7):1243-4.

Lunt PW, Jardine PE, Koch M, Maynard J, Osborn M, Williams M, Harper PS, Upadhyaya M. Phenotypic-genotypic correlation will assist genetic counseling in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 1995;2:S103-9.

Lunt PW. 44th ENMC International Workshop: Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Molecular Studies 19-21 July 1996, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 1998 Apr;8(2):126-30.

Lunt PW. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Diagnostic and Molecular Aspects. In: Deymeer, F (ed). *Neuromuscular diseases: from basic mechanisms to clinical management. Monographs in Clinical Neuroscience.* Basel: Karger, 2000 Vol. 18:44-60.

Lyle R, Wright TJ, Clark LN, Hewitt JE. The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. *Genomics* 1995 Aug 10;28(3):389-97.

Marsollier AC, Ciszewski L, Mariot V, Popplewell L, Voit T, Dickson G, Dumonceaux J. Antisense targeting of 3' end elements involved in DUX4 mRNA processing is an efficient therapeutic strategy for facioscapulohumeral dystrophy: a new gene-silencing approach. *Hum Mol Genet.* 2016 Apr 15;25(8):1468-78.

Masny PS, Bengtsson U, Chung SA, Martin JH, van Engelen B, van der Maarel SM, Winokur ST. Localization of 4q35.2 to the nuclear periphery: is FSHD a nuclear envelope disease?. *Hum Mol Genet.* 2004 Sep 1;13(17):1857-71.

Masuzugawa S, Kuzuhara S, Narita Y, Naito Y, Taniguchi A, Ibi T. Autosomal dominant hyaline body myopathy presenting as scapulooperoneal syndrome: clinical features and muscle pathology. *Neurology.* 1997 Jan;48(1):253-7.

Mathews KD, Mills KA, Bosch EP, Ionasescu VV, Wiles KR, Buetow KH, Murray JC. Linkage localization of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) in 4q35. *Am J Hum Genet.* 1992 Aug;51(2):428-31.

- Matsumura T, Goto K, Yamanaka G, Lee JH, Zhang C, Hayashi YK, Arahata K. Chromosome 4q;10q translocations; comparison with different ethnic populations and FSHD patients. *BMC Neurol*. 2002 Aug 20;2:7.
- McBride TI. Paget's disease and muscular dystrophy. Report of an unusual association in one family. *Scott Med J*. 1966 Jul;11(7):238-43.
- Mikol J. The identification of Landouzy-Dejerine disease: an investigative history. *Neuromuscul Disord*. 2011 Apr;21(4):291-7.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
- Mitsuhashi H, Mitsuhashi S, Lynn-Jones T, Kawahara G, Kunkel LM. Expression of DUX4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2013 Feb 1;22(3):568-77.
- Mitsuhashi H, Ishimaru S, Homma S, Yu B, Honma Y, Beermann ML, Miller JB. Functional domains of the FSHD-associated DUX4 protein. *Biol Open*. 2018 Apr 26;7(4):bio033977.
- Moreira S, Wood L, Smith D, Marini-Bettolo C, Guglieri M, McMacken G, et al. Respiratory involvement in ambulant and non- ambulant patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Neurol* 2017;264:1271–80.
- Moser H, Wiesmann U, Richterich R, Rossi E. [Progressive muscle dystrophy. 8. Occurrence, clinical aspects and genetics of types I and II]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1966 Feb 12;96(6):169-74 contd. Review. German.
- Mostacciolo ML, Pastorello E, Vazza G, Miorin M, Angelini C, Tomelleri G, Galluzzi G, Trevisan CP. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample. *Clin Genet*. 2009 Jun;75(6):550-5.
- Morton NE, Chung CS. Are the MN blood group maintained by selection? *Am J Hum Genet*. 1959 Sep;11:237-51.
- Mul K, Lassche S, Voermans NC, Padberg GW, Horlings CG, van Engelen BG. What's in a name? The clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Pract Neurol*. 2016 Jun;16(3):201-7.
- Mul K, Vincenten SCC, Voermans NC, et al. Adding quantitative muscle MRI to the FSHD clinical trial toolbox. *Neurology*. 2017;89(20):2057–2065.

BIBLIOGRAFÍA

Mul K, Heatwole C, Eichinger K, Dilek N, Martens WB, Van Engelen BGM, Tawil R, Statland JM. Electrical impedance myography in facioscapulohumeral muscular dystrophy: A 1-year follow-up study. *Muscle Nerve*. 2018 Aug;58(2):213-218.

Neto JL, Lee JM, Afridi A, Gillis T, Guide JR, Dempsey S, Lager B, Alonso I, Wheeler VC, Pinto RM. Genetic Contributors to Intergenerational CAG Repeat Instability in Huntington's Disease Knock-In Mice. *Genetics*. 2017 Feb;205(2):503-516.

Nguyen K, Walrafen P, Bernard R, Attarian S, Chaix C, Vovan C, Renard E, Dufrane N, Pouget J, Vannier A, Bensimon A, Lévy N. Molecular combing reveals allelic combinations in facioscapulohumeral dystrophy. *Ann Neurol*. 2011 Oct;70(4):627-33.

Nguyen K, Puppo F, Roche S, et al. Molecular combing reveals complex 4q35 rearrangements in facioscapulohumeral dystrophy. *Hum Mutat*. 2017;38:1432-1441.

Nikolic A, Ricci G, Sera F, et al. Clinical expression of facioscapulohumeral muscular dystrophy in carriers of 1-3 D4Z4 reduced alleles: experience of the FSHD Italian National Registry. *BMJ Open*. 2016;6(1):e007798.

Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*. 2009 Nov;132(Pt 11):3175-86.

Oliva, J.; Galasinski, S.; Richey, A.; Campbell, A.E.; Meyers, M.J.; Modi, N.; Zhong, J.W.; Tawil, R.; Tapscott, S.J.; Sverdrup, F.M. Clinically Advanced p38 Inhibitors Suppress DUX4 Expression in Cellular and Animal Models of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 2019, 370, 219–230.

Orrell RW. Facioscapulohumeral dystrophy and scapuloperoneal syndromes. *Handb Clin Neurol*. 2011;101:167-80.

Ottaviani A, Rival-Gervier S, Boussouar A, Foerster AM, Rondier D, Sacconi S, Desnuelle C, Gilson E, Magdinier F. The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in facio-scapulo-humeral dystrophy. *PLoS Genet*. 2009 Feb;5(2):e1000394.

Ottaviani A, Schluth-Bolard C, Gilson E, Magdinier F. D4Z4 as a prototype of CTCF and lamins-dependent insulator in human cells. *Nucleus*. 2010 Jan-Feb;1(1):30-6.

Padberg GW. (1982) Facioscapulohumeral Disease. *Thesis*, Leiden University.

Padberg GW (1998). Facioscapulohumeral muscular dystrophy. In: Emery, A.E.H (ed.) *Neuromuscular Disorders. Clinical and Molecular Genetics*, pp. 105-121. Wiley, Chichester, UK.

Padberg GW, Brouwer OF, de Keizer RJ, Dijkman G, Wijmenga C, Grote JJ, Frants RR. On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 1995;2:S73-80.

Padberg GW, Frants RR, Brouwer OF, Wijmenga C, Bakker E, Sandkuijl LA. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in the Dutch population. *Muscle Nerve*. 1995;2:S81-4.

Pandya S, King WM, Tawil R. Facioscapulohumeral dystrophy. *Phys Ther*. 2008 Jan;88(1):105-13.

Payan, C. A., Hogrel, J. Y., Hammouda, E. H., Lacomblez, L., Ollivier, G., Doppler, V., Eymard, B., Attarian, S., Pouget, J., Desnuelle, C., and Laforet, P. (2009) Periodic salbutamol in facioscapulohumeral muscular dystrophy: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil* 90, 1094-1101.

Personius KE, Pandya S, King WM, Tawil R, McDermott MP. Facioscapulohumeral dystrophy natural history study: standardization of testing procedures and reliability of measurements. The FSH DY Group. *Phys Ther*. 1994 Mar;74(3):253-63.

Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):R546-51

Petrov A, Pirozhkova I, Carnac G, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS. Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):6982-7.

Petrov A, Allinne J, Pirozhkova I, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS. A nuclear matrix attachment site in the 4q35 locus has an enhancer-blocking activity in vivo: implications for the facio-scapulo-humeral dystrophy. *Genome Res*. 2008 Jan;18(1):39-45.

Peyer AK, Kinter J, Hench J, Frank S, Fuhr P, Thomann S, Fischmann A, Kneifel S, **Camaño P**, Munain AL, Sinnreich M, Renaud S. Novel valosin containing protein mutation in a Swiss family with hereditary inclusion body myopathy and dementia. *Neuromuscul Disord*. 2013 Feb;23(2):149-54.

Pietro Trevisan C, Pastorello E, Armani M, Angelini C, Nante G, Tomelleri G, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and occurrence of heart arrhythmia. *Eur Neurol* 2006;56:1-5.

Pirozhkova I, Petrov A, Dmitriev P, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky Y. A functional role for 4qA/B in the structural rearrangement of the 4q35 region and in the regulation of FRG1 and ANT1 in facioscapulohumeral dystrophy. *PLoS One*. 2008;3(10):e3389.

Pratte A, Prévost C, Puymirat J, Mathieu J. Anticipation in myotonic dystrophy type 1 parents with small CTG expansions. *Am J Med Genet A*. 2015 Apr;167A(4):708-14.

BIBLIOGRAFÍA

Quinzii CM, Vu TH, Min KC, et al. X-linked dominant scapulo-peroneal myopathy is due to a mutation in the gene encoding fourand- a-half-LIM protein 1. *Am J Hum Genet* 2008;82(1):208–13.

Reed PW, Corse AM, Porter NC, Flanigan KM, Bloch RJ. Abnormal expression of mu-crystallin in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Exp Neurol*. 2007 Jun;205(2):583-6.

Renard D, Taieb G, Garibaldi M, et al. Inflammatory facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 in 18p deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176:1760-1763.

Ricci E, Galluzzi G, Deidda G, Cacurri S, Colantoni L, Merico B, Piazzo N, Servidei S, Vigneti E, Pasceri V, Silvestri G, Mirabella M, Mangiola F, Tonali P, Felicetti L. Progress in the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy and correlation between the number of KpnI repeats at the 4q35 locus and clinical phenotype. *Ann Neurol*. 1999 Jun;45(6):751-7.

Ricci G, Scionti I, Sera F, et al. Large scale genotype-phenotype analyses indicate that novel prognostic tools are required for families with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Brain*. 2013;136(Pt 11):3408-3417.

Ricci G, Zatz M, Tupler R. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: More Complex than it Appears. *Curr Mol Med*. 2014;14(8):1052-1068.

Richards M, Coppée F, Thomas N, Belayew A, Upadhyaya M. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? *Hum Genet*. 2012 Mar;131(3):325-40.

Rickard AM, Petek LM, Miller DG. Endogenous DUX4 expression in FSHD myotubes is sufficient to cause cell death and disrupts RNA splicing and cell migration pathways. *Hum Mol Genet*. 2015 Oct 15;24(20):5901-14.

Ruggiero L, Mele F, Manganelli F, Bruzzese D, Ricci G, Vercelli L, Govi M, Vallarola A, Tripodi S, Villa L, Di Muzio A, Scarlato M, Bucci E, Antonini G, Maggi L, Rodolico C, Tomelleri G, Filosto M, Previtali S, Angelini C, Berardinelli A, Pegoraro E, Moggio M, Mongini T, Siciliano G, Santoro L, Tupler R. Phenotypic Variability Among Patients With D4Z4 Reduced Allele Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *JAMA Netw Open*. 2020 May 1;3(5):e204040.

Sacconi S, **Camaño P**, de Greef JC, Lemmers RJ, Salviati L, Boileau P, Lopez de Munain Arregui A, van der Maarel SM, Desnuelle C. Patients with a phenotype consistent with facioscapulohumeral muscular dystrophy display genetic and epigenetic heterogeneity. *J Med Genet*. 2012 Jan;49(1):41-6.

Sacconi S, Lemmers RJ, Balog J, van der Vliet PJ, Lahaut P, van Nieuwenhuizen MP, Straasheijm KR, Debipersad RD, Vos-Versteeg M, Salviati L, et al. The FSHD2 gene SMCHD1 is a modifier of disease severity in families affected by FSHD1. *Am J Hum Genet*. 2013;93(4):744–51.

- Sacconi S, Briand-Suleau A, Gros M, et al. FSHD1 and FSHD2 form a disease continuum. *Neurology*. 2019;92:e2273-e2285.
- Saito Y, Miyashita S, Yokoyama A, Komaki H, Seki A, Maegaki Y, Ohno K. Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain Dev*. 2007 May;29(4):231-3.
- Salsi V, Magdinier F, Tupler R. Does DNA Methylation Matter in FSHD?. *Genes (Basel)*. 2020 Feb 28;11(3):258.
- Sarfarazi M, Wijmenga C, Upadhyaya M, Weiffenbach B, Hyser C, Mathews K, Murray J, Gilbert J, Pericak-Vance M, Lunt P, et al. Regional mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on 4q35: combined analysis of an international consortium. *Am J Hum Genet*. 1992 Aug;51(2):396-403.
- Sarraf SA, Stancheva I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell*. 2004 Aug 27;15(4):595-605.
- Schessl J, Zou Y, McGrath MJ, et al. Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy. *J Clin Invest*. 2008;118(3):904–12.
- Schessl J, Taratuto AL, Sewry C, et al. Clinical, histological and genetic characterization of reducing body myopathy caused by mutations in FHL1. *Brain*. 2009;132(Pt. 2):452–64.
- Schessl J, Columbus A, Hu Y, et al. Familial reducing body myopathy with cytoplasmic bodies and rigid spine revisited: identification of a second LIM domain mutation in FHL1. *Neuropediatrics*. 2010;41(1):43–6.
- Scionti I, Greco F, Ricci G, et al. Large-scale population analysis challenges the current criteria for the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):628-635.
- Scionti, I., Fabbri, G., Fiorillo, C., Ricci, G., Greco, F., D'Amico, R., Termanini, A., Vercelli, L., Tomelleri, G., Cao, M., et al. (2012). Facioscapulohumeral muscular dystrophy: new insights from compound heterozygotes and implication for prenatal genetic counselling. *J. Med. Genet*. 49, 171–178.
- Shalaby S, Hayashi YK, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I. Novel FHL1 mutations in fatal and benign reducing body myopathy. *Neurology* 2009;72(4):375–6.
- Sharma, V.; Pandey, S.N.; Khawaja, H.; Brown, K.J.; Hathout, Y.; Chen, Y.W. PARP1 Differentially Interacts with Promoter region of DUX4 Gene in FSHD Myoblasts. *J. Genet. Syndr. Gene Ther*. 2016, 7.
- Shadle SC, Zhong JW, Campbell AE, Conerly ML, Jagannathan S, et al. DUX4-induced dsRNA and MYC mRNA stabilization activate apoptotic pathways in human cell models of facioscapulohumeral dystrophy. *PLOS Genet*. 2017; 13:e1006658

BIBLIOGRAFÍA

Shaw,N.D., Brand,H., Kupchinsky,Z.A., Bengani,H., Plummer,L., Jones,T.I., Erdin,S., Williamson,K.A., Rainger,J., Stortchevoi,A. *et al.* SMCHD1 mutations associated with a rare muscular dystrophy can also cause isolated arhinia and Bosma arhinia microphthalmia syndrome. *Nat. Genet.*, 2017;49, 238–248.

Sidlauskaite E, Le Gall L, Mariot V, Dumonceaux J. *DUX4* Expression in FSHD Muscles: Focus on Its mRNA Regulation. *J Pers Med.* 2020 Jul 28;10(3):73.

Sistiaga A, **Camaño P**, Otaegui D, Ibáñez B, Ruiz-Martinez J, Martí-Massó JF, López de Munain A. Cognitive function in facioscapulohumeral dystrophy correlates with the molecular defect. *Genes Brain Behav.* 2009 Feb;8(1):53-9.

Small RG. Coats' disease and muscular dystrophy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1968 Mar-Apr;72(2):225-31.

Snider L, Asawachaicharn A, Tyler AE, Geng LN, Petek LM, Maves L, Miller DG, Lemmers RJ, Winokur ST, Tawil R, van der Maarel SM, Filippova GN, Tapscott SJ. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 1;18(13):2414-30.

Snider L, Geng LN, Lemmers RJ, Kyba M, Ware CB, Nelson AM, Tawil R, Filippova GN, van der Maarel SM, Tapscott SJ, Miller DG. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS Genet.* 2010 Oct 28;6(10):e1001181.

Speer MC, Pericak-Vance MA, Stajich JM, Sarrica J, Jordan M, Roses AD, Vance JM, Gilbert JR. Further exclusion of FSHD1B from the telomeric region of 10q. *Neurogenetics.* 1997 Sep;1(2):151-2.

Stadler, G.; Rahimov, F.; King, O.D.; Chen, J.C.; Robin, J.D.; Wagner, K.R.; Shay, J.W.; Emerson, C.P., Jr.; Wright,W.E. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013, 20, 671–678.

Stadler, G.; King, O.D.; Robin, J.D.; Shay, J.W.; Wright, W.E. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Are telomeres the end of the story? *Rare Dis.* 2013, 1, e26142.

Statland JM, Sacconi S, Farmakidis C, Donlin-Smith CM, Chung M, Tawil R.Statland JM, et al. Coats syndrome in facioscapulohumeral dystrophy type 1: frequency and D4Z4 contraction size. *Neurology.* 2013 Mar 26;80(13):1247-50.

Statland JM, Shah B, Henderson D, Van Der Maarel S, Tapscott SJ, Tawil R. Muscle pathology grade for facioscapulohumeral muscular dystrophy biopsies. *Muscle Nerve.* 2015 Oct;52(4):521-6.

Statland JM, Donlin-Smith CM, Tapscott SJ, Lemmers RJ, van der Maarel SM, Tawil R. Milder phenotype in facioscapulohumeral dystrophy with 7-10 residual D4Z4 repeats. *Neurology*. 2015 Dec 15;85(24):2147-50.

Statland JM, Heatwole C, Eichinger K, Dilek N, Martens WB, Tawil R. Electrical impedance myography in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2016 Oct;54(4):696-701.

Stojkovic T, Hammouda el H, Richard P, López de Munain A, Ruiz-Martinez J, **Camaño P**, Laforêt P, Pénisson-Besnier I, Ferrer X, Lacour A, Lacomblez L, Claeys KG, Maurage CA, Fardeau M, Eymard B. Clinical outcome in 19 French and Spanish patients with valosin-containing protein myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia. *Neuromuscul Disord*. 2009 May;19(5):316-23.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.

Tasca G, Pescatori M, Monforte M, Mirabella M, Iannaccone E, Frusciante R, Cubeddu T, Laschena F, Ottaviani P, Ricci E. Different molecular signatures in magnetic resonance imaging-staged facioscapulohumeral muscular dystrophy muscles. *PLoS One*. 2012;7(6):e38779.

Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Vanderplanck C, Barro M, Charron S, Anseau E, Chen YW, Mercier J, Coppée F, Belayew A. DUX4 expression in FSHD muscle cells: how could such a rare protein cause a myopathy? *J Cell Mol Med*. 2013 Jan;17(1):76-89.

Tawil R, McDermott MP, Mendell JR, Kissel J, Griggs RC. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): design of natural history study and results of baseline testing. FSH-DY Group. *Neurology*. 1994 Mar;44(3 Pt 1):442-6.

Tawil R, Forrester J, Griggs RC, Mendell J, Kissel J, McDermott M, King W, Weiffenbach B, Figlewicz D. Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The FSH-DY Group. *Ann Neurol*. 1996 Jun;39(6):744-8.

Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skelet Muscle* 2014;4:12.

Tawil R, Kissel JT, Heatwole C, Pandya S, Gronseth G, Benatar M. Evidence-based guideline summary: Evaluation, diagnosis, and management of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 2015 Jul 28;85(4):357-64.

Tawil R, Padberg GW, Shaw DW, et al. Clinical trial preparedness in facioscapulohumeral muscular dystrophy: Clinical, tissue, and imaging outcome measures 29-30 May 2015, Rochester, New York. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(2):181-186.

BIBLIOGRAFÍA

Thomas NS, Wiseman K, Spurlock G, MacDonald M, Ustek D, Upadhyaya M. A large patient study confirming that facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) disease expression is almost exclusively associated with an FSHD locus located on a 4qA-defined 4qter subtelomere. *J Med Genet.* 2007 Mar;44(3):215-8.

Tim RW, Gilbert JR, Stajich JM, Rampersaud E, Viles KD, Tawil R, Padberg GW, Frants R, van der Maarel S, Bossen EH, Friedman AH, Pericak-Vance MA, Speer MC. Clinical Studies in Non-chromosome 4-Linked Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2001 Sep;3(1):1-7.

Tonini MM, Passos-Bueno MR, Cerqueira A, Matioli SR, pavanello R, Zatz M. Asymptomatic carriers and gender differences in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromusc Disord.* 2004; 14:33-38.

Tonini MM, Pavanello RC, Gurgel-Giannetti J, Lemmers RJ, van der Maarel SM, Frants RR, Zatz M. Homozygosity for autosomal dominant facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) does not result in a more severe phenotype. *J Med Genet.* 2004 Feb;41(2):e17.

Tsumagari K, Qi L, Jackson K, Shao C, Lacey M, Sowden J, Tawil R, Vedanarayanan V, Ehrlich M. Epigenetics of a tandem DNA repeat: chromatin DNaseI sensitivity and opposite methylation changes in cancers. *Nucleic Acids Res.* 2008 Apr;36(7):2196-207.

Tupler R, Berardinelli A, Barbierato L, Frants R, Hewitt JE, Lanzi G, Maraschio P, Tiepolo L. Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Med Genet.* 1996 May;33(5):366-70.

Tupler R, Perini G, Pellegrino MA, Green MR. Profound misregulation of muscle-specific gene expression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Oct 26;96(22):12650-4.

Upadhyaya M, Lunt PW, Sarfarazi M, Broadhead W, Daniels J, Owen M, Harper PS. DNA marker applicable to presymptomatic and prenatal diagnosis of facioscapulohumeral disease. *Lancet.* 1990 Nov 24;336(8726):1320-1.

Upadhyaya M, Lunt P, Sarfarazi M, Broadhead W, Farnham J, Harper PS. The mapping of chromosome 4q markers in relation to facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Am J Hum Genet.* 1992 Aug;51(2):404-10.

Upadhyaya M, Jardine P, Maynard J, Farnham J, Sarfarazi M, Wijmenga C, Hewitt JE, Frants RR, Harper PS, Lunt PW. Molecular analysis of British facioscapulohumeral dystrophy families for 4q DNA rearrangements. *Hum Mol Genet* 1993;2(7):981-87.

Upadhyaya M, Maynard J, Osborn M, Jardine P, Harper PS, Lunt P. Germinal mosaicism in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Muscle Nerve*. 1995;2:S45-9.

Upadhyaya M, Maynard J, Rogers MT, Lunt PW, Jardine P, Ravine D, Harper PS. Improved molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): validation of the differential double digestion for FSHD. *J Med Genet*. 1997 Jun;34(6):476-9.

Upadhyaya M, Cooper DN. Molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2002 Mar;2(2):160-71. Review.

van den Boogaard ML, Lemmers RJ, **Camaño P**, van der Vliet PJ, Voermans N, van Engelen BG, Lopez de Munain A, Tapscott SJ, van der Stoep N, Tawil R, van der Maarel SM. Double SMCHD1 variants in FSHD2: the synergistic effect of two SMCHD1 variants on D4Z4 hypomethylation and disease penetrance in FSHD2. *Eur J Hum Genet*. 2016 Jan;24(1):78-85.

van der Kooi, E. L., Vogels, O. J., van Asseldonk, R. J., Lindeman, E., Hendriks, J. C., Wohlgemuth, M., van der Maarel, S. M., and Padberg, G. W. (2004) Strength training and albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 63, 702-708

van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJ, Bakker E, van der Wielen MJ, Sandkuijl L, Hewitt JE, Padberg GW, Frants RR. A new dosage test for subtelomeric 4;10 translocations improves conventional diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet*. 1999 Nov;36(11):823-8.

van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJ, van Overveld PG, van der Wielen M, Hewitt JE, Sandkuijl L, Bakker B, van Ommen GJ, Padberg GW, Frants RR. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *Am J Hum Genet*. 2000 Jan;66(1):26-35.

van der Maarel SM, Frants RR. The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2005 Mar;76(3):375-8.

van Deutekom JC, Wijmenga C, van Tienhoven EA, Gruter AM, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Hum Mol Genet*. 1993 Dec;2(12):2037-42.

van Deutekom JC, Bakker E, Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bik E, Hofker MH, Padberg GW, Frants RR. Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counselling and etiology of FSHD1. *Hum Mol Genet*. 1996 Dec;5(12):1997-2003.

BIBLIOGRAFÍA

van Deutekom JC, Lemmers RJ, Grewal PK, van Geel M, Romberg S, Dauwerse HG, Wright TJ, Padberg GW, Hofker MH, Hewitt JE, Frants RR. Identification of the first gene (FRG1) from the FSHD region on human chromosome 4q35. *Hum Mol Genet.* 1996 May;5(5):581-90.

van Geel M, Heather LJ, Lyle R, Hewitt JE, Frants RR, de Jong PJ. The FSHD region on human chromosome 4q35 contains potential coding regions among pseudogenes and a high density of repeat elements. *Genomics.* 1999 Oct 1;61(1):55-65.

van Geel M, Dickson MC, Beck AF, Bolland DJ, Frants RR, van der Maarel SM, de Jong PJ, Hewitt JE. Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin. *Genomics.* 2002 Feb;79(2):210-7.

van Overveld PG, Lemmers RJ, Deidda G, Sandkuijl L, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Interchromosomal repeat array interactions between chromosomes 4 and 10: a model for subtelomeric plasticity. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 22;9(19):2879-84.

van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet.* 2003 Dec;35(4):315-7.

van Overveld PG, Enthoven L, Ricci E, Rossi M, Felicetti L, Jeanpierre M, Winokur ST, Frants RR, Padberg GW, van der Maarel SM. Variable hypomethylation of D4Z4 in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2005 Oct;58(4):569-76.

VanSwearingen JM, Brach JS. The Facial Disability Index: reliability and validity of a disability assessment instrument for disorders of the facial neuromuscular system. *Phys Ther.* 1996 Dec;76(12):1288-98; discussion 1298-300.

Vanderplanck C, Anseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Wilton SD, Coppée F, Belayew A. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PLoS One.* 2011;6(10):e26820.

Vuillerot C, Payan C, Girardot F, Fermanian J, Iwaz J, Bérard C, Ecochard R; MFM Study Group. Responsiveness of the motor function measure in neuromuscular diseases. *Arch Phys Med Rehabil.* 2012 Dec;93(12):2251-6.e1.

Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. *Ann Neurol.* 2011 Mar;69(3):540-52.

Wallace LM, Liu J, Domire JS, Garwick-Coppens SE, Guckes SM, Mendell JR, Flanigan KM, Harper SQ. RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity in vivo: implications for a targeted FSHD therapy. *Mol Ther*. 2012 Jul;20(7):1417-23.

Wang N, Wu ZY, Wang CD, Wang ZQ, Lin MT, Fang L, Murong SX. [Mechanism of translocation between chromosomes 4q and 10q in facioscapulohumeral muscular dystrophy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003 Apr 25;83(8):650-3.

Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):377-81.

Watts GD, Thomasova D, Ramdeen SK, Fulchiero EC, Mehta SG, Drachman DA, Weihl CC, Jamrozik Z, Kwiecinski H, Kaminska A, Kimonis VE. Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Clin Genet*. 2007 Nov;72(5):420-6.

Wijmenga C, Frants RR, Brouwer OF, Moerer P, Weber JL, Padberg GW. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet*. 1990 Sep 15;336(8716):651-3.

Wijmenga C, Padberg GW, Moerer P, Wiegant J, Liem L, Brouwer OF, Milner EC, Weber JL, van Ommen GB, Sandkuyl LA, et al. Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization. *Genomics*. 1991 Apr;9(4):570-5.

Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R, Van Ommen GJB, Padberg GW, Frants RR. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 1992 Sep;2(1):26-30.

Wijmenga C, Sandkuijl LA, Moerer P, van der Boorn N, Bodrug SE, Ray PN, Brouwer OF, Murray JC, van Ommen GJ, Padberg GW, et al. Genetic linkage map of facioscapulohumeral muscular dystrophy and five polymorphic loci on chromosome 4q35-qter. *Am J Hum Genet*. 1992 Aug;51(2):411-5.

Wijmenga C, Frants RR, Hewitt JE, van Deutekom JCT, van Geel M, Wright TJ, Padberg GW, Hofker MH, van Ommen GB. Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscular Disord* 1993;3(5-6):487-91.

Wijmenga C, van Deutekom JC, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR. Pulsed-field gel electrophoresis of the D4F104S1 locus reveals the size and the parental origin of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)-associated deletions. *Genomics*. 1994 Jan 1;19(1):21-6.

BIBLIOGRAFÍA

Wilhelmsen KC, Blake DM, Lynch T, Mabutas J, De Vera M, Neystat M, Bernstein M, Hirano M, Gilliam TC, Murphy PL, Sola MD, Bonilla E, Schotland DL, Hays AP, Rowland LP. Chromosome 12-linked autosomal dominant scapulooperoneal muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 1996 Apr;39(4):507-20.

Windpassinger C, Schoser B, Straub V, et al. is caused by mutations in FHL1. *Am J Hum Genet* 2008;82(1):88–99.

Winokur ST, Bengtsson U, Feddersen J, Mathews KD, Weiffenbach B, Bailey H, Markovich RP, Murray JC, Wasmuth JJ, Altherr MR, and Schutte BC. The DNA rearrangement associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy involves a heterochromatin-associated repetitive element: implications for a role of chromatin structure in the pathogenesis of the disease. *Chromosome Res*. 1994 May;2(3):225-34.

Winokur ST, Bengtsson U, Wasmuth JJ, Altherr MR. Mildly repetitive sequences closely linked to the facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on distal chromosome 4q cross hybridize to regions of heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* 1994;66(4):231.

Winokur ST, Barrett K, Martin JH, Forrester JR, Simon M, Tawil R, Chung SA, Masny PS, Figlewicz DA. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord*. 2003 May;13(4):322-33.

Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet*. 2003 Nov 15;12(22):2895-907.

Wohlgemuth M, Lemmers RJ, van der Kooi EL, van der Wielen MJ, van Overveld PG, Dauwerse H, Bakker E, Frants RR, Padberg GW, van der Maarel SM. Possible phenotypic dosage effect in patients compound heterozygous for FSHD-sized 4q35 alleles. *Neurology*. 2003 Oct 14;61(7):909-13.

Wohlgemuth M, de Swart BJ, Kalf JG, Joosten FB, Van der Vliet AM, Padberg GW. Dysphagia in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 2006 Jun 27;66(12):1926-8.

Wuebbles RD, Long SW, Hanel ML, Jones PL. Testing the effects of FSHD candidate gene expression in vertebrate muscle development. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010 Mar 28;3(4):386-400.

Yamauchi, J.; Nagao, M.; Kaziro, Y.; Itoh, H. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J. Biol. Chem*. 1997, 272, 27771–27777.

Young JM, Whiddon JL, Yao Z, Kasinathan B, Snider L, Geng LN, Balog J, Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ. DUX4 binding to retroelements creates promoters that are active in FSHD muscle and testis. *PLoS Genet*. 2013 Nov;9(11):e1003947.

Zatz M, Marie SK, Passos-Bueno MR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira A, Wijmenga C, Padberg G, Frants R. High proportion of new mutations and possible anticipation in Brazilian facioscapulohumeral muscular dystrophy families. *Am J Hum Genet.* 1995 Jan; 56(1): 99–105.

Zatz M, Marie SK, Cerqueira A, Vainzof M, Pavanello RC, Passos-Bueno MR. The facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD1) gene affects males more severely and more frequently than females. *Am J Med Genet.* 1998 May 1;77(2):155-61.

Zeng W, de Greef JC, Chen YY, Chien R, Kong X, Gregson HC, Winokur ST, Pyle A, Robertson KD, Schmiesing JA, Kimonis VE, Balog J, Frants RR, Ball AR Jr, Lock LF, Donovan PJ, van der Maarel SM, Yokomori K. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS Genet.* 2009 Jul;5(7):e1000559.

Zernov N and Skoblov M. Genotype-phenotype correlations in FSHD. *BMC Med Genomics.* 2019; 12(Suppl 2): 43.

Zhang Y, King OD, Rahimov F, Jones TI, Ward CW, Kerr JP, Liu N, Emerson CP Jr, Kunkel LM, Partridge TA, Wagner KR. Human skeletal muscle xenograft as a new preclinical model for muscle disorders. *Hum Mol Genet.* 2014 Jun 15;23(12):3180-8.

ANEXOS

ANEXO 1. Extracción del ADN fetal

La extracción de ADN fetal a partir de vellosidad corial se realizó siguiendo los siguientes pasos:

- 1 En una placa de Petri separar los restos hemáticos del villi con una aguja.
- 2 Pasar el villi a otra placa de Petri con una hoja de bisturí y homogeneizar la muestra.
- 3 Si hubiera mucha contaminación hemática, hacer una lisis de eritrocitos con el tampón correspondiente (se echan 300 µl aproximadamente; para 5 ml de lisis de eritrocitos: 50 µl TrisHCl 2M pH 7,5 + 1 µl MgCl₂ + 4,949 ml H₂O) y se pone inmediatamente en hielo (de 5 a 15 min; 15 min si hay mucha sangre). Se centrifuga 1 min a 14.000 rpm.
- 4 Se descarta el sobrenadante y se agregan 300 µl aprox. de tampón de urea (se hace siempre fresco y se calienta a 37°C para que se disuelva): Urea (2,4 g), NaCl 5M (300 µl), EDTA 0,25M (200 µl), Tris 2M pH 7,5 (25 µl), SDS 10% (1 ml), Agua c.s.p (5 ml).
- 5 Se agregan 6 µl de Proteinasa K 10 mg/ml. Dejar a 56°C durante 2h a 37°C toda la noche
- 6 Se añade un volumen de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1). El fenol se calienta primeramente a 65°C. Para un volumen de 5 ml: 2,5 ml fenol + 2,4 ml cloroformo + 100 µl isoamílico. Se invierte el eppendorf varias veces para homogeneizarlo
- 7 Centrifugar 1 min a 14.000 rpm
- 8 Se pasa con mucho cuidado el sobrenadante a otro tubo eppendorf
- 9 Se añade un volumen de Cloroformo-Isoamílico (a TA). Para un volumen de 5 ml: 4,8 ml cloroformo + 200 µl alcohol isoamílico. Se invierte el eppendorf varias veces para homogeneizarlo
- 10 Centrifugar 1 min a 14.000 rpm
- 11 Pasar el sobrenadante a otro tubo eppendorf (si el tamaño del villi es muy grande, se pueden hacer dos fenoles y dos cloroformos)
- 12 Agregar 40 µl de Acetato de Na 3M pH 5,3 (ajustar el pH con ácido acético)
- 13 Precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto
- 14 Lavar con etanol al 70%
- 15 Resuspender la medusa resultante en Tris/EDTA 10/1

En el caso de vellosidad corial se recomienda partir de una cantidad aproximada de 20 mg a poder con la mínima contaminación hemática posible. En el caso de líquido amniótico, tras su extracción las células se ponen en cultivo durante 2-3 semanas para obtener un crecimiento alto (4-5 flask T25 confluentes) ya que se necesita bastante ADN en la técnica de Southern blot. El protocolo a seguir es el mismo que se utiliza para la vellosidad corial comenzando con la centrifugación de las células 10 min a 3.000 rpm y se continúa en el paso 4 del protocolo.

ANEXO 2. Amplificación de la sonda p13E-11

Se parte de ADN plasmídico (p13E-11 inserto en el plásmido Blue Script) (5 ng/ μ l) y se amplifica la sonda por PCR utilizando los cebadores M13 (el producto de PCR da aproximadamente un fragmento de tamaño de 1kb).

M13 Forward: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

M13 Reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

Condiciones de PCR:

dNTPs 5mM	3 μ l
MgCl ₂	3 μ l
H ₂ O	74,79 μ l
Tp10X	10 μ l
M13 F/R	4 μ l /4 μ l
EcoTaq (5U/ μ l)	1,2 μ l
DNA	0,01 μ l

Programa de PCR:

94°C	5'	
94°C	45"	} X 32
65°C	65"	
72°C	1'	
72°C	5'	
4°C	∞	

Sembramos el producto en un gel de agarosa y purificamos la sonda con el kit ExoSAP-IT (Cat. No. 78250.40.UL, Thermofisher) según las instrucciones del fabricante.

Después de la purificación, utilizamos aproximadamente 1000 ng del inserto para la reacción de marcaje.

ANEXO 3. PFGE (www.urmc.rochester.edu/fields-center/protocols/)
Bloques de agarosa (plugs)

Previamente a la digestión se **equilibran** los bloques de agarosa:

Para una digestión, se equilibran 3 bloques de agarosa, uno para cada una de las digestiones. Primero se añade agua destilada y luego se añade a la muestra TE⁻⁴ que dejamos 2 horas en un agitador giratorio, se vacía y se vuelve a añadir TE⁻⁴ que dejamos otras 2 horas girando. Después eliminamos el TE⁻⁴ y añadimos el tampón de equilibrio, diferente para cada una de las digestiones en el que dejamos las muestras girando toda la noche:

E/H	E/B	XapI
100 µl tampón B	100 µl tampón H	100 µl tampón Y ⁺ +Tango™
33 µl espermidina 200 µM	33 µl espermidina 200 µM	33 µl espermidina 200 µM
1 µl DTT 1M	1 µl DTT 1M	1 µl DTT 1M
x µl H ₂ O (866 µl)	x µl H ₂ O (866 µl)	x µl H ₂ O (866 µl)

Después de equilibrar los bloques de agarosa, se elimina el tampón de equilibrio y se añade la mix de digestión a la muestra correspondiente y se ponen en el baño a 37°C unas 6 horas.

E/H	E/B	XapI
15 µl tampón B	15 µl tampón H	15 µl tampón Y ⁺ +Tango™
2,5 µl espermidina 200 µM	2,5 µl espermidina	2,5 µl espermidina
1,5 µl DTT 0,1M	1,5 µl DTT 0,1 M	1,5 µl DTT 0,1 M
125 µl H ₂ O	126µl H ₂ O	125,5 µl H ₂ O
3 µl <i>EcoRI</i> (10U/µl)	3 µl <i>EcoRI</i>	2 µl <i>XapI</i> (10U/µl)
3µl <i>HindIII</i> (10U/µl)	2 µl <i>BlnI</i> (10U/µl)	

Para las posteriores digestiones con *HindIII* se utiliza el mismo protocolo:

ANEXOS

H

15 µl buffer B

2,5 µl espermidina 200 µM

1,5 µl DTT 0,1M (dilución)

128 µl H₂O

3µl *HindIII*

V_T = 150 µl

ADN líquido

Si partimos de ADN líquido, directamente realizamos las digestiones (necesitamos 5 µg de ADN):

E/H	E/B	XapI
3 µl tampón B	3 µl tampón K	3 µl tampón Y ⁺ +Tango™
0,5 µl espermidina 200 µM	0,5 µl espermidina	0,5 µl espermidina
x µl H ₂ O	x µl H ₂ O	x µl H ₂ O
x µl ADN	x µl ADN	x µl ADN
1,5 µl <i>EcoRI</i> (10U/µl)	1,5 µl <i>EcoRI</i>	2 µl <i>XapI</i>
1,5 µl <i>HindIII</i>	1,5 µl <i>BlnI</i>	

H

3 µl buffer B

0,5 µl espermidina 200 µM

x µl H₂O

x µl ADN

2 µl *HindIII*

V_T = 30 µl

ANEXO 4. Amplificación de las sondas 4qA/4qB

Se parte de ADN plasmídico (10 ng/ μ l) y se amplifica la sonda por PCR. Para hacer la PCR, debo añadir 0,1 ng del ADN plasmídico.

Partimos del ADN plasmídico (1 ng/ μ l) y vamos a amplificar la sonda por PCR utilizando los cebadores M13.

M13 Forward: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

M13 Reverse: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

Tamaño del producto de PCR:

4qA: 788 pb

4qB: 1036 pb

Condiciones de PCR:

dNTPs 5mM	0,75 μ l
MgCl ₂ 50mM	0,75 μ l
H ₂ O	18,4 μ l
Tp10X	2,5 μ l
M13 F/R 10 μ M	1 μ l / 1 μ l
EcoTaq (5U/ μ l)	0,3 μ l
DNA	0,3 μ l

Programa de PCR:

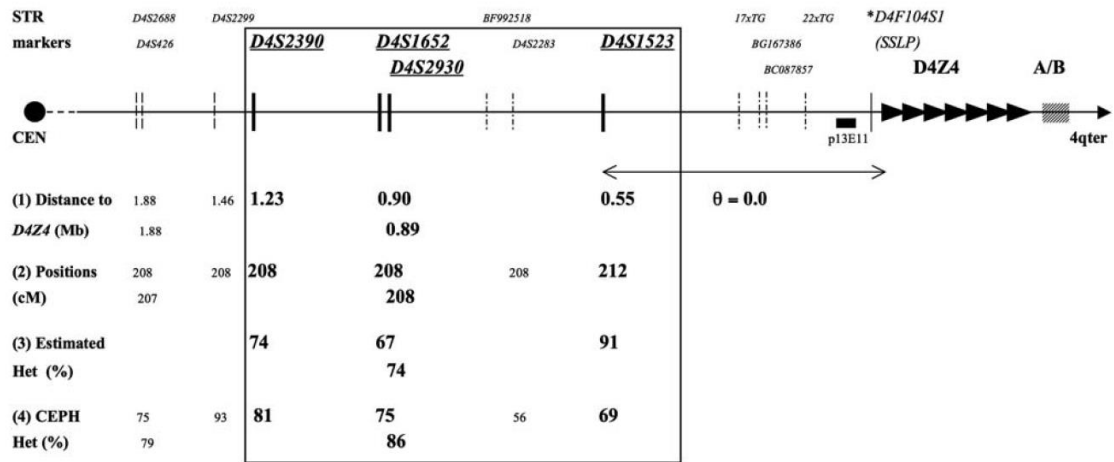
94°C	5'	
94°C	45"	} X 32
55°C	50"	
72°C	1'	
72°C	5'	
4°C	∞	

Sembramos el producto en un gel de agarosa y purificamos la sonda con el kit ExoSAP-IT (Cat. No. 78250.40.UL, Thermofisher) según las instrucciones del fabricante. Después de la purificación, utilizamos aproximadamente 250 ng del inserto para la reacción de marcaje.

ANEXO 5. Estudio molecular indirecto basado en marcadores (prenatales)

En los casos familiares en que tengamos acceso a las muestras de varios individuos afectados y sanos, para complementar el estudio directo realizado mediante Southern blot se realiza en paralelo el **estudio indirecto**.

Este estudio se ha llevado a cabo analizando varios marcadores polimórficos localizados hacia el centrómero (upstream) en la zona 4q35.2, que nos permitirán seguir la segregación del alelo patológico en la familia. Para este estudio se cuenta con los marcadores más cercanos a la zona de repeticiones D4Z4 (**D4S2390, D4S1652, D4S2930 y D4S1523**), localizados a < 1,23 Mb, con una frecuencia de heterocigotos (Informatividad) del 67-91% (Mouna Barat- Houari et al, 2010) y ampliando el estudio a 7 marcadores más.



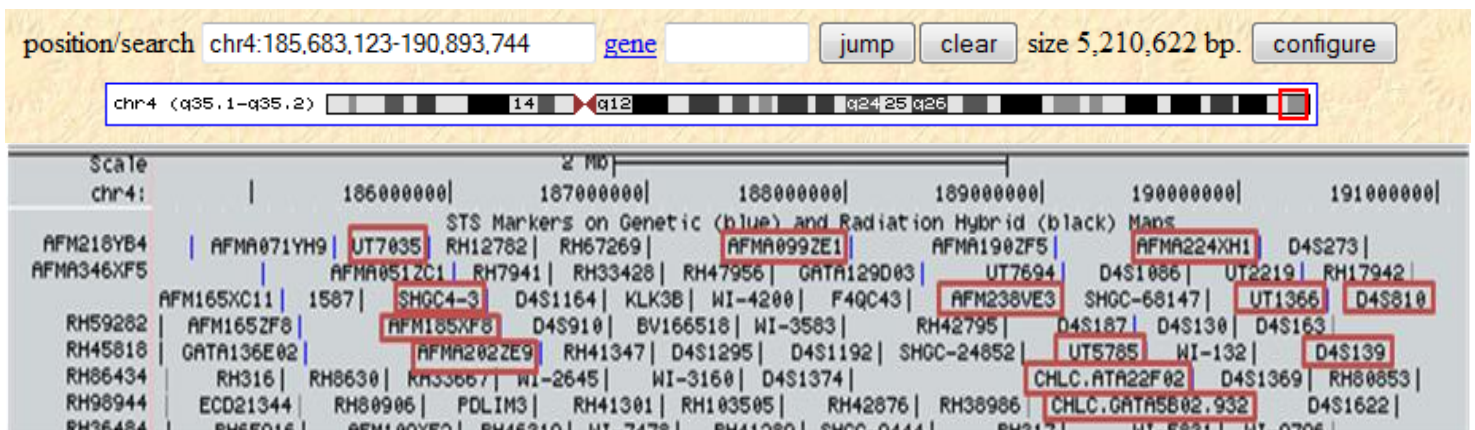
En este estudio se han analizado un total de 11 marcadores, los 4 recomendados en el artículo de Mouna Barat- Houari et al, 2010 (marcados con un recuadro verde) y se ha ampliado el estudio a 7 marcadores más.

Los marcadores utilizados han sido los siguientes:

M1: D4S3047 (UT7035)
M2: D4S171 (SHGC4-3)
M3: D4S1540 (AFM185XF8)
M4: D4S2924 (AFMA202ZE9)
M5: D4S3051 (AFMA099ZE1)
M6: D4S426 (AFM238VE3)
M7: D4S2299 (UT5785)

M8: D4S2390 (CHLC.ATA22F02)
M9: D4S1652 (CHLC.GATA5B02.932)
M10: D4S2930 (AFMA224XH1)
M11: D4S1523 (UT1366)

Los marcadores se encuentran localizados en el # 4 (locus 4q35.2) siguiendo la siguiente distribución y localizados entre las posiciones 185,410,232-190,768,707 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>):



El marcador D4F104S1 (D4S810) se encuentra en la zona solapante del SSLP descrito por Lemmers et al, 2007 y por eso no se ha utilizado.

Los marcadores que no aportan informatividad se marcan con una *. El haplotipo patológico se marca en rojo y el haplotipo no asociado a la enfermedad se marca en azul.

A continuación, se detalla un ejemplo en el que puede verse un evento de recombinación en el individuo II:3.

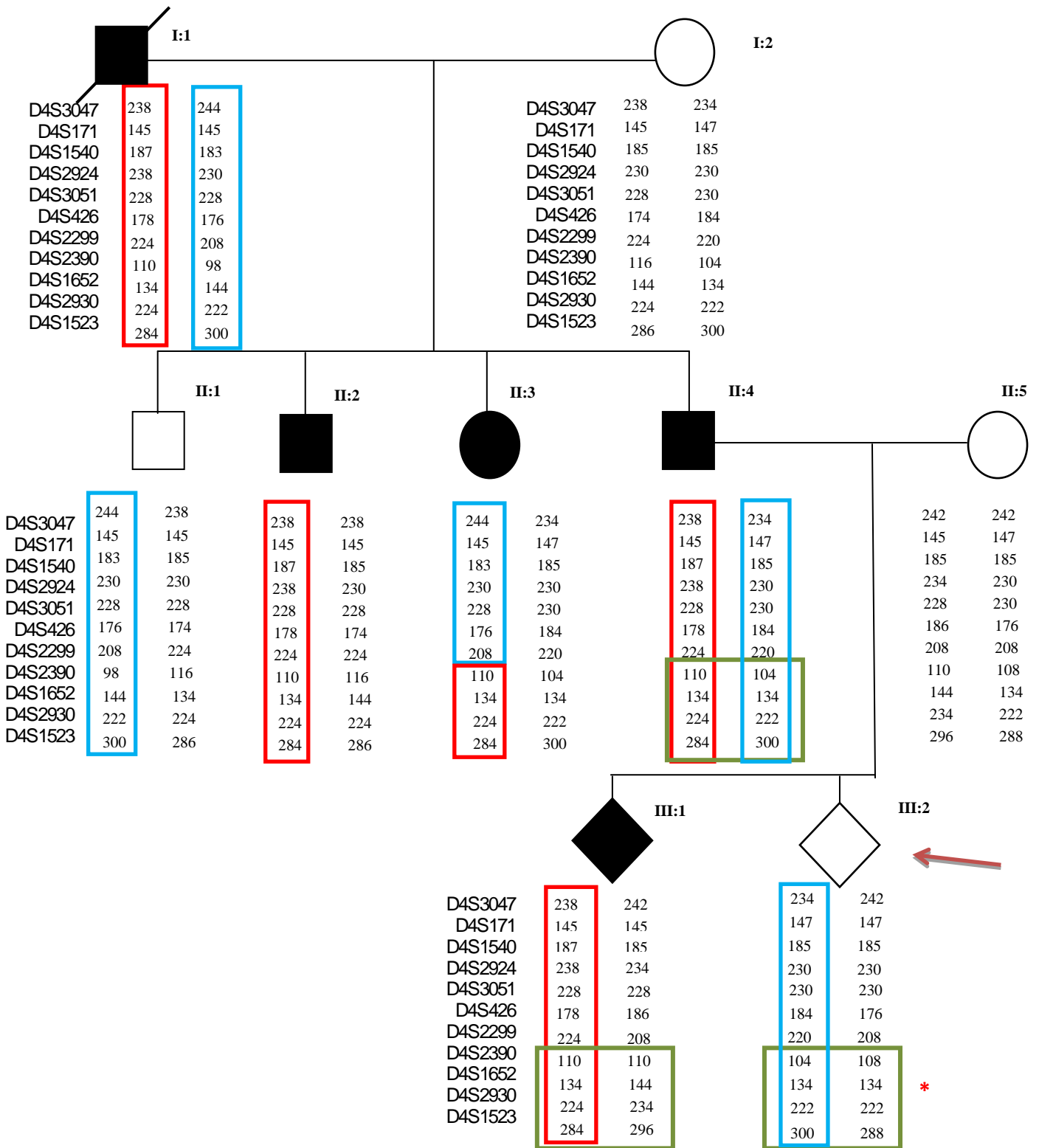


Figura 61. Estudio prenatal de DFEH1 con un evento de recombinación en el individuo II:3.

ANEXO 6. Variantes identificadas en los genes SMCHD1 y DNMT3B

Pasamos a detallar en la siguiente tabla las variantes identificadas en los 72 individuos con DFEH2 en nuestra serie de pacientes estudiados.

ANEXOS

Identificación	Herencia	Número de sujetos	Sexo	Tipo de mutación ^o	Gen	Posición exón ^b	Posición Cromosoma ^c	Posición Transcrito ^d	Posición Proteína ^e	Nivel de metilación FseI (%)	Tamaño fragmento (unidades) Alelo 1 del # 4	Tamaño fragmento (unidades) Alelo 2 del # 4
16-345	N.D.	1	M	Nonsense	SMCHD1	Exón 1	g.5227_5237del	c.38_48del	p.(Ser13*)	4	18	N.D.
06-006 ^f , 07-219	Materna	2	V, M	Indel+FS	SMCHD1	Exón 2	g.15286_15295del	c.202_211del	p.(Pro68Asnfs*38)	6, 15	12, 12	19, 12
13-424	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 3	g.16008_16009delinsGA	c.287_288delinsGA	p.(Thr96Arg)	10	9 (DFEH1)	N.D.
20-104	N.D.	1	V	Indel+FS	SMCHD1	Exón 3	g.16138del	c.417del	p.(Pro140Leufs*9)	8	13	24
14-107	De novo	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 5	g.23186A>G	c.565A>G	p.(Met189Val)	7	11	19
17-173 ^f , 17-174 ^f	N.D.	2	M, M	Missense	SMCHD1	Exón 5	g.23201C>T	c.580C>T	p.(Leu194Phe)	N.D., 13	N.D.	N.D.
18-122	De novo	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 5	g.23231A>G	c.610A>G	p.(Lys204Glu)	5	22	28
15-083 ^f , 16-120 ^f , 16-121 ^f	Paterna	3	V, M, V	Indel (1 aa deletion)	SMCHD1	Exón 6	g.37600_37602del	c.728_730del	p.(Phe244del)	5, 4, 5	13, N.D., 16	27, N.D., 28
16-088	De novo	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 7	g.37810A>G	c.823A>G	p.(Lys275Glu)	8	N.D.	N.D.
03-216	De novo	1	V	Nonsense	SMCHD1	Exón 8	g.43796C>T	c.1030C>T	p.(Arg344*)	15	13	25
96-021	N.D.	1	M	5S	SMCHD1	Intrón 8	g.43807G>A	c.1040+1G>A	-	N.D.	10 (DFEH1)	N.D.
18-268	N.D.	1	V	5S	SMCHD1	Intrón 8	g.43807G>A	c.1040+1G>A	-	7	N.D.	N.D.
01-499	De novo	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 9	g.46162A>G	c.1058A>G	p.(Tyr353Cys)	3	25	31
17-108	N.D.	1	V	5S	SMCHD1 y DNMT3B	Intrón 10 y Exón 11	g.47157del y g.38042C>T	c.1342+3delA y c.1144C>T	p.(Arg382Cys) rs35846833 (DNMT3B)	20	N.D.	N.D.
16-187	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 11	g.49724T>C	c.1415T>C	p.(Phe472Ser)	6	10 (DFEH1)	N.D.
17-065	De novo	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 11	g.49724T>C	c.1415T>C	p.(Phe472Ser)	13	13	33

13-426, 15-005 ^f	Materna	2	M, M	Indel+FS	SMCHD1	Exón 11	g.49730del	c.1421del	p.(Cys474Phefs*7)	10, 10	13, 13	25, 19
15-024	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 11	g.49737G>T	c.1428G>T	p.(Trp476Cys)	21	N.D.	N.D.
03-049	De novo	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 12	g.49964C>T	c.1580C>T	p.(Thr527Met)	14	9 (DFEH1)	N.D.
17-011	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 14	g.54862T>C	c.1898T>C	p.(Leu633Pro)	7	N.D.	N.D.
20-090	De novo	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 14	g.54900G>C	c.1936G>C	p.(Gly646Arg)	6	N.D.	N.D.
14-099	De novo	1	M	3S	SMCHD1	Intrón 15	g.56674A>G	c.2064-2A>G	-	18	10 (DFEH1)	N.D.
03-217	De novo	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 16	g.56680C>T	c.2068C>T	p.(Pro690Ser)	13	12	15
03-115	Paterna	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 17	g.56997A>G	c.2224A>G	p.(Lys742Glu)	20	13	21
16-125 ^f , 15-202 ^f	N.D.	2	M, M	Nonsense	SMCHD1	Exón 18	g.67339A>T	c.2329A>T	p.(Lys777*)	7, 8	18, 19	19, 40
16-162 ^f , 17-327 ^f , 18-051 ^f	N.D.	3	M, M, M	Missense	SMCHD1	Exón 20	g.71668A>C	c.2495A>C	p.(Asp832Ala)	13, 16, N.D.	21, 31, N.D.	31, N.D., N.D.
17-349	N.D.	1	M	5S	SMCHD1	Intrón 20	g.71779A>T	c.2603+3A>T	-	10	19	28
17-182	N.D.	1	??	Missense	SMCHD1	Exón 23	g.77591T>A	c.2795T>A	p.(Val932Glu)	N.D.	N.D.	N.D.
19-346	N.D.	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 23	g.77671A>G	c.2875A>G	p.(Asn959Asp)	6	19	25
14-014 ^f , 16-268	Padre	2	M, V	Indel+FS	SMCHD1	Exón 23	g.77710_77714del	c.2909_2913del	p.(Cys970Phefs*16)	6, 19	19, 22	22, N.D.
14-041 ^f , 17-139 ^f , 16-208	Materno	3	M, M, M	Indel+FS	SMCHD1	Exón 24	g.78412_78413insGT	c.2938_2939insGT	p.(Val980Glyfs*5)	11, 7, 26	16, 16, N.D.	N.D., 28, 28
01-234 ^f , 01-232, 01-233	Padre, Madre	3	V, V, M	Missense y Missense	SMCHD1	Exón 24 (padre) y Exón 45 (madre)	g.78415T>G y g.133611C>G	c.2941T>G y c.5596C>G	p.(Tyr981Asp) y p.(Arg1866Gly)	4, 17, 9	15, 15, 16	27, 22, 27
13-425	N.D.	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 25	g.81475C>T	c.3146C>T	p.(Ala1049Val)	3	N.D.	N.D.
19-157	N.D.	1	V	5S+Indel	SMCHD1	Intrón 25	g.81603_81606del	c.3274_3276+1delAAAG	-	7	18	N.D.

ANEXOS

19-087	N.D.	1	V	5S+Indel	SMCHD1	Intrón 25	g.81605_81609del	c.3276_3276+4delAGTAA	-	6	N.D.	N.D.
18-172	N.D.	1	V	Indel+FS	SMCHD1	Exón 27	g.88625_88626insGAGA	c.3506_3507insGAGA	p.(Glu1170Argfs*34)	12	N.D.	N.D.
16-195	N.D.	1	M	Indel+FS	SMCHD1	Exón 28	g.89869del	c.3567del	p.(Ser1190Leufs*17)	6	16	34
16-346	<i>De novo</i>	1	M	3S	SMCHD1	Intrón 29	g.96633A>G	c.3802-2*>G	-	11	18	27
18-008	<i>De novo</i>	1	V	Nonsense	SMCHD1	Exón 30	g.96683C>T	c.3850C>T	p.(Gln1284*)	10	18	22
05-310 ^f , 05-308	Padre	2	M, V	Missense	SMCHD1	Exón 32	g.99564G>C	c.4109G>C	p.(Arg1370Pro)	5, N.D.	20, 20	31, 61
15-062	N.D.	1	V	3S	SMCHD1	Intrón 35	g.111217G>A	c.4435-1G>A	-	5	10 (DFEH1)	N.D.
15-277	N.D.	1	M	Indel+Nonsense	SMCHD1	Exón 38	g.118913_118916inv	c.4826_4829inv	p.(Leu1609_Val2005delinsArg)	15	12	N.D.
17-253	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 39	g.119135C>A	c.4880C>A	p.(Thr1627Lys)	7	16	28
16-140	N.D.	1	M	Indel+FS	SMCHD1	Exón 39	g.119141_119145del	c.4886_4890del	p.(Glu1629Glyfs*11)	19	21	N.D.
06-103	N.D.	1	M	Nonsense	SMCHD1	Exón 40	g.120690G>T	c.5011G>T	p.(Glu1671*)	7	15	34
18-242	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 42	g.124875A>G	c.5204A>G	p.(Asp1735Gly)	19	7 (DFEH1)	9 (DFEH1)
20-159	N.D.	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 42	g.124884C>T	c.5213C>T	p.(Ala1738Val)	22	34	N.D.
15-220 ^f , 15-064	Madre	2	V, M	Missense	SMCHD1	Exón 42	g.124920A>G	c.5249A>G	p.(Asp1750Gly)	7, 16	15, 15	18, N.D.
11-184	N.D.	1	V	Nonsense	SMCHD1	Exón 43	g.126935C>T	c.5383C>T	p.(Arg1795*)	20	15	42
16-279 ^f , 15-155	Madre	2	V, M	Indel+FS	SMCHD1	Exón 43	g.126972del	c.5419del	p.(Pro1807Glnfs*8)	10, 9	12, 8 (4qB)	37, 12
15-021, 16-053 ^f	Padre	2	V, M	Indel (1 aa deletion)	SMCHD1	Exón 44	g.127341_127343del	c.5536_5538del	p.(Tyr1846del)	6, 11	19, 19	43, 25
17-129	N.D.	1	V	Missense	SMCHD1	Exón 44	g.127352G>C	c.5547G>C	p.(Glu1849Asp)	10	21	36
11-149	N.D.	1	M	Missense	SMCHD1	Exón 45	g.133594T>A	c.5579T>A	p.(Leu1860Gln)	15	13	27
05-130	N.D.	1	V	Nonsense	SMCHD1	Exón 45	g.133617C>T	c.5602C>T	p.(Arg1868*)	N.D.	N.D.	N.D.

19-154	N.D.	1	V	Indel+FS	DNMT3B	Exón 2	g.22978del	c.39del	p.(Asp13Glyfs*52)	23	8 (DFEH1)	N.D.
--------	------	---	---	----------	--------	--------	------------	---------	-------------------	----	-----------	------

Tabla 38. Mutaciones identificadas en SMCHD1 y DNMT3B en nuestra serie, porcentaje de metilación asociado, tamaño de los fragmentos EcoRI de los alelos del # 4.

^a Indel+FS: inserción o deleción que producen un cambio del marco de lectura; Indel (1 aa deletion): inserción o deleción de nucleótidos que produce la deleción de un aminoácido;

Indel+Nonsense: cambio de inversión de nucleótidos que en este caso produce un triplete de parada; Missense: cambio que produce un aminoácido distinto; Nonsense: cambio que produce un triplete de parada; 3S: cambio que afecta al sitio de corte y empalme 3' (splicing); 5S: cambio que afecta al sitio de corte y empalme 5' (splicing)

^b Número de exón está basado en GenBank NG_031972.1 (SMCHD1) y NG_007290.1 (DNMT3B)

^c Posición genómica basada en hg19

^d La posición del transcrito está basada en NM_015295.2 (SMCHD1) y NM_

^e La posición de la proteína está basada en NP_056110.2 (SMCHD1) y NM_

^f Hijos

N.D. No disponible

ANEXOS

Identificación	Tipo de mutación ^a	Gen	Posición exón ^b	Posición Transcrito ^d	Posición Proteína ^e	Nivel de metilación Fsel (%)	SIFT / PolyPhen-2 ^f Mutation Taster ^g UMD Predictor ^h Human Splicing Finder (HSF) ⁱ
16-345	Nonsense	SMCHD1	Exón 1	c.38_48del	p.(Ser13*)	4	Marco de lectura interrumpido por un codón de parada prematuro
06-006 ^f , 07-219	Indel+FS	SMCHD1	Exón 2	c.201_210del	p.(Pro68Asnfs*38)	6, 15	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
13-424	Missense	SMCHD1	Exón 3	c.287_288delinsGA	p.(Thr96Arg)	10	0,02/0,988 ^f Causante de enfermedad (0.999) ^g
20-104	Indel+FS	SMCHD1	Exón 3	c.417del	p.(Pro140Leufs*9)	8	Causante de enfermedad (1) ^g
14-107	Missense	SMCHD1	Exón 5	c.565A>G	p.(Met189Val)	7	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
17-173 ^f , 17-174 ^f	Missense	SMCHD1	Exón 5	c.580C>T	p.(Leu194Phe)	N.D., 13	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
18-122	Missense	SMCHD1	Exón 5	c.610A>G	p.(Lys204Glu)	5	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
15-083 ^f , 16-120 ^f , 16-121 ^f	Indel (1 aa deletion)	SMCHD1	Exón 6	c.728_730del	p.(Phe244del)	5, 4, 5	Causante de enfermedad (1) ^g
16-088	Missense	SMCHD1	Exón 7	c.823A>G	p.(Lys275Glu)	8	0.01 / 0.059 ^f Causante de enfermedad (0.695) ^g Patogénica (78) ^h
03-216	Nonsense	SMCHD1	Exón 8	c.1030C>T	p.(Arg344*)	15	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
96-021	5S	SMCHD1	Intrón 8	c.1040+1G>A	-	N.D.	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
18-268	5S	SMCHD1	Intrón 8	c.1040+1G>A	-	7	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
01-499	Missense	SMCHD1	Exón 9	c.1058A>G	p.(Tyr353Cys)	3	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
17-108	5S	SMCHD1 y DNMT3B	Intrón 10 y Exón 11	c.1342+3delA y c.1144C>T	- p.(Arg382Cys) rs35846833 (DNMT3B)	20	p.(Arg382Cys) VUS (LOVD, ClinVar) p.(Arg382Cys) Causante de enfermedad (0.961) ^g p.(Arg382Cys) Patogénica (84) ^h

16-187	Missense	SMCHD1	Exón 11	c.1415T>C	p.(Phe472Ser)	6	0 / 0.995 ^f Causante de enfermedad (0.994) ^g Patogénica (93) ^h
17-065	Missense	SMCHD1	Exón 11	c.1415T>C	p.(Phe472Ser)	13	0 / 0.995 ^f Causante de enfermedad (0.994) ^g Patogénica (93) ^h
13-426, 15-005 ^f	Indel+FS	SMCHD1	Exón 11	c.1421del	p.(Cys474Phefs*7)	10, 10	VUS (ClinVar) Causante de enfermedad (1) ^g
15-024	Missense	SMCHD1	Exón 11	c.1428G>T	p.(Trp476Cys)	21	0 / 0.999 ^f Causante de enfermedad (0.999) ^g Patogénica (93) ^h
03-049	Missense	SMCHD1	Exón 12	c.1580C>T	p.(Thr527Met)	14	Publicada como patológica (ClinVar, LOVD, HGMD)
17-011	Missense	SMCHD1	Exón 14	c.1898T>C	p.(Leu633Pro)	7	0.01 / 1 ^f Causante de enfermedad (0.999) ^g Patogénica (84) ^h
20-090	Missense	SMCHD1	Exón 14	c.1936G>C	p.(Gly646Arg)	6	0 / 1 ^f Causante de enfermedad (0.999) ^g Patogénica (100) ^h
14-099	3S	SMCHD1	Intrón 15	c.2064-2A>G	-	18	Alteración del sitio dador de splicing ⁱ
03-217	Missense	SMCHD1	Exón 16	c.2068C>T	p.(Pro690Ser)	13	Publicada como patológica (ClinVar, LOVD, HGMD)
03-115	Missense	SMCHD1	Exón 17	c.2224A>G	p.(Lys742Glu)	20	0 / 0.92 ^f Causante de enfermedad (0.909) ^g Patogénica (84) ^h
16-125 ^f , 15-202 ^f	Nonsense	SMCHD1	Exón 18	c.2329A>T	p.(Lys777*)	7, 8	Marco de lectura interrumpido por un codón de parada prematuro
16-162 ^f , 17-327 ^f , 18-051 ^f	Missense	SMCHD1	Exón 20	c.2495A>C	p.(Asp832Ala)	13, 16, N.D.	0 / 0.928 ^f Causante de enfermedad (0.844) ^g Patogénica (84) ^h
17-349	5S	SMCHD1	Intrón 20	c.2603+3A>T	-	10	Alteración del sitio aceptor de splicing ⁱ

ANEXOS

17-182	Missense	SMCHD1	Exón 23	c.2795T>A	p.(Val932Glu)	N.D.	0 / 0.998 ^f Causante de enfermedad (0.998) ^g Patogénica (100) ^h
19-346	Missense	SMCHD1	Exón 23	c.2875A>G	p.(Asn959Asp)	6	0.1 / 0.996 ^f Causante de enfermedad (0.934) ^g Probable polimorfismo (60) ^h
14-014 ^f , 16-268	Indel+FS	SMCHD1	Exón 23	c.2909_2913del	p.(Cys970Phefs*16)	6, 19	Causante de enfermedad (1) ^g
14-041 ^f , 17-139 ^f , 16-208	Indel+FS	SMCHD1	Exón 24	c.2938_2939insGT	p.(Val980Glyfs*5)	11, 7, 26	Causante de enfermedad (1) ^g
01-234 ^f , 01-232, 01-233	Missense y Missense	SMCHD1	Exón 24 (padre) y Exón 45 (madre)	c.2941T>G y c.5596C>G	p.(Tyr981Asp) y p.(Arg1866Gly)	4, 17, 9	Publicadas como patológicas (LOVD, HGMD)
13-425	Missense	SMCHD1	Exón 25	c.3146C>T	p.(Ala1049Val)	3	0.37 / 0.996 ^f Causante de enfermedad (0.860) ^g Patogénica (93) ^h
19-157	5S+Indel	SMCHD1	Intrón 25	c.3274_3276+1delAAAG	-	7	Publicada como patológica (LOVD)
19-087	5S+Indel	SMCHD1	Intrón 25	c.3276_3276+4delAGTAA	-	6	Publicada como patológica (ClinVar, LOVD, HGMD)
18-172	Indel+FS	SMCHD1	Exón 27	c.3506_3507insGAGA	p.(Glu1170Argfs*34)	12	Causante de enfermedad (1) ^g
16-195	Indel+FS	SMCHD1	Exón 28	c.3567del	p.(Ser1190Leufs*17)	6	Causante de enfermedad (1) ^g
16-346	3S	SMCHD1	Intrón 29	c.3802-2A>G	-	11	Alteración del sitio dador de splicing ⁱ
18-008	Nonsense	SMCHD1	Exón 30	c.3850C>T	p.(Gln1284*)	10	Marco de lectura interrumpido por un codón de parada prematuro
05-310 ^f , 05-308	Missense	SMCHD1	Exón 32	c.4109G>C	p.(Arg1370Pro)	5, N.D.	0.02 / 0.986 ^f Causante de enfermedad (0.788) ^g Probablemente Patogénica (69) ^h
15-062	3S	SMCHD1	Intrón 35	c.4435-1G>A	-	5	Alteración del sitio dador de splicing ⁱ
15-277	Indel+Nonsense	SMCHD1	Exón 38	c.4826_4829inv	p.(Leu1609_Val2005delinsArg)	15	Marco de lectura interrumpido por un codón de parada prematuro

17-253	Missense	SMCHD1	Exón 39	c.4880C>A	p.(Thr1627Lys)	7	0.09 / 0.961 ^f Causante de enfermedad (0.997) ^g Patogénica (78) ^h
16-140	Indel+FS	SMCHD1	Exón 39	c.4886_4890del	p.(Glu1629Glyfs*11)	19	Causante de enfermedad (1) ^g
06-103	Nonsense	SMCHD1	Exón 40	c.5011G>T	p.(Glu1671*)	7	Marco de lectura interrumpido por un codón de parada prematuro
18-242	Missense	SMCHD1	Exón 42	c.5204A>G	p.(Asp1735Gly)	19	0.18 / 0.805 ^f Causante de enfermedad (0.978) ^g Patogénica (100) ^h
20-159	Missense	SMCHD1	Exón 42	c.5213C>T	p.(Ala1738Val)	22	0.01 / 1 ^f Causante de enfermedad (0.999) ^g Probablemente polimorfismo (63) ^h
15-220 ^f , 15-064	Missense	SMCHD1	Exón 42	c.5249A>G	p.(Asp1750Gly)	7, 16	0.23 / 1 ^f Causante de enfermedad (0.998) ^g Patogénica (93) ^h
11-184	Nonsense	SMCHD1	Exón 43	c.5383C>T	p.(Arg1795*)	20	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
16-279 ^f , 15-155	Indel+FS	SMCHD1	Exón 43	c.5419del	p.(Pro1807Glnfs*8)	10, 9	Causante de enfermedad (1) ^g
15-021, 16-053 ^f	Indel (1 aa deletion)	SMCHD1	Exón 44	c.5536_5538del	p.(Tyr1846del)	6, 11	Causante de enfermedad (0.999) ^g
17-129	Missense	SMCHD1	Exón 44	c.5547G>C	p.(Glu1849Asp)	10	0.12 / 0.853 ^f Causante de enfermedad (0.994) ^g Patogénica (100) ^h
11-149	Missense	SMCHD1	Exón 45	c.5579T>A	p.(Leu1860Gln)	15	0 / 1 ^f Causante de enfermedad (0.997) ^g Patogénica (100) ^h
05-130	Nonsense	SMCHD1	Exón 45	c.5602C>T	p.(Arg1868*)	N.D.	Marco de lectura interrumpido por un codón de parada prematuro
19-154	Indel+FS	DNMT3B	Exón 2	c.39del	p.(Asp13Glyfs*52)	23	Causante de enfermedad (1) ^g

Tabla 39. Mutaciones identificadas en SMCHD1 y DNMT3B en nuestra serie (cambios descritos y predicciones *in silico* de cambios no descritos en la literatura) y porcentaje de metilación asociado.

VUS: Variante de significado incierto

Algoritmos “in silico” de predicción funcional y de splicing de la proteína:

^f SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): rangos de 0 a 1. La sustitución se predice como “deletérea” si el valor es <0.05 , y “tolerable” si es ≥ 0.05 / PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2): el resultado de la predicción puede ser “probablemente dañino” (1), “posiblemente dañino” o “benigno” (0)

^g Mutation Taster: “causante de la enfermedad” (un valor cercano a 1 indica una alta seguridad de la predicción, probablemente deletérea), “polimorfismo” (un valor cercano a 0 indica una alteración probablemente inofensiva)

^h UMD Predictor: rangos de 0-100 (<50 polimorfismo, 50-64: probable polimorfismo; 65-74: probablemente patogénico; >74 : patogénico)

ⁱ Human Splicing Finder (HSF): predice el efecto de mutaciones que afectan a los sitios de splicing (empalme de exones en el procesamiento del ARNm)

ANEXO 7. Variantes identificadas en el gen VCP

Pasamos a detallar en la siguiente tabla las variantes identificadas en nuestra serie de pacientes estudiados.

<i>Identificación familias e individuos</i>	<i>Tipo de mutación^a</i>	<i>Posición exón^b</i>	<i>Posición Transcrito^d</i>	<i>Posición Proteína^e</i>	<i>SIFT / PolyPhen-2^f Mutation Taster^g UMD Predictor^h</i>
07-355	Missense	Exón 3	c.277C>T	p.(Arg93Cys)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
16-077, 16-249	Missense	Exón 4	c.383G>T	p.(Gly128Val)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD)
13-232	Missense	Exón 5	c.463C>T	p.(ArgR155Cys)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
09-119, 10-197	Missense	Exón 5	c.464G>A	p.(Arg155His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>09-1000, 09-530, 13-569</i>	Missense	Exón 5	c.464G>A	p.(Arg155His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>15-181</i>	Missense	Exón 5	c.464G>A	p.(Arg155His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
02-366, 98-280	Missense	Exón 5	c.469G>C	p.(Gly157Arg)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>09-762, 10-305, 10-306</i>	Missense	Exón 5	c.476G>A	p.(Arg159His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>05-035, 05-042, 05-043, 06-090, 06-162</i>	Missense	Exón 5	c.476G>A	p.(Arg159His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>14-056</i>	Missense	Exón 5	c.476G>A	p.(Arg159His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>07-381</i>	Missense	Exón 5	c.476G>A	p.(Arg159His)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
<i>10-519, 11-046, 11-119</i>	Missense	Exón 5	c.572G>A	p.(Arg191Gln)	Publicada como patológica (LOVD, HGMD, ClinVar)
08-193, 09-095	Missense	Exón 6	c.616A>T	p.(Ile1206Phe)	Publicada como patológica (HGMD)
<i>08-428</i>	Missense	Exón 10	c.1106T>C	p.(Ile369Thr)	Publicada como VUS (ClinVar) 0 / 1 ^f Causante de enfermedad (0.999) ^g Patogénica (99) ^h

Tabla 40. Mutaciones identificadas en VCP en nuestra serie (cambios descritos y predicciones *in silico* de cambios no descritos en la literatura).

^a Missense: cambio que produce un aminoácido distinto

^b Número de exón está basado en GenBank NC_000009.12

^c Posición genómica basada en hg19

^d La posición del transcrito está basada en NM_007126

^e La posición de la proteína está basada en NP_009057

VUS: Variante de significado incierto

Algoritmos “in silico” de predicción funcional y de splicing de la proteína:

^f SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): rangos de 0 a 1. La sustitución se predice como “deletérea” si el valor es <0.05, y “tolerable” si es ≥0.05 / PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2): el resultado de la predicción puede ser “probablemente dañino” (1), “posiblemente dañino” o “benigno” (0)

^g Mutation Taster: “causante de la enfermedad” (un valor cercano a 1 indica una alta seguridad de la predicción, probablemente deletérea), “polimorfismo” (un valor cercano a 0 indica una alteración probablemente inofensiva)

^h UMD Predictor: rangos de 0-100 (<50 polimorfismo, 50-64: probable polimorfismo; 65-74: probablemente patogénico; >74: patogénico)

Marcadas en negrita las incluidas en las publicaciones derivadas de la tesis con las referencias 4, 8 y 12.