



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2
1121631

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO S. S.

"ESTUDIO CLINICO Y DIAGNOSTICO MOLECULAR
EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR
PROGRESIVA TIPO DUCHENNE/BECKER"

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
ORGANIZADO



DIRECCION DE ENSEÑANZA

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN GENETICA MEDICA
P R E S E N T A
DR. NORBERTO LEYVA GARCIA

ASESOR DE TESIS: DRA. MA. DEL REFUGIO RIVERA VEGA



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
SELLO DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**"ESTUDIO CLINICO Y DIAGNOSTICO MOLECULAR EN PACIENTES CON
DISTROFIA MUSCULAR PROGRESIVA TIPO DUCHENNE/BECKER"**

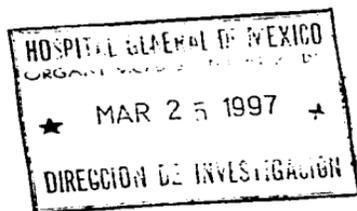


**DRA. MA DEL REFUGIO RIVERA VEGA.
TUTOR DE TESIS**



**DRA. SUSANA KOFMAN
JEFE DE SERVICIO.
PROFESOR TITULAR DEL CURSO**

**ESTA TESIS FUE REGISTRADA Y REVISADA
POR LA UNIDAD DE EPIDEMIOLOGIA
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
CON CLAVE DIC/94/311A/01/028.**



DEDICATORIA.

A MIS PADRES, FLORENCIO LEYVA Y ANA MARIA GARCIA POR SU AMOR Y CARIÑO.

A MIS HIJOS, ANGELA Y ANDRES, POR SU TERNURA, QUIENES REPRESENTAN LO MAS BELLO E IMPORTANTE DE MI VIDA.

A PATRICIA, POR EL APOYO RECIBIDO EN ESTOS ULTIMOS 12 AÑOS, CON ADMIRACION Y CARIÑO.

A MIS HERMANOS OSCAR Y ROCIO, LOS CUALES ME HAN MOTIVADO A CONTINUAR EN MI CARRERA.

A LA DRA. SUSANA KOFMAN POR SU APOYO Y ENSEÑANZA, QUE ME HAN SERVIDO COMO UN EJEMPLO EN MI SUPERACION, CON ADMIRACION Y RESPETO.

A LA DRA MA. DEL REFUGIO RIVERA CON RESPETO Y CARIÑO, POR SU APOYO, ENSEÑANZA Y PACIENCIA, ESPERANDO POR SIEMPRE CONTAR CON SU BELLA AMISTAD.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL SERVICIO DE GENETICA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO.

A AQUELLOS ENFERMOS AFECTADOS POR UN PADECIMIENTO GENETICO, QUE PONEN SU CONFIANZA EN NOSOTROS, ESPERANZADOS EN RECIBIR UN TRATAMIENTO CURATIVO.

INDICE

I.-RESUMEN	2
A.- ANTECEDENTES.	5
1.- HISTORICOS.	5
2.- BASES MOLECULARES DEL GEN DMD.	7
a.- MAPEO CROMOSOMICO DEL GEN DMD.	7
b.- CLONACION POSICIONAL DE LOS SEGMENTOS DE DNA DEL LOCUS DMD.	9
c.-TRANSCRITOS DEL GEN DMD.	11
d.- MUTACIONES DEL GEN DMD.	13
3.-LA DISTROFINA, EL PRODUCTO PROTEICO.	16
a.-ESTRUCTURA Y POSIBLES FUNCIONES.	16
b.-GLICOPROTEINAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA.	20
4.-ASPECTOS CLINICOS DE LOS ENFERMOS CON DMD.	22
a.- CARACTERISTICAS CLINICAS.	22
b.-ASESORAMIENTO GENETICO.	23
5.-METODOS DE DIAGNOSTICO.	25
B.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	28
C.- HIPOTESIS DE TRABAJO.	28
D.- OBJETIVOS.	28
E.- JUSTIFICACION.	29
II.-MATERIAL Y METODOS.	30
III.-RESULTADOS.	31
IV.-DISCUSION	39
V.-REFERENCIAS.	42

I.- RESUMEN.

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades determinadas genéticamente, caracterizadas por debilidad muscular progresiva. La severidad clínica varía ampliamente entre los diferentes tipos de distrofia muscular. Los exámenes bioquímico, electromiográfico y de histopatología muestran datos inespecíficos de degeneración muscular en todos los casos.

Una de las distrofias musculares mas frecuentes es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) que es una enfermedad letal, con patrón de herencia recesivo ligada al cromosoma X. Los varones afectados heredan el gen mutado de la madre portadora en 2/3 de los casos y en 1/3 son mutaciones de novo. La incidencia es de 1 en 3000 individuos masculinos. Se caracteriza clínicamente por una debilidad muscular progresiva, hiperlordosis, pseudohipertrofia de gemelos, compromiso cardiaco y/o respiratorio y ocasionalmente retraso mental. Los niños afectados inician con problemas a la edad de 2 años con dificultades en la marcha, quedan confinados en silla de ruedas a los 12 años y fallecen por insuficiencia respiratoria o insuficiencia cardiaca entre 18-25 años.

La distrofia muscular tipo Becker (DMB) es una variante alélica del mismo gen. Su incidencia es de 1 en 30 mil nacidos vivos masculinos, el inicio es mas tardío y las manifestaciones clínicas son menos severas. El paciente por lo regular se encuentra en

silla de ruedas entre los 10-16 años de edad y fallece por complicaciones cardíacas y/o respiratorias.

El gen DMD/DMB es muy grande y ocupa el 1% del cromosoma X humano, se localiza en Xp21.2, tiene 2500 kilobases (kb), presenta 79 exones, el transcrito es de 14 kb y el producto es de 3600 aminoácidos denominado distrofina (dys). La mutación mas frecuente es la delección en el 65 % de los casos, duplicación en un 7% y el resto son mutaciones puntuales.

El rango de severidad clínica en los pacientes con DMD/DMB puede explicarse como consecuencia de un efecto de la mutación sobre la fase de lectura traduccional del mRNA. Las delecciones resultantes en DMB mantienen la fase de lectura traduccional del RNA mensajero resultando en la producción de una distrofina corta o semifuncional y en la DMD se interrumpe la fase de lectura, lo que ocasiona una falta total o casi total de distrofina.

Una de las técnicas moleculares que se usa mas comúnmente para la detección de mutaciones es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método se basa en la incorporación de oligonucleótidos (primers), los cuales hibridan con su secuencia homóloga del gen DMD/DMB, se amplifican por medio de una polimerasa termoestable y se corren en un gel de agarosa para determinar su tamaño e inferir la mutación. Los mas empleados son el 5 plex y 9 plex que corresponden a las regiones donde comúnmente se han encontrado delecciones (Manchas calientes o "hot spots"). Con

este método se determinan aproximadamente el 95% de las deleciones del gen DMD/DMB.

Debido a que un tercio de las mutaciones son de novo y dos tercios son mutaciones heredadas, se han realizado diversos métodos para el estudio de portadoras. Un método eficiente es el análisis de ligamiento de regiones polimórficas en los intrones denominadas STRs (secuencias cortas repetidas en tandem). El estudio consiste en la amplificación de las secuencias polimórficas de dinucleótidos mediante PCR, los productos se corren en un gel junto a un marcador de peso molecular analizando los patrones de migración de los alelos. Los oligonucleótidos utilizados son parte de las secuencias intrónicas 44,45,49 y 50, con este método se logra la identificación de probables portadoras.

A.- ANTECEDENTES

1.-HISTORICOS.

Las distrofias musculares son un grupo de padecimientos hereditarios, que afectan primariamente el músculo en forma progresiva. Meryon 1852 es el primero en describirlas, al observar ocho individuos afectados que presentaban debilidad progresiva e hipotrofia del músculo, atribuyendo el problema a una nutrición inadecuada o defectos en la misma que producía una muerte temprana. Histológicamente describe una degeneración granular de los músculos voluntarios. (1,2)

En sus publicaciones semanales Guillaume Benjamín Amand Duchenne en 1868 (FIG.1) describió con detalle un tipo de enfermedad muscular que mas tarde llevaría su nombre (Distrofia Muscular de Duchenne, (DMD), denominando al padecimiento "Parálisis pseudohipertrófica o moesclerosis" (3,4).

El término distrofia fue introducido por Erb para diferenciar la distrofia muscular progresiva pseudohipertrófica de la atrofia muscular espinal (5). Distrofia deriva del griego **dis**: inadecuado y **trofe**: nutrición., y se define como el proceso y consecuencia de alteraciones progresivas hereditarias de células específicas en uno o mas tejidos que inicialmente muestran una función normal. (6,7)

Becker en 1955 describe una distrofia muscular (DMB) con herencia ligada al sexo muy parecida a la que describió Duchenne 100 años antes, encontrando una edad de inicio más tardía con una evolución lenta y de mejor pronóstico. (8,9)

En la actualidad a final de los 80s se identificó el gen que causaba la enfermedad mediante técnicas de clonación posicional reconociendo el defecto básico de la proteína citoesquelética distrofina (dys), el producto génico del gen DMD, reconociéndose también a la DMB como una variante alélica del mismo gen (10).



FIG. 1.

2.- BASES MOLECULARES DEL GEN DMD.

a.- Mapeo cromosómico del gen DMD.

La primera indicación de que el gen responsable de la DMD y DMB se encontraba en la banda Xp21, proviene de estudios realizados en pacientes femeninas que manifestaban clínicamente distrofia muscular de Duchenne. A final de los años 70s y principios de los 80s se describieron algunos casos de mujeres afectadas. Todas presentaban una translocación cromosómica de novo X-autosoma que involucraba la banda Xp21 (11).

El análisis con bandas de alta resolución reveló heterogeneidad dentro de los puntos de intercambio de la translocación en Xp21, pero la mayoría se presentaban en Xp21.2, en una región que se extendía 2-3 millones de pb (12).

La segunda evidencia proviene de estudios familiares, realizado con sondas de DNA que detectan fragmentos polimórficos en longitud (RFLP) del cromosoma X. Los primeros dos marcadores ligados fueron detectados con las sondas RC8 y L1.28. La sonda RC8 mapeaba en el tercio distal, mientras que L1.28 mapeaba en el tercio proximal. Ambos marcadores polimórficos segregaban con el gen DMD pero cada uno mostraba una frecuencia de recombinación del 20%, existiendo una distancia entre ambos de 40 cM, indicando que solo flanqueaban el gen DMD. (13)

A partir de estos estudios, se han reportado otras sondas aisladas de Xp, ligadas al gen DMD con distancias entre 10 a 20 cM. La tercera evidencia proviene del estudio de un paciente el cual presentaba un fenotipo complejo, debido a una delección de genes contiguos, que incluía: hipoplasia adrenal, deficiencia de glicerol cinasa, retinitis pigmentosa, enfermedad granulomatosa crónica asociados a distrofia muscular de Duchenne (paciente BB) .(FIG 2) (14).

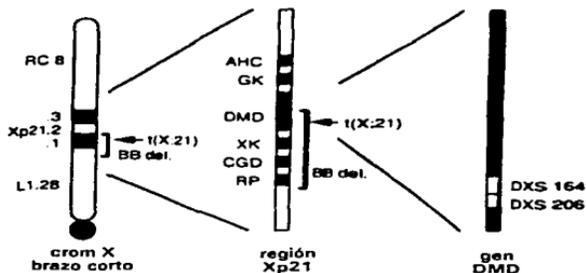


FIG. 2.

b.-Clonación Posicional de los segmentos de DNA del locus DMD.

La primera clona de DNA que realmente se asociaba con el locus DMD fue aislada por Kunkel y colaboradores, los cuales utilizaron un proceso de hibridación competitiva llamada; técnica de reasociación amplificada con fenol (PERT). Observaron que la clona PERT87 no hibridaba en 5 casos de 57 pacientes con DMD. Este hallazgo sugirió que existía una delección submicroscópica que removía una porción del gen DMD incluyendo la secuencia PERT 87 (15).

La secuencia pERT87 fue extendida por caminata cromosómica mediante el aislamiento de una serie de segmentos sobrelapados de DNA, encontrando una subclona de 220 kb denominada DXS164. Se analizaron 1346 pacientes de los cuales 88 presentaban delección (7%). (16).

Un segundo descubrimiento importante que condujo a la localización del gen fue el estudio de una paciente con una translocación cromosómica (X;21) , que involucraba un segmento del brazo corto del X en Xp21, que se insertaba adyacente a un bloque de genes repetidos en tandem que codifican RNA ribosomal 18S y 28S del cromosoma 21. Se utilizaron sondas de DNA ribosomal para identificar y clonar de la paciente un segmento de DNA que contenía el fragmento de la translocación. Este segmento clonado fue obtenido mediante células somáticas híbridas humano-roedor que contenían el *dar(X)* (17).

El fragmento de unión fue designado XJ1 contenía 620 pb de DNAr en un extremo y aproximadamente 11 kb de cromosoma X humano. La caminata cromosómica a lo largo del fragmento mostró un locus de 120 kb aproximadamente denominado DXS206, dentro de este locus existían 3 subclonas XJ1.1, 1.2 y 2.3 segregaban en pacientes con mutaciones del gen DMD. (18)

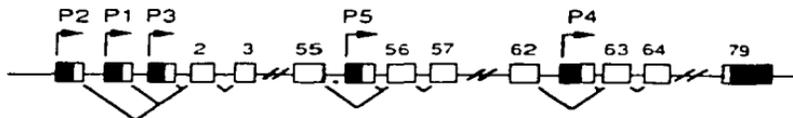
A pesar de la evidencia de que los loci DXS164 y DXS206 se encontraban dentro o muy cerca del gen DMD, la estrategia para localizar los exones del gen, se realizó mediante hibridación de subclonas genómicas individuales con secuencias que se expresaban en músculo (RNA o cDNA) o con secuencias altamente conservadas de otras especies. Mónaco et. al. reportó el primer exón en el locus DXS164, identificando una subclona pERT-87-25, que hibridizaba con DNA de: mono, bovino, ratón, hámster y pollo (19).

La clona pERT87-25 contenía una secuencia parecida a un exón (fase de lectura abierta con márgenes de unión adecuados en las regiones 5' y 3'), el análisis de la secuencia indicaba una transcripción de sentido telomérico a centromérico. La biblioteca de cDNA permitió el aislamiento de un sobrelapado de clonas de cDNA que representaban un transcrito de 14kb. El grupo completo de clonas de cDNA hibridizaba con al menos 60 diferentes fragmentos cortados con Hind III. Los primeros 33 exones que estaban contenidos en los fragmentos mapearon una distancia genómica de aproximadamente 1000 Kb sugiriendo un tamaño del gen de 2000 kb.(20)

Debido al gran tamaño del gen el mapeo de restricción convencional era inadecuado, existiendo técnicas como: electroforesis de campos pulsados (PEGE) y electroforesis de campos invertidos (FIGE), ideales para la construcción de mapas de restricción de grandes fragmentos de DNA (21).

c.-Transcritos del gen DMD.

El producto del gen DMD DMB es una proteína denominada *distrofina*, este polipéptido existe en el organismo en varias isoformas, generadas varios promotores que inician la transcripción en diferentes sitios del gen (FIG. 3).



(FIG. 3) PROMOTORES ALTERNATIVOS DEL GEN DMD/DMB.

El primer promotor identificado fue el de la *distrofina* muscular esquelética. El promotor es similar a otros promotores músculo-específico, presenta sitios de unión MEF-1 (unión a MioD) en las posiciones -58, -535 y -583 pb. Presenta una secuencia consenso en la posición -394 pb. y contiene elementos reguladores negativos y positivos con secuencia amplificadora en el primer intrón (22).

Se ha identificado un segundo promotor en el mRNA del cerebro de rata que tiene un primer exón diferente, transcrito de un promotor distinto, el cual ha sido mapeado 90 kb o mas río arriba del promotor muscular (23).

Se identificó un tercer promotor en las células de Purkinje, el cual se localiza en la porción media del intrón que se ubica entre el 1o. y 2o. exón del promotor muscular. En esta isoforma se modifican los primeros 7 aminoácidos de la distrofina de tipo muscular (24).

Existe un cuarto promotor localizado en el extremo 3' del gen. El primer exón del transcrito mapea a 8kb río arriba del exón 63. Codifica una proteína de 71-kDa (Dp71) que es el producto mas abundante en cerebro, hígado, pulmón y estómago. Dp71 contiene los dominios ricos en cisteína y C-terminal de la distrofina precedida por 7 aminoácidos que son únicos en esta proteína. El promotor tiene las características típicas de un gen que se expresa de forma ubicua (25).

Se ha identificado un 5o. promotor localizado en el intrón 55. El mensajero mide 5.2 kb y codifica una isoforma de 116 kDa (Dp116) la cual se expresa solamente en el nervio periférico (26).

Recientemente se reportó una nueva proteína denominada Dp140 y el promotor posiblemente se encuentra en el intrón 44 (69).

d.- Mutaciones en el gen DMD.

La localización y clonación del gen permitió el estudio de mutaciones, siendo posible la identificación de portadoras y el diagnóstico prenatal. Las primeras mutaciones descritas fueron las deleciones, detectadas con las sondas genómicas pERT87 y XJ determinando un porcentaje entre 8-10%. Actualmente con el ensayo de PCR mediante el uso de multiplex, se determinan aproximadamente el 95% de las deleciones del gen DMD/DMB (27).

Las deleciones en el gen son muy heterogéneas en cuanto tamaño y localización. Las deleciones que involucran miles de kilobases, remueven genes adyacentes, resultando en un fenotipo de genes contiguos. Las deleciones pequeñas remueven uno o algunos exones y su distribución no es al azar. Existen dos regiones susceptibles de sufrir deleciones (Hot spots). El punto caliente menor se encuentra en el intrón 7 y la segunda también denominado punto caliente mayor se localiza en el intrón 44 (28).

La deleción puede ocurrir por ruptura y reunión al azar, o por un evento de recombinación específico. La recombinación puede involucrar tanto intercambio homólogo o no homólogo. El intercambio puede ser entre cromosomas, entre cromátides hermanas del mismo cromosoma o entre diferentes regiones de la misma cromátide (29).

La agrupación de las deleciones entre los exones 45 a 53, sugiere que algunas características del DNA o de la cromatina predispone a rupturas específicas o eventos

de recombinación. Esta agrupación es mas común en las deleciones que se extienden en el intrón 44. La secuenciación de dos puntos de ruptura en una deleción que involucraba al intrón 44 ha identificado un elemento parecido a un transposón, sugiriendo la predisposición de los rearrreglos en este sitio (30).

El amplio espectro de severidad clínica en los pacientes con DMD/DMB se explica como consecuencia de un efecto de la mutación sobre la fase de lectura traduccional del mRNA. Mónaco et. al. (19), propuso que deleciones resultantes en DMB mantienen la fase de lectura traduccional del RNA mensajero y en la DMD se interrumpe la fase de lectura (31). Los puntos de ruptura de la deleción están frecuentemente en los márgenes de los intrones, así que la mayoría de las deleciones remueven un grupo específico de exones. Si todos los exones comenzaran con el primer nucleótido de un codón y terminaran con el último nucleótido de un codón, entonces las deleciones simplemente removerían un número integral de codones del mensajero y un número integral de aminoácidos de la proteína. Sin embargo los tipos de margen del exón son variables y no necesariamente corresponden a los extremos de los codones (31).

El tipo de margen se define como 1,2 y 3 dependiendo si el exón termina con el primero, segundo o tercer nucleótido del triplete codificante. La información del tipo de borde es muy importante para determinar si la deleción de un exón o un grupo de exones interrumpe la fase de lectura en el mRNA (32). Por otra parte se determinó que el 6% de los casos correspondía a duplicaciones (33). Los mecanismos de recombinación que causan la deleción pueden también producir duplicación. En tres

casos la duplicación había sido caracterizada a nivel de nucleótidos. Una duplicación resultó de recombinación homóloga entre un par de secuencias *Alu* en el gen DMD, mientras que otras dos resultaron de eventos de recombinación no homóloga. Las secuencias *Alu* son secuencias altamente repetitivas aproximadamente de 300 pb que se encuentran a lo largo del genoma. En seis casos el rearreglo se detectó en la línea germinal del abuelo materno (34).

El 30% de los pacientes afectados en quienes no se detectan deleciones o duplicaciones son portadores de mutaciones puntuales y la mayoría de estas pequeñas mutaciones como en los casos de los rearreglos mayores resultan en la terminación temprana de la traducción, las mutaciones de sentido equivocado son extremadamente raras. Estas mutaciones se distribuyen de forma homogénea a lo largo del gen, y aparentemente no existe un punto caliente de predisposición a mutaciones (35).

3.- LA DISTROFINA (DYS) EL PRODUCTO PROTEICO.

a.- Estructura y posibles funciones.

La dys comprende cerca del 5% del citoesqueleto de la membrana del músculo esquelético normal. El análisis de la secuencia del cDNA del gen DMD predice una proteína de 3600 aminoácidos y de un peso molecular de 427 kDa (FIG. 4).. La proteína tiene cuatro dominios contiguos , tres de los cuales son característicos de las proteínas del citoesqueleto:

- (1) una región N-terminal de 200-240 residuos, la cual es similar al dominio de la α -actina.
- (2) un gran dominio que comprende 26 secuencias triple hélice las cuales recuerdan las repeticiones en la β -espectrina.
- (3) una región rica en cisteína entre los residuos 3080 y 3360 la cual muestra una homología al dominio C-terminal de la α actina en *Dictyostelium discoideum*, la cual puede contener dos sitios de unión al calcio.
- (4) una secuencia C-terminal de 420 , este último dominio se une fuertemente a la membrana plasmática (FIG.5) (36).

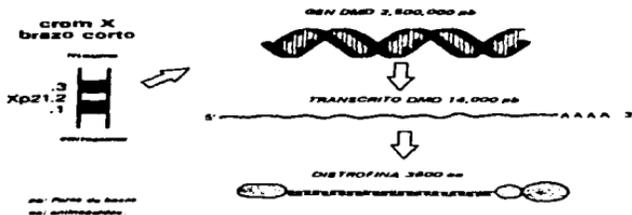


FIG. 4. SINTESIS DE LA DISTRFINA.

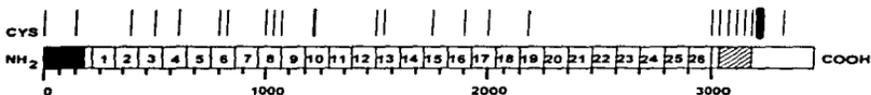


FIG 5: ESQUEMA DE LOS DOMINIOS DE LA DISTRFINA.

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la dys se localiza en la porción citoplasmática del sarcolema, existiendo una gran concentración en las uniones miotendinosas y en la membrana postsináptica de la placa neuromuscular. La dys se relaciona con la β -espectrina y vinculina en tres distintos dominios en el sarcolema,

sobreponiéndose tanto a las bandas I y las líneas M. La inmunofluorescencia de alta resolución muestra a la dys en un arreglo de bandas gruesas que se localiza en los sitios de unión de las sarcómeras a la membrana plasmática. Estos resultados demuestran que la dys forma una parte intrincada del citoesqueleto muscular y puede funcionar para unir el aparato contráctil normal con el sarcolema (37).

Se ha reconocido por muchos años un papel importante de las fuerzas mecánicas en la regulación de la forma y función de los tejidos, pero los mecanismos moleculares por los cuales las células sienten y responden a los estímulos están actualmente siendo elucidadas. Las integrinas son una gran familia de proteínas transmembranales, las cuales físicamente se ligan a proteínas asociadas a actina del citoesqueleto (vinculina, α -actina, talina) con componentes de la matriz extracelular. Se sugiere que la dys y las proteínas citoesqueléticas asociadas formen parte de una red, designada específicamente a responder a las tensiones acontecidas durante el crecimiento muscular normal postnatal, mas que aquellas que acontecen durante los ciclos repetidos de contracción/relajación. En base a esta hipótesis se postula que los músculos son incapaces de crecer en la misma proporción del esqueleto (38).

Existen varias formas en las cuales la dys podría jugar un papel en la transducción de la tensión aplicada externamente en el crecimiento de las fibras musculares. La activación por estiramiento de los canales de calcio, son una característica de muchos tipos celulares. Parece poco probable que la dys por si misma o junto con el complejo de proteoglicanos forme un canal de calcio, por el contrario se ha comprobado que el complejo del citoesqueleto distrofina/espectrina es el elemento que sostiene la tensión

en la activación del canal de calcio en la membrana. Así la distorsión del elemento que sostiene tensión debido a una elongación del músculo durante el crecimiento podría modular la función de los canales del ión (39).

La habilidad del músculo esquelético para adaptarse a la carga mecánica mediante un cambio en la expresión génica es bien conocido. Esta respuesta juega un papel crucial durante el crecimiento y desarrollo muscular in vivo, cuando existe una elongación y alargamiento del esqueleto o el músculo. Los miotubos que crecen in vivo también poseen la habilidad de detectar y adaptarse al estímulo mecánico. El incremento en la longitud ósea, ocurre principalmente por la adición serial de sarcómeras de los extremos de las fibras musculares. El mecanismo que coordina la agregación de sarcómeras se desconoce pero no involucra un elemento neural. Se piensa que la dys forma parte de un ligando transmembranal que funciona para controlar la cantidad de sarcómeras que se adicionan a los extremos de las fibras musculares acortadas (38,40).

La unión miotendinosa es una zona altamente especializada. Es una región plegada de la membrana plasmática que regula la transmisión de fuerzas generadas por las miofibrillas hacia el tendón. Presumiblemente se transmite en dirección opuesta. Las placas submembranas de estas uniones participan en la transmisión de la tensión hacia la matriz extracelular y provee sitios para la adición de nuevas sarcómeras. La dys se concentra en los huecos de la membrana plasmática plegada en las uniones miotendinosas, donde se ha sugerido que forma asociaciones laterales entre los filamentos delgados y la membrana. Estos hallazgos indican que la proteína juega un

papel en la transmisión de la tensión de los filamentos de actina sarcomérica a través de la membrana plasmática hacia el tendón (41).

Se ha reportado la presencia de distrofina en el citoplasma del músculo esquelético y en grandes cantidades en la unión miotendinosa del feto en desarrollo. En el ratón mediante hibridización *in situ*, se detectaron transcritos de distrofina en corazón a los 9 días y a los 13 días en cerebelo y en el cerebro anterior. La distrofina fetal parece ser mas pequeña que la distrofina del adulto, incrementándose conforme avanza la gestación, por otra parte algunas veces se observa un patrón diferencial en el análisis de Western blot con anticuerpos diferentes, esto sugiere que existe una regulación ontogénica de las isoformas de la distrofina (42,43)

b.- Glicoproteínas asociadas a la distrofina.

La región C-terminal se une a un complejo de proteoglicanos que comunica con el exterior del sarcolema. El dominio rico en cys y la mitad proximal del C-terminal, tiene los sitios de unión al complejo proteico. Este sistema de proteínas se ha subdividido en tres complejos (44):

I.- Complejo de glicoproteínas

A.- Complejo de distroglicanos

α -distroglicano (156 DAG)

β -distroglicano (43 DAG)

Estas proteínas son traducidas de un solo gen localizado en 3p21 y se expresan en varios tejidos (45).

B.- Complejo de Sarcoglicanos.

α -sarcoglicano. Adhalina (50 DAG: 17q21)

β -sarcoglicano. A3b (43 KDa).

γ -sarcoglicano. 35 DAG.

δ -sarcoglicano. 25 DAG.

El complejo se expresa específicamente en el tejido muscular esquelético y cardíaco, siendo parte integral de la membrana. (46,47)

La depleción de la glicoproteína de 50 kd del complejo DAG causa una distrofia muscular severa en la infancia AR (SCARMD). La necrosis muscular vista en la DMD y en la SCARMD se debe a la interrupción del DAG (46).

II.- Complejo de sintrofinas.

α -sintrofina (59 DAP). Expresada en músculo (48).

β 1-sintrofina (59 DAP 8q23-24). Expresada ubicuamente (49).

β 2-sintrofina (59 DAP). Localizada en la unión neuromuscular (50).

III.-No clasificados.

A5 o 25 DAP y otras proteínas (44).

4.- ASPECTOS CLINICOS DE LOS ENFERMOS CON DMD.

a.- Características clínicas.

Los pacientes con DMD son sanos clínicamente al nacimiento. Los primeros síntomas inician cuando el niño comienza a caminar, caracterizados por la presencia de una marcha anormal (anadina) y caídas frecuentes. Los primeros signos son debilidad en la cadera observando la presencia de una elasticidad anormal en los músculos acompañándose de una rigidez marcada de los músculos iliopsoas y del tendón de Aquiles. Existe pseudohipertrofia de los gastrocnemios y una hiperlordosis como mecanismos compensatorios de la debilidad muscular. A los 4a. de edad existe dificultad para subir escaleras y para levantarse cuando se encuentra sentado en el piso (signo de Gowers) (51).

Los pacientes afectados pierden la habilidad de subir escaleras alrededor de los 9 años (7-13a) y requieren silla de ruedas a los 12 a (9-16 a). A los 15a las complicaciones ortopédicas mas frecuentes son escoliosis y contracturas musculares, y otro tipo de problemas como disminución de la capacidad vital pulmonar (CVP) y alteraciones cardiacas. La edad de fallecimiento es variable y depende de las complicaciones cardiacas y pulmonares así como del tratamiento rehabilitador oportuno (53,54).

Existen otros síntomas asociados que son variables, estos incluyen: dolor muscular, depresión e incontinencia fecal y urinaria. El dolor es referido principalmente en la pantorrilla, siendo mas común en los pacientes con DMB. La depresión inicia

generalmente con las actividades escolares cuando el niño comienza a darse cuenta de sus limitaciones (55).

La capacidad mental es uno de los elementos mas variables dentro de las características clínicas, con un CI (coeficiente intelectual) promedio de una desviación estándar por debajo de la media. No existe una evidencia clara de correlación entre el grado de retraso mental y el sitio o el tamaño de la deleción, sin embargo se ha reportado que la deleción del exón 52 está asociado a un riesgo elevado de retraso mental (52).

b.- Asesoramiento genético.

Las distrofias musculares Duchenne y Becker (DMD/DMB) son variantes alélicas del mismo gen, se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X. Cuando la mujer es portadora obligada del padecimiento existe la probabilidad de un 50% de que los varones estén afectados y de un 50% de que las hijas sean portadoras (55).

Debido al estudio de la detección directa de la mutación, análisis de los haplotipos, inmunoanálisis de la distrofina han mejorado importantemente la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal. Por otra parte estos estudios han permitido la detección de mosaicismo germinal en casos que aparentemente eran esporádicos. La determinación de los haplotipos asociados a la DMD de una familia en riesgo puede ser obtenido utilizando sitios polimórficos de restricción intragénicos y especialmente

las repeticiones CA localizadas en los extremos 5' y 3' del gen DMD así como las secuencias polimórficas intrónicas (56,57).

Las alteraciones de la distrofina se consideraban específicas para DMD/DMB, sin embargo se han identificado irregularidades de la distrofina en algunos pacientes con alteraciones musculares, principalmente con distrofia muscular congénita de Fukuyama (DMCF), y en pacientes con distrofia muscular de cinturas (DMC) (58). En un estudio analizando 23 casos con DMCF, se encontró que 3 presentaban una distrofina anormal, proponiendo que existe una interferencia metabólica entre el producto del gen de la DMCF y la distrofina, incluso se piensa que la deficiencia de distrofina combinada con la heterocigocidad de la DMCF podría producir un fenotipo intermedio (58).

Por otra parte se realizó un estudio, analizando la distrofina en la biopsia muscular de 41 casos de pacientes los cuales tenían el diagnóstico de distrofia muscular de cinturas. Se identificó que 5 pacientes masculinos presentaban un patrón anormal de distribución en la distrofina compatible con DMB y dos pacientes femeninos compatibles con portadoras asintomáticas. El análisis molecular con PCR para determinar la mutación demostró que los 5 pacientes presentaban delección (59).

5.- METODOS DE DIAGNOSTICO.

El diagnóstico se realiza con el apoyo de varios métodos; 1.- Análisis de DNA, para determinar el tipo de mutación, 2.- Estudio del transcrito. 3.-Examen de la proteína para determinar la calidad y cantidad de distrofina en la biopsia muscular. 4.-Niveles séricos de Creatin cinasa. 5.-Histología y 6.-electromiografía.

Uno de los métodos mas utilizados para el diagnóstico molecular de deleciones es mediante PCR, amplificando con multiplex los exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 y 51. Los 9 exones que mas frecuentemente se deletan en los pacientes con DMD, detectando un 82% de deleciones. Agregando otro multiplex al análisis en una segunda reacción, se estima que la eficiencia de detección es de 95% (60).

Un estudio alternativo es la amplificación de secuencias de cDNA mediante PCR obtenidas por transcripción reversa de mRNA. Se han originado transcritos "ilegítimos" de células sanguíneas para el estudio del gen, con el fin de obtener información diagnóstica (*). Roberts et. al. ha justificado la gran utilidad del RT-PCR (transcripción reversa-PCR) para detectar deleciones y duplicaciones que dan como resultado fragmentos amplificados alterados. Por este medio se obtiene directamente el estado de ruptura de fase del mRNA. Esta técnica representa una arma poderosa de estudio, sin embargo es muy laboriosa y sofisticada para usarse como diagnóstico de rutina (61).

El estudio de la distrofina se realiza mediante Western blot e inmunohistoquímica. El análisis del músculo mediante Western blot, con anticuerpos antidistrofina dirigidos contra el extremo amino y el extremo carboxilo terminal. Inicialmente mostró que los pacientes no tenían distrofina detectable mientras que los pacientes con Becker tenían distrofina de menor tamaño. Nicholson et. al. utilizó anticuerpos monoclonales altamente específicos y densitometría cuantitativa, observando que la cantidad de distrofina correlacionaba con la severidad de la enfermedad, pero los niveles de distrofina eran más altos que los reportados. La mayoría de los pacientes con DMD tienen distrofina con un peso molecular alterado superior al 25% de lo normal (62).

El examen con inmunofluorescencia e inmunohistoquímica muestra una localización subcelular en la membrana del sarcolema. El patrón de tinción es negativo en los pacientes con DMD a excepción de algunas fibras restablecidas. En la DMB se describe un patrón difuso o esporádico. Se ha visto que las portadoras sintomáticas presentan un patrón de tinción en forma de mosaico, con grupos de fibras positivas, negativas y algunas parcialmente teñidas. Las portadoras obligadas que no manifiestan la enfermedad pueden tener una baja proporción de fibras teñidas negativamente. Por otra parte este estudio se ha utilizado para realizar diagnóstico prenatal (56,62)

La creatín cinasa sérica se encuentra muy elevada aproximadamente 50 a 100 veces por encima del límite normal. La CK tiene funciones importantes en el metabolismo energético:

- 1.- Funciona como un buffer (amortiguador) energético temporal.
- 2.- Sirve como un buffer de energía espacial o un sistema de transporte energético.

3.- El sistema CK/PCr previene el aumento intracelular de ADP libre, impidiendo así una inactivación de las ATPasas celulares y la pérdida neta de los nucleótidos de adenina (63).

La CK se encuentra elevada al nacimiento en la DMD y DMB, pero las manifestaciones clínicas francas inician cuando el paciente comienza a caminar. Los niveles de CK se muestran elevados al principio de la enfermedad y declinan progresivamente debido a la disminución de la masa muscular. El 70% de las pacientes hemicigotas portadoras del gen mutado DMD muestran niveles elevados de CK y frecuentemente es la única manifestación de laboratorio (64).

La patología muscular muestra evidencia de degeneración y regeneración fibrilar. Puede existir necrosis de las fibras, fagocitosis y fibras prominentes opacas que están hipercontraídas. La apariencia general es la variación del tamaño de las fibras circulares incluidas en tejido fibroso. En estadios terminales de la enfermedad existe reemplazamiento de tejido muscular por grasa, indistinguible de otras enfermedades miodegenerativas (65).

La Electromiografía (EMG) es característica con una reducción en la duración y amplitud de los potenciales de acción y un aumento en la frecuencia de los potenciales polifásicos (66).

B.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Analizar dos familias con distrofia muscular progresiva Duchenne/Becker, desde el punto de vista molecular para conocer el tipo de alteración molecular en una muestra de población mexicana.

C.- HIPOTESIS.

- 1.- La presencia de deleciones del gen DMD/DMB se encuentra en la mayor parte de la muestra de la población mexicana.
- 2.- La presencia de secuencias polimórficas específicas en el gen DMD/DMB permite la identificación de portadoras.

D.- OBJETIVOS.

a) Objetivo general.

- 1.- Establecer diagnóstico molecular de los enfermos y portadores de la DMD/DMB.

b) Objetivos particulares.

- 1.- Determinar el tipo de mutación en el gen DMD/DMB en una muestra de población mexicana.
- 2.- Identificar portadoras entre las mujeres de las familias mediante secuencias polimórficas intrónicas (STR's).
- 3.- Ofrecer un asesoramiento genético adecuado a los enfermos y portadoras del padecimiento.

E.- JUSTIFICACION.

En los últimos años con el progreso de la biología molecular se han logrado numerosos avances en el conocimiento de las enfermedades genéticas. Las distrofias musculares Duchenne/Becker se han utilizado como modelos para el estudio de la patología genética, al analizar los datos clínicos de los pacientes y los resultados moleculares. La distrofia muscular DMD/DMB es un padecimiento letal e incapacitante que acarrea problemas serios en los familiares, por lo que es necesario dar un asesoramiento genético adecuado a madres y hermanas del paciente que son portadoras del padecimiento con fines preventivos para su vida reproductiva. Por otra parte es importante conocer las alteraciones moleculares presentes en una muestra de población mexicana.

II.- MATERIAL Y METODOS.

Se estudiarán 2 familias, con un total de 7 enfermos y 10 probables portadoras. Los cuales fueron enviados al servicio de genética con diagnóstico clínico de distrofia muscular progresiva Duchenne/Becker.

a) Criterios de inclusión.

- 1.- Contar con el consentimiento del paciente para la realización del estudio.
- 2.- Pacientes que tengan una CPK sérica elevada (mayor de 190 U/L).
- 3.- Ser madre o hermana de un paciente con DMD/DMB.
- 3.-Electromiografía compatible con distrofia muscular.
- 4.-Biopsia muscular con cambios distróficos compatibles con distrofia muscular.

b) Criterios de exclusión.

- 1.-Los pacientes que por algún motivo estén en desacuerdo con la realización del estudio.

c) Criterios de eliminación.

- 1.-Aquellos pacientes que fueron referidos con diagnóstico de DMD ó DMB y que no cumplan con los criterios de inclusión.

METODOLOGIA.

Mediante la historia clínica genética se recabarán los datos mas importantes de los pacientes que acuden con diagnóstico de DMD o DMB al servicio de genética del Hospital General de México.

Se solicitará a laboratorios centrales de esta institución la determinación de CPK, TGO y Aldolasa.

Se enviará a los pacientes al servicio de neurología para la realización de EMG y estudio de histopatología de biopsia muscular.

Previa explicación y consentimiento del paciente y familiares, se procederá a la extracción de 20 ml. de sangre periférica. Mediante métodos estándares se procederá a la extracción del DNA.

Se realizará la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) que se basa en la amplificación enzimática de un fragmento de DNA que está flanqueado por dos oligonucleótidos, que son pequeñas secuencias de bases que hibridizan con los extremos opuestos de las dos cadenas en la secuencia de interés. La síntesis complementaria del DNA se realiza por una DNA polimerasa resistente a temperatura, (ya que el proceso de hibridación requiere de temperatura) así los oligonucleótidos están orientados de tal manera que las dos cadenas nuevas de DNA sirven para sintetizar una segunda copia de la secuencia original. Con el uso de termocicladores (máquinas de PCR) se producen ciclos repetidos de desnaturalización con calor, hibridización de los oligonucleótidos y síntesis enzimática de DNA, resultando en una amplificación exponencial (2, 4, 8, 16,...copias) de la secuencia en estudio. Los productos de la amplificación se corren en un gel de agarosa, junto con

un marcador de peso molecular para determinar su tamaño y de acuerdo a ello el tipo de mutación (60).

Se hará análisis de ligamiento por PCR mediante la identificación de marcadores polimórficos de las secuencias intrónicas conocidos como STR (del ingles "short tandem repeats"), de los intrones 44, 45, 49 y 50 (67).

La metodología molecular se realizará en el Centro de investigaciones y estudios avanzados del IPN por el M. en C. Diego Arenas Aranda.

La recolección de los datos clínicos se realizará con el formato de historia clínica existente en el servicio de genética.

un marcador de peso molecular para determinar su tamaño y de acuerdo a ello el tipo de mutación (60).

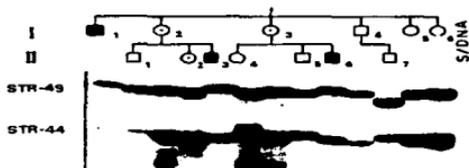
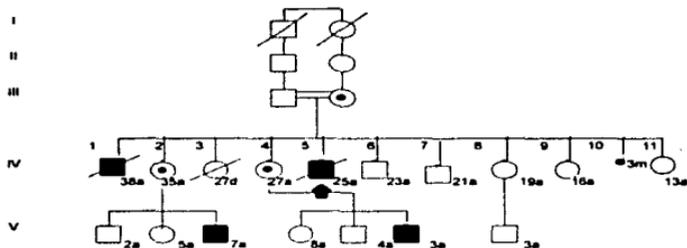
Se hará análisis de ligamiento por PCR mediante la identificación de marcadores polimórficos de las secuencias intrónicas conocidos como STR (del inglés "short tandem repeats"), de los intrones 44, 45, 49 y 50 (67).

La metodología molecular se realizará en el Centro de investigaciones y estudios avanzados del IPN por el M. en C. Diego Arenas Aranda.

La recolección de los datos clínicos se realizará con el formato de historia clínica existente en el servicio de genética.

RESULTADOS.

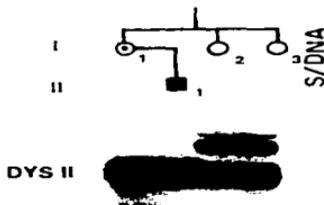
FAMILIA 1.



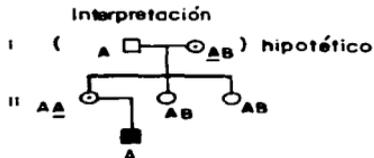
Se muestra el árbol genealógico y las autorradiografías obtenidas de la amplificación de las regiones STR'S 44 y 49 de la familia con antecedentes de DMB.

El análisis con el 9 y 5 plex no mostró deleciones en los varones afectados. Por otra parte las regiones 45 y 50 del gen DMD no fueron informativas debido a que la madre era homocigota para ambas regiones.

Las mujeres I-2, I-3, y II-2 mostraron el haplotipo de riesgo de ser portadoras con las regiones 44 y 49.



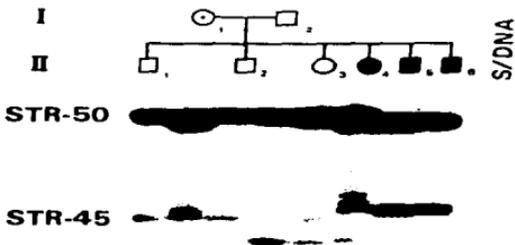
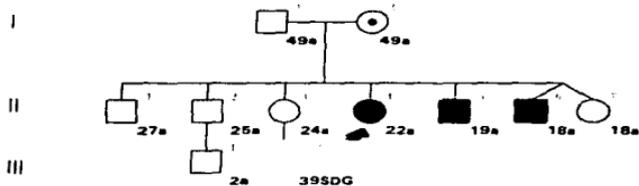
Las mujeres I-5 y I-6 no fueron informativas de ser portadoras, con las regiones 44 y 49 por lo que se utilizó el STR 5', confirmando que ellas no son portadoras.



Esto se concluyó asumiendo haplotipos hipotéticos de sus padres como A para el padre y AB para la madre.

FAMILIA 2

ARBOL GENEALOGICO



Se muestra el árbol genealógico y los haplotipos de una familia con 3 miembros afectados, con diagnóstico clínico de DMD forma intermedia. Se realizó estudio mediante la amplificación múltiple 9 y 5 plex no detectando deleciones en el gen DMD. El análisis de haplotipos mediante STRs solo fue informativo para el 45 y 50. El análisis de los alelos producidos por la amplificación de las regiones 45 y 50 mostraron la presencia del alelo que segrega con la enfermedad en los pacientes afectados y la madre portadora. La mujer en riesgo (II-3) no resultó ser portadora, la

hermana gemela (II-7) no fue posible obtener muestra para el estudio, la hermana con el padecimiento (II-4) presentó el mismo alelo que la madre portadora y los hermanos enfermos por lo que se sugiere que heredó el cromosoma con la mutación en el gen DMD. Las otras cuatro regiones del gen analizadas (44,49, 5' y 3') no fueron informativas ya que la madre fue homocigota para ellas.

Los niveles enzimáticos se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 1

	CPK TOTAL	CPK MB	ALDOLASA
I-1	74	16	4.0
I-2	434	18	2.8
II-1	140	20	5.3
II-2	166	17	4.3
II-3	87	16	5.2
II-4	1450	89	12
II-5	3270	151	13
II-6	1420	61	14
II-7	160	25	5.3
VALORES	F: < 150 U/L.	< 25 U/L.	4-7 U/L.
NORMALES	M: < 270 U/L.		

En el suero de los pacientes y familiares se determinó la actividad de la CK total la cual se encontró elevada en los enfermos y en el caso I-2 (434 U/L). Las isoenzimas CK-MB y CK-B se encontraron elevadas solamente en los enfermos. La aldolasa se encontró por arriba del valor normal en los tres enfermos.

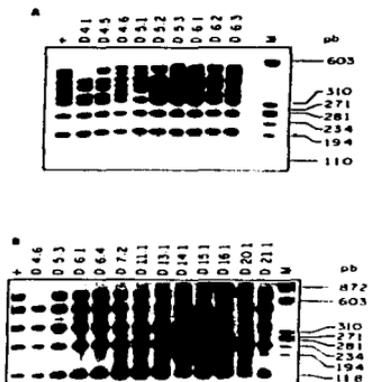
TABLA 2

	CABEZA, CUELLO Y TRONCO	CARA	MIEMBROS SUPERIORES	MIEMBROS INFERIORES
II-4	2	5	3	3
II-5	2	5	3	2
II-6	2	5	3	1

CLASIFICACION:

100%	(5)	Movimientos contra la gravedad y resistencia normal.
75%	(4)	Movimientos contra la gravedad y menor resistencia.
50%	(3)	Movimientos contra la gravedad y sin resistencia.
25%	(2)	Movimientos eliminando la gravedad.
10%	(1)	Trazas de contracción palpable.
0%	(0)	falta total de acción muscular.

El examen clínico muscular muestra ligera disminución en la severidad clínica en los miembros inferiores de la paciente II-4.



Las dos familias no mostraron delección, sin embargo se muestra el ejemplo de la amplificación múltiple de DNA genómico de 18 enfermos mexicanos con DMD/DMB. El DNA obtenido a partir de leucocitos fue amplificado en geles de agarosa al 1.4 % y se tiñó con bromuro de etidio. (A) Amplificación con el 9 plex . (B) amplificación con el 5 plex . (+) control positivo. (M) marcador. Se indican los tamaños de las bandas del marcador en pares de bases (pb). (68)

IV.- DISCUSION

El análisis molecular utilizando PCR-multiplex 9 y 5, no mostró delección en ninguna de las dos familias estudiadas, sin embargo se muestra el patrón de bandas de algunas delecciones observadas, esto puede ser debido al número reducido de la muestra. En un estudio realizado en 40 pacientes mexicanos con distrofia DMB/DMD, el porcentaje de delecciones obtenido fue del 50.8%, obteniendo una proporción del 87% de delecciones localizadas en el punto caliente mayor, a diferencia de población anglosajona que es del 60%. (70).

En la familia 1 se realizó análisis clínico de los pacientes afectados de las generaciones IV y V. Los casos IV-1 y IV-5 mostraron datos clínicos compatibles con una distrofia muscular tipo Becker, la biopsia muscular fue compatible con distrofia muscular, las enzimas se encontraron con elevación importante. Los pacientes V-3 y V-6 presentaban datos clínicos compatibles con una distrofia muscular de Duchenne, la elevación enzimática era muy significativa. Clínicamente presentaban alteraciones del aprendizaje. Con la finalidad de realizar diagnóstico de portadoras se realizó la amplificación de regiones cortas repetidas en tandem (STR's) de nucleótidos CA, de 6 regiones diferentes del gen DMD (intrones 44, 45, 49, 50 y extremos 5' y 3' del gen). Mediante este análisis de ligamiento se observó que las mujeres IV -2, IV-4 y V-2 heredaron el alelo que segregaba con la enfermedad. En el caso de las mujeres IV-9 y IV-11 no fueron informativas de ser portadoras con los STR's 44 y 49. En estas

probables portadoras se amplificó la región 5' del gen DMD confirmando que no son portadoras . A pesar que no fue posible determinar el tipo de mutación con el análisis de PCR-multiplex es importante resaltar la variabilidad fenotípica que se observó entre las generaciones IV y V, entre otras manifestaciones se observó además la presencia de alteraciones del aprendizaje en la generación IV. Por lo tanto será importante realizar en un futuro análisis de mutaciones puntuales o microdelecciones con otra metodología (32,35) para correlacionar el tipo de mutación con la variabilidad del cuadro clínico.

En la familia 2 el estudio clínico de los tres pacientes fue compatible con una forma intermedia de DMB/DMD (edad de permanencia en silla de ruedas a los 14 años). Las enzimas musculares (CK, CK-MB y aldolasa) se encontraron elevadas en los tres pacientes y en la madre portadora. Los niveles enzimáticos en las pacientes portadoras se eleva en el 70% de los casos (64), sin embargo diversos factores pueden influir en su elevación, tales como el periodo menstrual, ejercicio, etc. por lo que es un dato inespecífico de diagnóstico en las portadoras de distrofia muscular de Duchenne. El estudio electromiográfico y la biopsia muscular fueron informativos de distrofia muscular.

La amplificación de las regiones 50 y 45, confirmó que el alelo portador que segrega con la enfermedad, fue heredado por los pacientes afectados y no por el resto de los familiares estudiados. Resulta importante señalar el hallazgo de una mujer afectada (II-4), la cual presenta una ligera disminución en la severidad de la debilidad muscular (tabla 2). Existe el reporte de algunas mujeres que presentan síntomas clínicos de la enfermedad como calambres musculares o cansancio a esfuerzos moderados, quienes

se han denominado portadoras sintomáticas. Por otra parte existe un grupo menor de pacientes que manifiestan todos los síntomas de la enfermedad, esto es debido probablemente a un proceso de inactivación preferencial del X normal, como consecuencia de una translocación X-autosoma, rearrreglos estructuras, o rearrreglos crípticos del cromosoma X, que tienda a reducir o amplificar la viabilidad celular (71, 72). Por tal motivo es necesario realizar otros estudios para investigar la naturaleza de esta inactivación preferencial. Resultados obtenidos de la determinación de distrofina mediante Western, indicaron que la paciente y sus hermanos carecen de distrofina muscular (Arenas D. comunicación verbal).

En las dos familias estudiadas no se detectó delección o duplicación intragénica por análisis PCR-multiplex, suponemos que la alteración sea probablemente una mutación puntual o microdelecciones no detectables con este método.

Debido a que el estudio enzimático es inespecífico para la detección de portadoras, es importante el implemento de la detección mediante análisis de ligamiento en base a la heterocigocidad de los alelos polimórficos de los intrones estudiados en población mexicana, aunado a la determinación de distrofina y de las proteínas asociadas mediante Western o inmunofluorescencia (44-47), facilita el diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne y de otros tipos de distrofias, con la finalidad de realizar investigación clínico/básica y realizar un asesoramiento genético adecuado en su vida reproductiva a los pacientes y familiares con distrofia muscular de Duchenne.

REFERENCIAS.

- 1.-Meryon E.; On granular ad fatty degeneration of the voluntary muscles. *Med Chir Trans*, 35:73-84, (1852)
- 2.-Meryon E.; Practical and pathological researches on the various forms of paralysis. London, Churchill.(1864).
- 3.-Duchenne GBA.; Recherches sur la peralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-esclérosique. *Arch Gen Med*, 11: 5-25, 119-209, 305-321, 421-443; (1868)
- 4.-Duchenne GBA.; Album de photographies pathologiques complementaire de liver inutile de lélectrisation localisse. Paris, J.B. Bailliere, (1862).
- 5.-Erb W. ; Ueber die "juvenile Form" der progressiven Muskelatrophie und ihre Beziehungen zur sogenannten Pseudohypertrophie der Muskeln. *Dtsch Arch Klin Med* : 34: 467-519. (1864)
- 6.- Stendman's Medical Dictionary 23rd. Baltimore Williams & Wilkins (1977).
- 7.- Mette W., Ulrik Moller. Distrophy: a revised definition. *J. Med. Genet.* 26: 769-771. (1989)
- 8.-Becker P.E.; Eine neve X-cromosoma le Muskeldystrophien. *Acta Psychiat Neurol Scand.* 193: 427 only . (1955)
- 9.-Becker P.E.; Two new families of beningn sex linked recessive muscular dystrophy. *Rev. Can. Biol.* 21: 551-566.,(1962)

- 10.- Monaco A.P. and Kunkel L.M. A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene. *Trends Genet.* 1987; 3: 33-37.
- 11.- Emanuel BS, Zackai EH, Tucker SH.; Further evidence for Xp21 location of Duchenne muscular (DMD) locus X;9 translocation in a female with DMD *J.Med Genet.* 20:461-63. (1983)
- 12.- Boyd Y, Buckle VJ.; Cytogenetic heterogeneity of translocations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet* 29: 108-15. (1986)
- 13.- Murray JM, Davies KE, Harper P, et. al.; Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 300: 69-71.(1982)
- 14.- Francke U, Ochs HD, et al.; Minor Xp21 chromosomal deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa and McLeod syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 37: 250. (1985).
- 15.- Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA; Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X-chromosomal deletion. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82: 4778. (1985).
- 16.- Kunkel LM, et. al. ; Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 322: 73 (1986).
- 17.- Ray PN, Belfall B; Duff C, Logan C; Kean V, et. al.; Cloning of the breakpoint of an (X;21) translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 318:672-75 (1985).
- 18.- Thompson MW, Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C; Linkage analysis of polymorphisms within the DNA fragment XJ cloned from the breakpoint of an (X;21)

translocation associated with X linked muscular dystrophy. J.Med.Genet. 23:548-55. (1986)

19.- Monaco AP, Neve RL, Colleti-Feener C, Bertelson CJ, Durnit DM, Kunkel LM; Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gen. Nature 323: 646-50 (1986).

20.- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Freener C, Kunkel LM; Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 50:509-17 (1987)

21.- Van Ommen GJB, Bertelson C, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Bakker E, et. al.; Long-range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: Isolation and use of J66 (DXS268) a distal intragenic marker. Genomics 1:329-36. (1987).

22.- Gigenkrantz H, Hugnot JP, Lambert M, Chafey P, Kaplan JC, Kahn A; Positive and negative regulatory DNA elements including a CCArGG box are involved in the cell type-specific expression of the human muscle dystrophin gene. J. Biol. Chem. 267: 10823. (1992)

23.- Boyce FM, Beggs AH, Freener C, Kunkel LM; Dystrophin is transcribed in brain from distant upstream promotor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 1276 (1991).

24.- Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ; Expression of four alternative transcripts in brain regions regulated by different promoters. Hum Mol Genet 1: 505. (1992).

25.- Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D; A 71 Kilodalton Protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other non muscular tissues. Proc Nat Acad Sci USA 89: 5346, (1992).

- 26.- Byers TJ, Lidov HGW, Kunkel LM; An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature genet.* 4:77, (1993).
- 27.- Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM; Detection of 98% of DMD/DMB gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 86:45. (1990).
- 28.- Koenig M, Hoffman EP, Betelson CJ, Monaco AP, Freener C, Kunkel LM; Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*:509. (1987).
- 29.- Scriver Ch R, Beaudet LA, Sly WS, Valle D; *The metabolic basis of inherited disease.* De McGraw-Hill. 7a. edición. 4195. (1994).
- 30.- Pizzuti A, Pierretti M, Fenwick RG, Gibbs RA, Caskey CT; A transposon-like element in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics* 13: 594, (1992).
- 31.- Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, et. al. ; Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science.* (1988) 242: 756-759.
- 32.- Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR; Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 16: 536. (1993)
- 33.- Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton R; Duplicational mutation at the Duchenne dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype-genotype correlation. *Am.J.Hum:Genet.* 46:682. (1990)
- 34.- Hu XY, Pay PN, Worton; Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J* 10: 2471. (1991).

- 35.- Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M; Searching for the 1 in 2,400,000: A Review of dystrophin gene point mutations. *Human mutation*, 4: 1-11. (1994).
- 36.- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM; The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 66: 1121-1131, (1988).
- 37.- Tinsley JM, Blake DJ, Pearce M, Knight AE, Kendrick-Jones J, Davis EK; Dystrophin and related proteins. *Curr Opin Gen Dev*, 3: 484-490, (1993).
- 38.- Brown CS, Lucy JA; Dystrophin as a mechanochemical transducer in skeletal muscle. *BioEssays*, 15:413-419, (1993).
- 39.- Sokabe M, Sachs F and Jng Z; Quantitative video microscopy of patch clamped membranes: stress, strain, capacitance and stretch channel activation. *Biophys J*, 59:722-728, (1991).
- 40.- Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, et. al.; Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol*, 262:356-363, (1992).
- 41.- Byers TJ, Kunkel LM, and Watkins SC; The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol*. 115: 411-421, (1991)
- 42.- Clerk A, Strong PN, Sewry CA; Characterisation of dystrophin during development of human skeletal muscle. *Development*, 114: 395, (1992).
- 43.- Worton RG, Brooks MH; The X-linked Muscular Dystrophies. The Metabolic basis of inherited diseases. R. Scriver. De. McGraw-Hill. 140:4195-4217, 8a. ed. (1994).
- 44.- Ozawa E, Yoshida M, Susuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y, Noguchi S. Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.*; 4:1711-16. (1995)

- 45.- Ibraghimov BO, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355: 696-702 (1992).
- 46.- Matsumura K, Tome FM, Collin H, Azibi K, Chaouch M, Kaplan J-C, Fardeau M, Campbell KP: Deficiency of the 50K Dystrophin-associated Glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* , 359:320-322, (1992).
- 47.- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* ; 66: 1121 (1991).
- 48.- Adams M, Butler M, Dwyer T, Peters M, Mumane S. Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* ; 11: 531-540 (1993).
- 49.- Ahn A, Yoshida M, Anderson M, Frenner C, Selig S, Hagiwara Y, Ozawa E, Kunkel L. A1 a distinct 59kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome Bq23-24. *Pro Natl Acad Sci USA*; 91: 4446-4450 (1994).
- 50.- Worton R. Muscular dystrophies: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science*; 270: 755-756 (1995).
- 51.- Gowers WR; Pseudo-Hypertrophy muscular paralysis a clinical lecture. *J. London and Churchill* . (1879).
- 52.- Rapaport D, Passos Bueno MR, Brandao L, et. al.; Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy, *Am J Med Genet* 39:437, (1991).
- 53.-Emery AEH. *Duchenne Muscular Dystrophy: 2nd ed.* New York, Oxford University Press 1993.

- 54.- Worton RG, Thomson MW. Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Genet* 1989; 22: 601-629.
- 55.- Worton RG, Brooks MH. The X-linked Muscular Dystrophies. The Metabolic basis of inherited diseases: in R. Scriver; 8a. ed. De. McGraw-Hill, 1994: 4195-4217.
- 56.- Melis MA, Cau M, Congiu R, Puddu R, Muntoni F, Cao A; Germinal mosaicism in a Duchenne muscular dystrophy family: implications for genetic counselling. *Clin Genet* 43:247-249, (1993).
- 57.- Bakker E, van Broeckhoven C, Grootsholten PM, Bonten EJ, van Ommen GJ, Pearson PL; Germinal Mosaicism increases the recurrence risk for "new" Duchenne muscular dystrophy mutations. *J. Med. Genet.* 26: 553 (1989).
- 58.- Beggs AH, Neumann PE, Arahata K, Arikawa E, Nonaka Y, Anderson MS, Kunkel LM; Possible influences on the expression of X chromosome-linked dystrophin abnormalities by heterozygosity for autosomal recessive Fukuyama congenital muscular dystrophy, 89:623-627, (1991).
- 59.- Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, Nonaka Y, Sugita H and Arahata K; The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 41: 1491-1496 (1991).
- 60.- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Res.* 16: 11141-11156 (1988)
- 61.- Roberts RG, Barby TF, Manners E, Bobrow M, Bentley DR; Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin RNA in peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 298, (1991).

- 62.- Nicholson LV, Johanson MA, Gardner MD, Bhattacharya S, Harris JB; Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 80:239, (1990)
- 63.- Robles FM; Proteína Cinasa C: Mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular. *Boletín de educación bioquímica*, 11: 5-21. (1992).
- 64.- Gruemer HD, Miller WG, Chinchilli VM, Leshner RT, Blasco PA, Hassler CR, Nance WE; Prediction of carrier status in Duchenne dystrophy by cretin kinase measurement. *Am J Clin Pathol* 84:655-658, (1985).
- 65.- Dubowitz V; Muscle Biopsy - a practical approach 2nd ed. London, Bailliere Tindall, (1985).
- 66.- Daube JR; Electrodiagnosis of muscle disorders in Engels AG, and Bankers BQ, (eds). *Miology*. New York. McGraw-Hill, p 1195 (1986).
- 67.- Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, De Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular Dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 49: 951-960 (1991).
- 68.- Arenas A.D; Análisis molecular del gen de la distrofia muscular de Duchenne. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. (1996), p:52-54.
- 69.- Lidov HGW, Selig S, Kunkel LM; Dp140 a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* (1995) 4: 329-335.
- 70.- Coral V.R., Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman S, Salamanca F, Montañez C; Analysis of Dystrophin gene deletions in patients from the mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Archives of medical research* (1993) 24 (1): 1-6.

71.- Riggs AD, Pfeifer PG; X-Chromosome inactivation and cell memory. TIG (1992). 8 (5); 169-174.

72.- Migeon B.; The postulated X-inactivation Center at Xq27 is the most reasonably explained by ascertainment bias: heterozygous expression of recessive mutations is a powerful means of detecting unbalanced X inactivation. Am J Hum Genet (1993). 52; 431-432.