



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

2ej-

CAMPUS IZTACALA

"DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE EN CINCO FAMILIAS MEXICANAS. MEDIANTE LA AMPLIFICACION DE REPETIDOS VARIABLES DE CA DEL GEN DMD. POR MEDIO DE ENSAYOS NO RADIOACTIVOS"

T E S I S

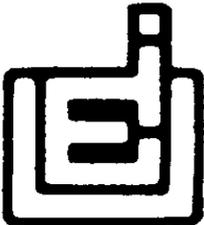
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

RAFAEL MARTINEZ GALLEGOS

ASESOR: DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA



MEXICO. D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

26473A



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

LIBRARY OF THE
SALUD DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA
EN CIENCIAS QUÍMICAS



REPORTE DE INVESTIGACIONES
DE LA ESCUELA DE QUÍMICA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
EN EL AÑO DE 1964

1 2 3 4 5

6 7 8 9 10

11 12 13 14 15

16 17 18 19 20

21 22 23 24 25

26 27 28 29 30

32 33 34 35 36

ESTE TRABAJO SE LO DEDICO A:

Papá y Mamá que siempre han dirigido mis pasos en los momentos mas importantes de mi vida

Male y Alejandro por ofrecerme su cariño y apoyo

Cristi y Jaime por sus consejos y motivación

Ricardo, Shadia, Oliver y Jazmin por su apoyo incondicional

Mónica por ofrecerme su paciencia, ternura y comprensión

Pancho, Efra, Pedro, Javier y Miguel por estar siempre que los necesito

Diego por ser un amigo, maestro y darme la confianza y oportunidad de seguir mi formación. Un ejemplo a seguir en todos los aspectos.

AGRADEZCO:

A la Universidad por la formación que me ha inculcado

A mis profesores por compartir conmigo su conocimiento

A mis compañeros por su enseñanza y confianza

A mi escuela por los momentos inolvidables que me ofreció

A todas aquellas personas que de uno u otro modo intervinieron en la realización de este trabajo

Y sobre todo a los niños con distrofia y a sus familiares quienes valientemente afrontan este problema

El constante devenir del todo.....

Papá

Cada logro es el resultado de la dureza con que uno mismo se trata.....

Nietzsche

Las cosas siempre suceden por algo.....

Mónica

Si todo saliera siempre como lo planeamos la vida seria demasiado aburrida....

RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad degenerativa del tejido muscular, se presenta en una incidencia de 1/3500. La distrofia muscular de Becker (DMB) tiene una progresión menos severa y tiene una incidencia de 1/30000. Ambas alteraciones se deben a mutaciones en el gen DMD. Este gen es el mas grande reportado, posee al menos 6 promotores. El producto del gen, la distrofina tiene cuatro dominios y su función es mantener la integridad de la membrana celular durante la contracción muscular.

El objetivo del presente trabajo fue implementar el diagnóstico de portadoras para la distrofia muscular de Duchenne en familias mexicanas utilizando marcadores con repetidos de CA. Estos ensayos se realizaron sin utilizar isótopos radioactivos con la finalidad de hacerlos mas rápidos y económicos.

Para poder obtener un diagnóstico con una certeza del 99% se manejaron 3 marcadores: 5' DYS-II, STR-44 y DMD1c-2, localizados en las regiones 5', intron 44 y 3' respectivamente del gen DMD.

En una familia no se pudo realizar el diagnóstico porque solo un marcador fue informativo. En otra familia con estos métodos se detectó un fenómeno de recombinación que posiblemente haya tenido lugar en el punto caliente menor del gen DMD.

El marcador DMD1c-2 fue homocigoto en todos los individuos estudiados, posiblemente por un rasgo característico de la población mexicana.

ABREVIATURAS

μ Ci micro Curies
CA, repetidos. Repetidos de citosina adenina
cDNA. Acido desoxiribonucleico complementario
CM. Centimorgans
CPK. Creatinina fosfoquinasa
dCTP 5'-[α -³²P]. Citosina marcada en la posición alfa con fósforo 32
dCTP. Deoxirribonucleótido trifosfato citosina
DEGEN. Electroforesis de geles desnaturizantes con gradiente
DMB. Distrofia muscular de Becker
DMD. Distrofia muscular de Duchenne
DMD1c-2. Marcador localizado en el extremo 3' del gen DMD
DNA. Acido desoxiribonucleico
dNTP. Deoxirribonucleótido trifosfato
Dp. Proteínas distrofina
DYS-II. Marcador localizado en el extremo 5' del gen DMD
EAM. Minicromosoma de adenovirus encapsulado
IQ. Coeficiente de inteligencia
Kb. Kilobase
KDa. Kilodaltones
Mdx ratones. Modelo animal de la DMD
MyoD. Gen que induce miogénesis
ng. Nanogramos
PAGE. Geles de poliacrilamida
Pb. Pares de bases
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
RCLB. Solución de lisis de eritrocitos
RFLPs. Fragmentos de restricción polimórficos en su tamaño
RNA. Acido ribonucleico
RNAm. Acido ribonucleico mensajero
RT-PCR. PCR utilizando transcriptasa reversa
SSA. Secretaría de Salubridad y Asistencia
SSCP. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
STR. Secuencias cortas Repetidas en Tandem
STR-44. Marcador localizado en el intron 44 del gen DMD
TAE. Amortiguador Tris-acetato
TBE. Amortiguador tris-borato
TEMED. N,N,N',-tetrametiletildiamina
VNTRs. Secuencias variables repetidas en tandem

INDICE

INTRODUCCION	1
EI GEN	2
EL TRANSCRITO	4
LA PROTEINA	5
DISTROFINA EN DIVERSOS TEJIDOS	9
<i>Músculo cardíaco</i>	9
<i>Músculo liso</i>	9
<i>Retina</i>	9
<i>Retardo mental</i>	9
PATOLOGIA	10
DIAGNOSTICO	11
PRUEBAS INDIRECTAS	11
<i>Análisis de pedigree</i>	11
<i>Determinación de niveles de creatinina cinasa</i>	11
<i>Fragmentos de restricción polimórficos en su tamaño</i>	12
PRUEBAS INDIRECTAS	13
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	13
<i>Anticuerpos</i>	14
<i>Sondas de cDNA del gen DMD</i>	15
<i>PCR Múltiplex</i>	15
<i>Múltiplex fluorescente</i>	15
<i>Proteína truncada</i>	16
<i>RT- PCR</i>	16
<i>Secuencias variables repetidas en tandem</i>	16
<i>Limitaciones</i>	17
<i>Antecedentes de la enfermedad</i>	17
<i>Marcadores en homocigosis</i>	17
<i>Mosaicismo germinal</i>	17
DIAGNOSTICO PRENATAL	18
<i>Biopsia de vellosidades coriónicas</i>	18

<i>Amniocentesis</i>	18
<i>Inducción de miogénesis</i>	18
<i>Eritrocitos nucleados</i>	19
TERAPIAS	19
<i>Introducción del gen normal en células no funcionales</i>	19
<i>Transplante de mioblastos</i>	20
<i>Inyección del gen DMD en tejido muscular</i>	20
JUSTIFICACION	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
METODOS	22
INDIVIDUOS ESTUDIADOS	22
EXTRACCION DE DNA GENOMICO	22
AMPLIFICACION NO RADIOACTIVA DE STR-44	23
AMPLIFICACION RADIOACTIVA DE STR-44	24
AMPLIFICACION NO RADIOACTIVA DE 5'DYS-II	24
AMPLIFICACION RADIOACTIVA DE 5'DYS-II	25
AMPLIFICACION NO RADIOACTIVA DE DMD1c-2	26
AMPLIFICACION RADIOACTIVA DE DMD1c-2	26
GELES DE AGAROSA AL 4.5%	27
GELES DE POLIACRILAMIDA AL 8%	28
GELES DESNATURALIZANDES DE POLIACRILAMIDA-UREA AL 6%	29
RESULTADOS	30
OBTENCION DE UN BANCO GENOMICO	30
ESTANDARIZACION DE TECNICAS	31
DIAGNOSTICO DE PORTADORAS	33
MARCADORES INTRAGENICOS	37
DISCUSION	37
REFERENCIAS	43

INTRODUCCION

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) fue descrita por primera vez en 1860 por el fisiólogo francés G. Duchenne de Boulogne. Es una miopatía hereditaria recesiva ligada al cromosoma X por lo que afecta solo a varones. Tiene una incidencia de un niño afectado de cada 3500 nacidos.

La enfermedad aparece entre las edades de 3 a 5 años, se caracteriza por dificultad para subir escaleras, ponerse de pie y andar a una velocidad normal. Las pantorrillas presentan una pseudohipertrofia y se manifiesta dolor muscular. La creatinina fosfoquinasa (CPK) se encuentra en niveles elevados (50 veces más de lo normal). La pérdida progresiva de fuerza en las piernas lo lleva a permanecer en silla de ruedas entre los 7 y 12 años.

La pérdida de movilidad puede ser gradual o rápida. La debilidad de los brazos procede al de las piernas, comenzando proximalmente y extendiéndose a los músculos distales. Después de permanecer en silla de ruedas los pacientes tienden a desarrollar contracción en los brazos y piernas, seguido por una escoliosis progresiva. La muerte ocurre usualmente en la segunda década de la vida por una severa insuficiencia respiratoria debido a debilitamiento intercostal ó por insuficiencia del miocardio^{30,49,61}.

La distrofia muscular de Becker (DMB), se caracteriza por una progresión menos severa que DMD. Se define a un paciente DMB cuando camina después de los 12 años de edad^{39,59}. Su incidencia es de 1 en 30000 varones y rara vez presentan retardo mental.

Algunos pacientes DMB se les ha diagnosticado una atrofia muscular espinal o distrofia de cadera. Algunas veces solo estudiando el gen involucrado es cuando se puede realizar un diagnóstico preciso, principalmente cuando se carece de historia familiar^{37,39,59}.

EL GEN

El gen de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) se aisló mediante la técnica de clonaje posicional, la cual consiste en buscar un gen a partir de alguna alteración específica en el fenotipo o cariotipo y seguirla mediante técnicas moleculares³⁹. Con este procedimiento se han aislado diversos genes involucrados en varias enfermedades genéticas de humanos, tales como el mal de Huntington ó la Ataxia. El gen DMD es el mayor de los conocidos actualmente, se encuentra conformado por 2.3 millones de nucleótidos dispuestos en 79 exones y se localiza, en la región 21 del brazo corto del cromosoma X²⁹ (figura 1). En pacientes DMD el patrón de mutaciones en el gen se distribuye de la siguiente manera: grandes deleciones y duplicaciones 65%, mutaciones sin sentido 18%, pequeñas deleciones e inserciones 9% y mutaciones en sitios de empalme 9%^{30,49}. En pacientes DMB el patrón de mutaciones en el gen es de la siguiente manera: grandes deleciones y duplicaciones 85%, mutaciones sin sentido 8% y mutaciones en sitios de empalme 7%^{30,49}. En ambos casos las deleciones se encuentran distribuidas a lo largo del gen principalmente en dos regiones que corresponden solo a 2 Kb del transcrito^{32,60}.

En el gen DMD se obtiene la evidencia de dos puntos calientes de recombinación y de deleción, un punto caliente mayor que se encuentra abarcando la parte proximal del intrón 44 y el exon 50, y un punto caliente menor que se encuentra entre el promotor de la distrofina y el exon 8 (figura 1)⁴¹.

En pacientes DMB y DMD la cantidad del DNA perdido por mutaciones no correlaciona con la severidad clínica. Se ha observado que existen grandes mutaciones que producen un fenotipo DMB, y por el contrario, mutaciones puntuales que producen fenotipo DMD. Este fenómeno se explica mediante la "hipótesis del marco de lectura" la cual predice que una mutación puede romper o no el marco de lectura del gen DMD. Si la mutación es grande pero el marco de lectura se mantiene en fase se produce una proteína pequeña semifuncional, en cambio, mutaciones puntuales que rompen el marco de lectura producen una proteína truncada no funcional²⁷.

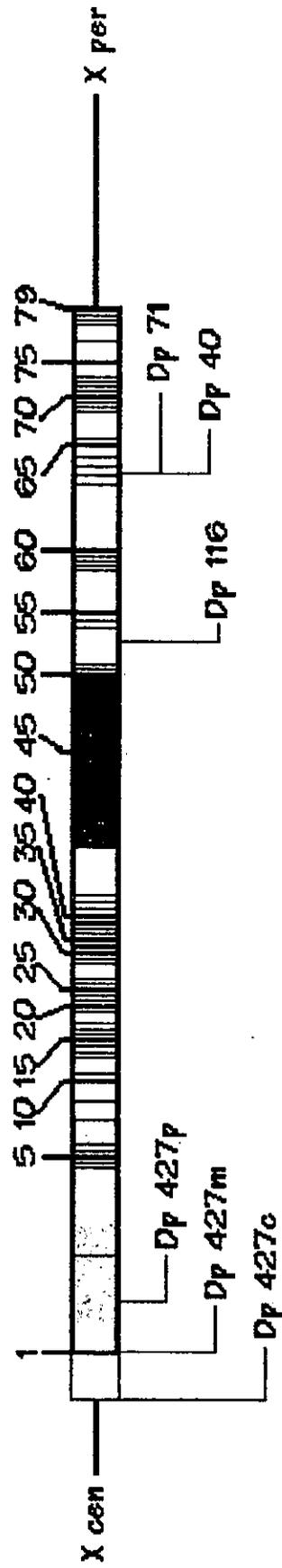


Figura 1. Mapa físico del gen DMD, localizado en la banda 21 del brazo P del cromosoma X. La líneas verticales representan los exones, ordenados en grupos de 5. En la parte inferior se muestra la posición de los 6 promotores diferentes encontrados a lo largo del gen. En color claro se muestra el punto caliente menor y en color oscuro el punto caliente mayor

EL TRANSCRITO

El gen DMD codifica para un mRNA de aproximadamente 14 Kb⁵⁸. En 1987 se secuenció el cDNA de músculo esquelético. La secuencia de aminoácidos sugirió que la proteína producida puede tener un papel estructural en el músculo⁶. El nivel más alto de transcripción se encuentra en el músculo esquelético representando de un 0.02 a un 0.1% del RNA muscular total, a su vez se presentan niveles bajos en músculo liso y en cerebro con una abundancia de 5% y 1% respecto al músculo esquelético⁴⁹. La expresión del gen DMD se encuentra bajo una elaborada transcripción y un control de procesamiento.

ISOFORMAS PRODUCIDAS POR EL GEN DMD

NOMBRE	SINONIMO	mRNA	PESO	LOCALIZACION
Distrofina muscular	Dp 427m	14 KB	427 kDa	Músculo liso cardiaco y esquelético
Distrofina cerebral	Dp 427c	14 KB	427 kDa	Neuronas corticales
Distrofina de células de Purkinge	Dp 427p	14 KB	427 kDa	Células cerebrales de Purkinge
Apo-distrofina-1	Dp 71	4.8 KB	70-80 kDa	Cerebro y tejidos musculares.
Apo-distrofina-2	Dp 116	5.6 KB	116 kDa	Algunas líneas celulares de Glia Células de Schwann
Apo-distrofina-3	Dp 40	2.2 KB	40 kDa	Cerebro y Tejidos no musculares

Tabla 1. Se presentan las diferentes proteínas y transcritos producidos en el gen DMD, así como su localización..

Dp = proteínas distrofina, kB = kilobases, kDa = kilodaltones.

Al menos posee 6 promotores independientes, tres promotores expresan a la distrofina completa, tres promotores expresan los últimos dominios (figura 1). Seis exones de la región carboxilo terminal son procesados alternativamente, produciendo isoformas. En la tabla 1 se esquematizan los diferentes RNAm que produce el gen DMD y su localización en diferentes tipos celulares ^{4,9,10,13,52,55}.

LA PROTEINA

En 1987 Hoffman y colaboradores identificaron el producto del gen DMD tanto en humanos como en ratones, utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas de fusión con diferentes dominios de la proteína²⁹. La proteína denominada distrofina tiene un tamaño de 427 kD y representa aproximadamente el 0.002% de la proteína total del músculo estriado. La proteína también fue detectada en músculo liso de estómago²⁹. Está formada de 3,685 aminoácidos distribuidos en 4 dominios distintos; un dominio amino-terminal, un dominio central similar a la espectrina (componente de membrana y citoesqueleto de eritrocitos), un dominio rico en cisteína y un dominio carboxilo-terminal.

El dominio amino-terminal posee una secuencia y función similar a la α -actinina una proteína que se une a la actina²⁴. La α -actinina es una componente normal de los filamentos de actina en músculo liso y esquelético y puede estar involucrada tanto en la unión cruzada de la F-actina con los filamentos, así como conectar los elementos filamentosos del citoesqueleto a la membrana celular (figura 2) ^{33,35,49}.

El dominio central presenta 24 repetidos, cada unidad consiste en tres hélices formadas de cuatro a cinco repetidos de aminoácidos hidrofóbicos. Estos se encuentran separados por regiones ricas en prolina formando estructuras superenrolladas. Se observan cuatro

Al menos posee 6 promotores independientes, tres promotores expresan a la distrofina completa, tres promotores expresan los últimos dominios (figura 1). Seis exones de la región carboxilo terminal son procesados alternativamente, produciendo isoformas. En la tabla 1 se esquematizan los diferentes RNAm que produce el gen DMD y su localización en diferentes tipos celulares ^{4,9,10,13,52,55}.

LA PROTEINA

En 1987 Hoffman y colaboradores identificaron el producto del gen DMD tanto en humanos como en ratones, utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas de fusión con diferentes dominios de la proteína²⁹. La proteína denominada distrofina tiene un tamaño de 427 kD y representa aproximadamente el 0.002% de la proteína total del músculo estriado. La proteína también fue detectada en músculo liso de estómago²⁹. Está formada de 3,685 aminoácidos distribuidos en 4 dominios distintos; un dominio amino-terminal, un dominio central similar a la espectrina (componente de membrana y citoesqueleto de eritrocitos), un dominio rico en cisteína y un dominio carboxilo-terminal.

El dominio amino-terminal posee una secuencia y función similar a la α -actinina una proteína que se une a la actina²⁴. La α -actinina es una componente normal de los filamentos de actina en músculo liso y esquelético y puede estar involucrada tanto en la unión cruzada de la F-actina con los filamentos, así como conectar los elementos filamentosos del citoesqueleto a la membrana celular (figura 2) ^{33,35,49}.

El dominio central presenta 24 repetidos, cada unidad consiste en tres hélices formadas de cuatro a cinco repetidos de aminoácidos hidrofóbicos. Estos se encuentran separados por regiones ricas en prolina formando estructuras superenrolladas. Se observan cuatro

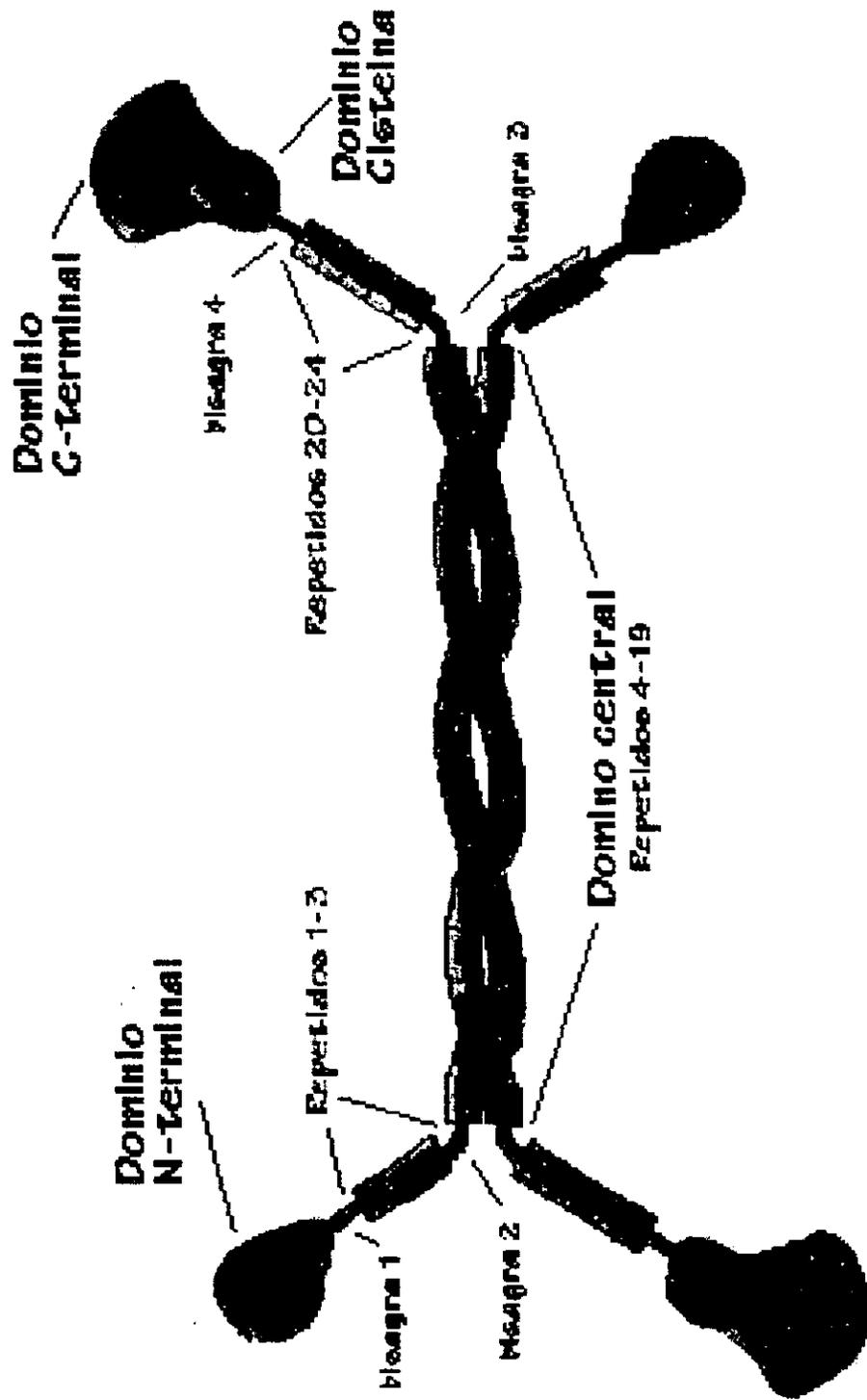


Figura 2. Representación de un homodímero de distrofina marcando los cuatro dominios: amino terminal, dominio central, dominio rico en cisteína y dominio carboxilo terminal. En el dominio central se observan 4 bisagras entre el dominio amino y el repetido 1, entre los repetidos 3 y 4, 19 - 20 y el repetido 24 con el dominio cisteína.

con DMD. Se ha estimado que una tercera parte de los pacientes DMD poseen un retardo mental con un IQ menor a 75. La deficiencia mental no es progresiva y su grado al parecer es fijado a cierta edad. En forma general, la discapacidad parece ser específica en ciertas tareas, tales como razonamiento verbal y comprensión de frases.^{49,61}

PATOLOGIA

Al intervenir directamente en la estabilidad de las membranas musculares la ausencia de la distrofina provoca la salida de componentes intracelulares como son enzimas musculares, entre ellas se encuentra la creatinina fosfocinasa, por esta razón se observa en pacientes con DMD una elevada tasa de esta enzima en sangre. Por otro lado la misma inestabilidad de la membrana muscular provoca la entrada de elementos extracelulares, entre ellos se encuentra el calcio, este ion provoca una excesiva contracción de algunas sarcomeras, mientras que al mismo tiempo provoca el estiramiento excesivo de las sarcomeras próximas, todo esto da como resultado la ruptura de miofilamentos, además el calcio activa proteasas intracelulares que posiblemente ocasionan necrosis celular.

La desestabilización de la membrana de las fibras musculares ocasiona ciclos de regeneración constante. La degeneración del músculo ejerce una fuerte demanda de mioblastos de modo que el músculo pierde gradualmente la facultad de regenerarse por lo que en poco tiempo las fibras musculares se necrosan. Llega el momento en que la región necrosada no puede ser regenerada y en su lugar se observa el desarrollo de tejido fibroso cicatrizal (fibrosis endomesial), en lugar tejido muscular. El tejido fibroso cicatrizal provoca que el músculo se "ahogue" ya que no permite la revascularización del tejido³⁰.

Otros factores pueden interferir en la muerte celular, como la pérdida de otros componentes del complejo glicoproteico asociado a la distrofina que no se encuentren envueltos directamente en interacción con la lámina basal⁴⁹.

con DMD. Se ha estimado que una tercera parte de los pacientes DMD poseen un retardo mental con un IQ menor a 75. La deficiencia mental no es progresiva y su grado al parecer es fijado a cierta edad. En forma general, la discapacidad parece ser específica en ciertas tareas, tales como razonamiento verbal y comprensión de frases.^{49,61}

PATOLOGIA

Al intervenir directamente en la estabilidad de las membranas musculares la ausencia de la distrofina provoca la salida de componentes intracelulares como son enzimas musculares, entre ellas se encuentra la creatinina fosfocinasa, por esta razón se observa en pacientes con DMD una elevada tasa de esta enzima en sangre. Por otro lado la misma inestabilidad de la membrana muscular provoca la entrada de elementos extracelulares, entre ellos se encuentra el calcio, este ion provoca una excesiva contracción de algunas sarcomeras, mientras que al mismo tiempo provoca el estiramiento excesivo de las sarcomeras próximas, todo esto da como resultado la ruptura de miofilamentos, además el calcio activa proteasas intracelulares que posiblemente ocasionan necrosis celular.

La desestabilización de la membrana de las fibras musculares ocasiona ciclos de regeneración constante. La degeneración del músculo ejerce una fuerte demanda de mioblastos de modo que el músculo pierde gradualmente la facultad de regenerarse por lo que en poco tiempo las fibras musculares se necrosan. Llega el momento en que la región necrosada no puede ser regenerada y en su lugar se observa el desarrollo de tejido fibroso cicatrizal (fibrosis endomesial), en lugar tejido muscular. El tejido fibroso cicatrizal provoca que el músculo se "ahogue" ya que no permite la revascularización del tejido³⁰.

Otros factores pueden interferir en la muerte celular, como la pérdida de otros componentes del complejo glicoproteico asociado a la distrofina que no se encuentren envueltos directamente en interacción con la lámina basal⁴⁹.

DIAGNOSTICO

Como en el caso de otras enfermedades genéticas la cura de la distrofia muscular de Duchenne aun no se ha logrado, por lo que a manera de prevención se recurre al diagnóstico de afectados y de portadoras. El diagnóstico es importante ya que proporciona información sobre el riesgo de que ocurra o se repita una enfermedad genética en una familia, así mismo, se puede conocer la manera en que se hereda dicha enfermedad y con ello dar consejo genético a las familias afectadas ^{19,36,49}. El resultado del diagnóstico puede advertir el riesgo probable de tener hijos con DMD. La información obtenida puede ayudar a los padres decidir (con ayuda de consejo genético) el futuro de su familia ⁴⁹.

Para el diagnóstico de la Distrofia Muscular de Duchenne se han desarrollado diversas técnicas que se pueden agrupar en tres categorías principales: pruebas indirectas, pruebas directas y diagnóstico prenatal.

PRUEBAS INDIRECTAS

Este tipo de pruebas se llevan a cabo cuando no se han identificado mutaciones en el varón afectado ó en una portadora potencial:

Análisis de pedigree. Tomando como referencia los hijos nacidos sanos y enfermos de mujeres potencialmente portadoras y la forma de segregación de la enfermedad se puede inferir el riesgo de transmitir la enfermedad ¹⁶.

Determinación de los niveles de creatinina cinasa (CPK) en el suero. Los niveles de ATP:creatinina-N-fosfotransferasa (CPK) en suero fue la prueba más usada para la detección de portadoras en la década de los 60's y 70's. Con esta técnica se pueden detectar entre un 70 y 75% de portadoras. Debido a la variabilidad en las muestras del mismo sujeto se tienen que utilizar al menos tres estimaciones de CPK de cada mujer en

riesgo. Por otro lado esta prueba no se puede realizar en la pubertad, ya que los niveles de CPK en mujeres portadoras son demasiado altos, de esta manera la prueba se pospone a una edad mas madura ²⁶.

Debido a que los niveles de la enzima varían en algunos sujetos, cuando se realizan mediciones a tiempos diferentes y a que los niveles de la creatinina cinasa en mujeres normales y portadoras obligadas se sobrelapan, la prueba no es precisa. ^{5,10,12,23}.

Fragmentos de restricción polimórficos en su tamaño (RFLP's). Se han descrito un gran número de marcadores genético asociados al gen DMD y se usan en familias con antecedentes de la enfermedad para trazar, mediante ligamiento, el cromosoma en riesgo. Los RFLP's son marcadores genéticos que segregan junto con el gen de interés, cuanto más cerca se encuentre un marcador del gen menor será su índice de recombinación y será mayor su confiabilidad en el diagnóstico.

Existen diversos RFLP's en el brazo corto del cromosoma "X", a una distancia de entre 3 y 20 centimorgans (cM) del gen DMD. Debido al gran tamaño y a la alta frecuencia de recombinación reportada para este gen, el diagnóstico molecular mediante RFLP's se dificulta, presentando un rango de error de entre el 5 y 10%. Para evitar este punto es necesario emplear de 10 a 20 marcadores tratando de cubrir todo el locus, con lo que la certeza de esta prueba aumenta hasta un 99%. Esta metodología solo se puede aplicar en familias con antecedentes de la enfermedad ^{5,16,18,49,51,57}.

La información de las tres pruebas mencionadas anteriormente puede ser incorporadas utilizando el teorema de Bayes y de esta manera dar un diagnóstico definitivo. Sin embargo estos parámetros no proveen una prueba confiable para la detección de portadoras ^{16,26,49}.

PRUEBAS DIRECTAS:

Las pruebas directas se realizan en portadoras probables, es decir, mujeres que tienen un hermano o algún familiar cercano que presenta la enfermedad o portadoras obligadas, mujeres que ya han tenido al menos un hijo que presente dicha enfermedad o que mediante diagnóstico se haya comprobado su estado portador.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con la llegada de nuevas herramientas en la biología molecular se han podido realizar análisis mas precisos para la detección de portadoras. Una de estas herramientas es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se utiliza para amplificar un segmento de DNA que se encuentra entre dos regiones de secuencia conocida. Se utilizan dos oligonucleótidos que funcionan como "iniciadores" para una serie de reacciones de síntesis. Estos oligonucleótidos son secuencias complementarias a la muestra de DNA, flanqueando la zona que será amplificada. La muestra de DNA primero se desnaturaliza por calentamiento, después la reacción es enfriada a una temperatura que permite la alineación de los oligonucleótidos a la secuencia blanco. Después de que los oligonucleótidos se han alineado, éstos son polimerizados con una DNA polimerasa. Los productos de un ciclo de amplificación sirven como moldes para los ciclos siguientes y por lo tanto en cada ciclo sucesivo se duplica la cantidad de producto de una manera exponencial⁵⁰.

Para poder observar los productos de amplificación éstos se ponen en geles de agarosa o poliacrilamida. La agarosa es un polímero que se obtiene del alga que conforma los pastos marinos. La agarosa se disuelve adicionándola en una solución amortiguadora de corrida y calentándola. Una vez gelificada, forma una matriz en donde su densidad se encuentra determinada por la concentración de agarosa. Cuando un campo eléctrico se aplica a través del gel, la molécula de DNA que se encuentra cargada negativamente, migra al ánodo. La migración del DNA de doble cadena a través de la matriz del gel es en un rango inversamente proporcional al número de pares de bases. Las moléculas mayores migran

más lento por la fricción de arrastre y por que su paso a través de los poros es menos eficiente que las moléculas pequeñas.

La acrilamida es un monómero que cuando se encuentra en presencia de radicales libres, que usualmente son reemplazados por persulfato de amonio y estabilizados con N,N,N',-tetrametiletilendiamina (TEMED), produce una reacción en cadena en donde los monómeros de acrilamida se polimerizan en grandes cadenas. Cuando el agente bifuncional N,N'-metilbisacrilamida se incluye en la reacción, las cadenas de acrilamida se unen entre ellas formando un gel en donde la porosidad se encuentra determinada por la longitud de las cadenas y el grado de unión entre ellas. La ventaja que tienen estos geles es que su poder de resolución es tal, que pueden separar moléculas de DNA que tienen una diferencia mínima de un 0.2% (1 pb por cada 500) ⁵⁰

Para visualizar las muestras de DNA en los geles, éstos se tiñen con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia que contiene un grupo planar que se intercala entre las pilas de bases de DNA. La fijación de este grupo y la proximidad a las bases produce la tinción del DNA al mostrar una fluorescencia incrementada. La radiación ultravioleta a 252 nm es absorbida por el DNA y transmitida al bromuro. La energía captada por el bromuro es reemitida a 590 nm en la región del rojo-naranja del espectro visible ⁵⁰.

Anticuerpos. Una vez que la proteína causal de alguna enfermedad se ha descubierto se pueden sintetizar anticuerpos contra ella, éstos pueden utilizarse para conocer la distribución de la proteína en los tejidos afectados por la enfermedad, este procedimiento se puede realizar mediante dos técnicas diagnósticas, hibridación Western (inmunotransferencia) y la inmunohistoquímica. En el caso de DMD, se utilizan anticuerpos policlonales para detectar a la distrofina. Los más utilizados reconocen las regiones amino y carboxilo terminal de la proteína, ya que con ellos se obtiene un diagnóstico diferencial entre Duchenne y Becker. Con esta técnica se detecta el 100% de pacientes con DMD. Mediante inmunohistoquímica es posible detectar portadoras ya que se presentan fibras positivas y negativas para la distrofina. Esta técnica posee tres problemas, el primero

consiste en los criterios para distinguir una tasa normal de distrofina, ya que éstos son arbitrarios. Segundo, para realizar éstos ensayos se necesita obtener biopsias musculares lo cual resulta invasivo para los pacientes con DMD. Tercero, la muestra obtenida no representa a todos los grupos musculares ^{11,12,14,16,57}.

Sondas de cDNA del gen DMD. Se han utilizado sondas de cDNA para encontrar deleciones en pacientes con DMD. Mediante hibridaciones Southern éstas hibridan con el DNA genómico del paciente de tal forma que abarcan la mayor parte del gen. Las ventajas de este método es que puede detectar grandes deleciones. Sin embargo el método consume mucho tiempo, es laborioso y caro y no es útil para definir portadoras ^{15,16,32}.

PCR Múltiplex. Se han diseñado dos ensayos de amplificación múltiple para amplificar mediante PCR diferentes regiones del gen de la distrofina el 9-plex y el 5-plex. Estos fragmentos abarcan 17 exones y la región del promotor de la proteína muscular. Con el PCR múltiplex se pueden identificar entre 65%-70% de las mutaciones en pacientes con DMD. El método es rápido obteniéndose resultados en un día, además de que utiliza pequeñas cantidades de DNA del paciente. Sin embargo un resultado negativo no excluye que la deleción se encuentre en áreas no cubiertas ^{5,16,18,32,54}. Para resolver este problema se diseñó otro ensayo múltiplex, pero a diferencia de los anteriores este cubre completamente las áreas del punto caliente mayor que abarca desde el exon 44 hasta el exon 52. Con este método se pudieron identificar hasta un 87% de mutaciones en 59 pacientes analizados ^{19,34}.

Múltiplex fluorescente. Esta técnica se basa en el uso de oligonucleótidos marcados con fluorescencia, usados para amplificar repetidos CA del gen DMD (ver más adelante). Los productos del PCR son analizadas cualitativamente en un secuenciador automático de gran sensibilidad. De acuerdo a la intensidad de fluorescencia del producto de PCR se puede observar si existe alguna mutación en el segmento probado. Con esta técnica también se

pueden definir portadoras mediante hemiciogosis. El inconveniente de esta metodología es su alto costo⁵¹.

Proteína truncada. Basándose en el hecho de que algunas mutaciones puntuales alteran el marco de lectura para la traducción se desarrolló un ensayo en el cual se realiza una transcripción y traducción *in vitro* acoplada. Esta técnica elimina las alteraciones que no producen cambios patológicos que muchas veces son detectados mediante las metodologías comunes, muchos de estos cambios encontrados son únicamente polimorfismos del propio gen. Con ésta técnica se detectan todas aquellas mutaciones que interrumpen ó producen un codon de terminación, lo que da como resultado una proteína truncada o no funcional⁴⁹.

RT-PCR. Existen alteraciones en el gen DMD que no pueden ser detectadas por las metodologías tradicionales, con lo que se creería que el gen aparentemente se encuentra normal y sin embargo los pacientes son clínicamente DMD ó DMB. Para resolver este problema se desarrolló una técnica en la cuál a partir del mRNA del gen DMD se producen 10 fragmentos de cDNA. Si en un paciente DMD se detecta una variación en tamaño de alguno de los fragmentos es probable que posea una alteración la cuál es evidente al secuenciar esa región. El diagnóstico con esta técnica se lleva a cabo buscando la misma alteración en los familiares del paciente DMD. Con esta técnica además, se han detectado empalmes alternativos y grandes deleciones. Así mismo se encontró una correlación en las mutaciones encontradas con los fenotipos DMD y DMB, lo que corrobora la hipótesis del marco de lectura de Monaco⁴⁸.

Secuencias variables repetidas en tandem (VNTRs). Los análisis indirectos fueron superados por marcadores de tipo microsatélite. Existe una subclase de repetidos en tandem en el DNA de eucariontes compuestos de secuencias cortas (dC-dA)_n - (dG-dT)_n denominados repetidos (CA)_n pertenecientes a la subclase STR (Short Tandem Repeat)¹⁸. Se estima que en el genoma humano existen 50,000-100,000 bloques de estas

secuencias. La función de éstos repetidos es desconocida, sin embargo se ha propuesto que ellos pueden ser un soporte de recombinación ó bien, participar en regulación genética. Estos bloques polimórficos pueden ser amplificados por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ⁵⁶ y ser utilizados como marcadores genéticos ya que son altamente polimórficos y se heredan en forma mendeliana clásica.

Se han descrito al menos 11 regiones de repetidos CA dentro del gen DMD. Tres en la región 3', cuatro en el extremo 5' y otros cuatro localizados en los intrones 44, 45, 49 y 50 del gen. Estos marcadores se utilizan para hacer estudios de ligamiento en familias con antecedentes de DMD y así poder definir portadoras para esta enfermedad^{18,21,49}. Al igual que en los RFLP's el riesgo de recombinación existe³², sin embargo el diagnóstico es confiable cuando se manejan al menos tres regiones diferentes del gen, así mismo, se ha especulado en su uso, ya que la diferencia entre alelos llega a ser de solo 2 pb, razón por la cual se dificulta el diagnóstico en geles de agarosa ⁵¹. Este problema se resuelve utilizando geles de poliacrilamida de alta resolución.

Limitaciones

Las limitaciones que poseen las técnicas directas son:

- **No existir antecedentes de la enfermedad en la familia.** Si se practica el diagnóstico en familias sin antecedente familiares se puede dar un diagnóstico erróneo, ya que el paciente puede tener una mutación *de novo*.

- **Estado de homocigosis para los marcadores utilizados.** Si los marcadores utilizados se presentan en homocigosis los datos no son informativos, porque no se puede observar la forma de segregación de la enfermedad.

- **Mosaicismo germinal.** Al presentarse mosaicismo germinal el diagnóstico no funciona, porque unos tejidos presentan la enfermedad por poseer el gen alterado, mientras que otros tejidos serán normales.

DIAGNOSTICO PRENATAL

Dos de tres casos de niños con DMD son primogénitos en sus familias. En el pasado se prevenía el nacimiento de un niño afectado por DMD cuando una mujer con un alto riesgo de ser portadora evitaba la preñez o interrumpía la gestación en todos los fetos masculinos debido a su forma de herencia. Las nuevas técnicas ofrecen la detección más exacta de la enfermedad en fetos, lo que permite la posibilidad de ofrecer consejo genético adecuado ²⁶.

El diagnóstico prenatal se utiliza en portadoras probables u obligadas.

Biopsia de vellosidades coriónicas. En la muestra obtenida se pueden practicar las técnicas descritas para el análisis directo, a excepción de las pruebas de inmunohistoquímica ¹⁶.

Amniocentesis. Hasta la 16a semana de gestación la amniocentesis es el método comúnmente utilizado para obtener muestras prenatales. A partir del cultivo de amniocitos se obtiene el material para poder realizar estudios citogenéticos y de DNA. Al igual que en el método anterior también se pueden realizar los métodos descritos para pruebas directas, como PCR multiplex, multiplex fluorescente, proteína truncada, RT-PCR y VNTR's para diagnóstico prenatal ²⁶.

Inducción de miogénesis. La expresión de distrofina se puede inducir en fibroblastos, amniocitos y células coriónicas de villus mediante la transfección de un vector que lleva el gen MyoD que induce miogénesis. Las células de los pacientes DMD o de fetos afectados no expresan distrofina cuando son inducidas por el gen MyoD. Este método es de gran valor para la diagnóstico prenatal y general, sobre todo en situaciones donde la mutación del gen no pueden ser detectadas por técnicas de PCR e hibridaciones Southern. Sin embargo este método no puede utilizarse en el diagnóstico de portadoras ²².

Eritrocitos nucleados. Varias células fetales tales como eritrocitos y leucocitos circulan en la sangre materna. Existen eritrocitos nucleados que no son muy comunes en la sangre periférica en adultos, sin embargo en la edad fetal son muy abundantes. Se desarrolló un método en el cuál por medio de gradientes de densidad discontinua se pueden aislar estos eritrocitos nucleados de la sangre materna.

Una vez obtenidos es posible realizar pruebas de PCR para amplificar diversas regiones del gen DMD y con ello poder realizar diagnóstico prenatal. Este método presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que no es invasivo para el feto, la prueba se puede realizar entre las semanas 8 y 20 de gestación y anula por completo la contaminación de las muestras ⁵³.

TERAPIAS

Hasta la fecha no existe un tratamiento que pueda disminuir el ritmo degenerativo de la miopatía de Duchenne, en general se han trabajado tres métodos terapéuticos para DMD:

Introducción del gen normal en las células no funcionales. El problema que presenta este método es encontrar un vehículo adecuado para la introducción del cDNA de la distrofina muscular que posee un tamaño de 14 kb. Se han desarrollado varias estrategias para solucionar este problema: en 1993 se descubrió, al estudiar pacientes con DMB, que una porción más pequeña del gen es necesaria para producir una proteína más pequeña pero funcional. Este gen es de tan solo 6.3 kb y tiene deletada la fracción que abarca del exón 17 al 48 la cuál codifica para los repetidos de la región central de la proteína.

El minigen fue colocado en un adenovirus serotipo 5 y fue inyectado en ratones mdx. Estos ratones presentaron la expresión de la proteína hasta 13 semanas en un 20% ⁴⁶. En otros trabajos se clonó el minigen en el retrovirus recombinante RV-BN1, logrando en ratones

Eritrocitos nucleados. Varias células fetales tales como eritrocitos y leucocitos circulan en la sangre materna. Existen eritrocitos nucleados que no son muy comunes en la sangre periférica en adultos, sin embargo en la edad fetal son muy abundantes. Se desarrolló un método en el cuál por medio de gradientes de densidad discontinua se pueden aislar estos eritrocitos nucleados de la sangre materna.

Una vez obtenidos es posible realizar pruebas de PCR para amplificar diversas regiones del gen DMD y con ello poder realizar diagnóstico prenatal. Este método presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que no es invasivo para el feto, la prueba se puede realizar entre las semanas 8 y 20 de gestación y anula por completo la contaminación de las muestras ⁵³.

TERAPIAS

Hasta la fecha no existe un tratamiento que pueda disminuir el ritmo degenerativo de la miopatía de Duchenne, en general se han trabajado tres métodos terapéuticos para DMD:

Introducción del gen normal en las células no funcionales. El problema que presenta este método es encontrar un vehículo adecuado para la introducción del cDNA de la distrofina muscular que posee un tamaño de 14 kb. Se han desarrollado varias estrategias para solucionar este problema: en 1993 se descubrió, al estudiar pacientes con DMB, que una porción más pequeña del gen es necesaria para producir una proteína más pequeña pero funcional. Este gen es de tan solo 6.3 kb y tiene deletada la fracción que abarca del exón 17 al 48 la cuál codifica para los repetidos de la región central de la proteína.

El minigen fue colocado en un adenovirus serotipo 5 y fue inyectado en ratones mdx. Estos ratones presentaron la expresión de la proteína hasta 13 semanas en un 20% ⁴⁶. En otros trabajos se clonó el minigen en el retrovirus recombinante RV-BN1, logrando en ratones

mdx, una producción de distrofina del 4% en 9 meses²⁰. Recientemente se pudo diseñar un minicromosoma de adenovirus encapsulado (EAM) como vehículo. Los EAM son derivados de plásmidos bacterianos los cuales poseen dos orígenes de replicación invertidos a lo largo del genoma, también poseen señales de empaquetamiento, un gen reportero (β -galactosidasa) y una capacidad de 35 kb para DNA exógeno. Con este vector se logró introducir el cDNA completo de la distrofina muscular, así como su promotor específico. Ensayos realizados en células de ratones mdx mostraron la capacidad de los EAM de introducirse y expresar el gen de la distrofina⁴⁷.

Transplante de mioblastos. Esta técnica consiste en inyectar mioblastos normales en músculos deficientes en distrofina. Los mioblastos se fusionan a las fibras musculares afectadas produciendo la distrofina. En los ratones mdx se encontró una producción de entre el 30% y 40% de la tasa normal de la distrofina lo cual es bastante alentador, sin embargo ésta técnica tiene varios problemas al aplicarla al hombre: primero, se necesita prevenir la subsecuente necrosis del tejido, segundo, las cantidades de distrofina que se necesitan en humanos son de al menos 25%³⁰, tercera, se necesita la aplicación de inmunosupresores para que el sistema inmune del paciente no rechace los mioblastos y cuarto, debido a que la migración de los mioblastos en el músculo tratado es de apenas unos milímetros, se tendría que realizar inoculaciones de los mioblastos a distancia no mayores de un centímetro^{44,40}.

Inyección del gen DMD en el tejido muscular. En 1991 se demostró que puede entrar DNA desnudo (cDNA del gen DMD) a la fibra muscular del ratón mdx. Sin embargo los resultados obtenidos fueron pobres, ya que sólo se expresó la distrofina del 1-3% de las fibras musculares inyectadas¹.

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico molecular de la DMD mediante VNTR's utiliza isótopos radioactivos. El uso de radioactividad implica un alto costo no solo en reactivos, sino en una infraestructura adecuada para su uso y resguardo.

Al estandarizar la forma no radioactiva en estos ensayos se reducen notablemente los costos ya que los reactivos utilizados se encuentran generalmente en cualquier laboratorio de Biología Molecular. El diagnóstico se realiza con mayor rapidez y no es necesario disponer de áreas especiales para el manejo y resguardo de los productos radioactivos.

OBJETIVO GENERAL

1.-Implementar el diagnóstico molecular de la Distrofia Muscular de Duchenne en cinco familias mexicanas mediante la amplificación no radioactiva de repetidos de CA localizados en las regiones 5', 3' e intrón 44 del gen DMD.

OBJETIVOS PARTICULARES

Implementar la técnica de extracción de DNA genómico a partir de leucocitos por medio de SDS y NaCl_2 .

Obtener un banco de DNA genómico de individuos afectados con DMD/DMB y de sus familiares.

Implementar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa no radioactiva.

Identificar portadoras para la DMD/DMB mediante el diagnóstico molecular, en familias con antecedentes de DMD/DMB.

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico molecular de la DMD mediante VNTR's utiliza isótopos radioactivos. El uso de radioactividad implica un alto costo no solo en reactivos, sino en una infraestructura adecuada para su uso y resguardo.

Al estandarizar la forma no radioactiva en estos ensayos se reducen notablemente los costos ya que los reactivos utilizados se encuentran generalmente en cualquier laboratorio de Biología Molecular. El diagnóstico se realiza con mayor rapidez y no es necesario disponer de áreas especiales para el manejo y resguardo de los productos radioactivos.

OBJETIVO GENERAL

1.-Implementar el diagnóstico molecular de la Distrofia Muscular de Duchenne en cinco familias mexicanas mediante la amplificación no radioactiva de repetidos de CA localizados en las regiones 5', 3' e intrón 44 del gen DMD.

OBJETIVOS PARTICULARES

Implementar la técnica de extracción de DNA genómico a partir de leucocitos por medio de SDS y NaCl₂.

Obtener un banco de DNA genómico de individuos afectados con DMD/DMB y de sus familiares.

Implementar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa no radioactiva.

Identificar portadoras para la DMD/DMB mediante el diagnóstico molecular, en familias con antecedentes de DMD/DMB.

METODOS

INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Las muestras sanguíneas de los enfermos DMD y sus familiares fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Ortopedia SSA. Todos los individuos nacieron en México. El individuo índice de cada familia fue diagnosticado clínicamente, confirmado por criterios de laboratorio ya establecidos. A todas las personas estudiadas se les hizo saber los objetivos del presente estudio y por medio de una carta consentimiento aceptaron participar en él. Se estudiaron a 17 personas distribuidas en 5 familias.

EXTRACCION DE DNA GENOMICO

La extracción de DNA genómico se realizó empleando SDS y NaCl³¹. De 5 a 7 ml de sangre periférica se le adicionaron 0.7 ml de EDTA al 5% como anticoagulante. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Los tubos se sacaron con cuidado y con una micropipeta de 1ml se sacó la interfase de leucocitos colocándolos en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se les añadió la solución de lisis para eritrocitos RCLB (Tris pH 7.6 10 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM) se agitó fuertemente ó se resuspendió con la micropipeta, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y se repitió el lavado con RCLB hasta que la pastilla de leucocitos estuviera blanca, ó hasta que la solución de lisis no estuviera turbia.

Una vez terminado el lavado, la pastilla de leucocitos fue resuspendida en 800 µl de NaCl 5mM, se le agregaron 45 µl de SDS al 10% agitando fuertemente, después se le agregaron 300 µl de NaCl saturado agitando nuevamente fuertemente. El tubo se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min. Transcurrido el tiempo se tomó con una micropipeta el sobrenadante, depositándolo en otro tubo eppendorf. Para realizar la extracción fenólica se añadieron 400 µl de fenol cloroformo isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 15000 rpm durante 4 min. Se

tomó el sobrenadante con una micropipeta teniendo cuidado de no extraer la interfase de proteínas. Este paso se repitió una vez más. El sobrenadante fue pasado a otro tubo eppendorf en donde se le añadió dos volúmenes de etanol absoluto, se agitó suavemente hasta que el DNA se precipitara. Se centrifugó a 15000 rpm durante 4 min y se decantó el etanol, el tubo se volteó y se dejó que se evaporara el alcohol. Para lavar la pastilla se añadieron 200 µl de etanol al 70%, centrifugando a 15000 rpm por 3 min, este paso se repitió una vez más, y se dejó secar la pastilla. El DNA se resuspendió en 100 µl de agua desionizada. Para observar su integridad y concentración se sometió una alicuota a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% ³¹.

AMPLIFICACION NO RADIOACTIVA DEL MARCADOR STR - 44

Para la zona intermedia del gen se eligió el marcador STR-44 localizado en el intron 44. La técnica se realizó en base a los ensayos descritos por Clemens ¹⁸. La secuencia de los oligonucleótido utilizados fue:

DMD44/A TCCAACATTGGAAATCACATTTCAA
DMD44/B TCATCACAAATAGATGTTTCACAG

La reacción se realizó de la siguiente manera: En 15 µl de volumen final de reacción se mezclaron de 200 a 500 ng de DNA genómico, 1.5 µl de solución amortiguadora Cetus 10X (Tris-Hcl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM y MgCl₂ 15 mM), 0.2 mM de cada de deoxoribonucleótido trifosfato, 6.6 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5 U de taq polimerasa y 15 µl de aceite mineral. La reacción de PCR se llevó a cabo en el Robocycler Gradient 40 de la marca Stratagene y en el termociclador PTC-100 de MJ Research Inc de la siguiente manera: Calentamiento inicial a 94°C por 4 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación a 62°C por 30 seg y polimerización a 65°C por 2 min, el tiempo final de incubación fue a 65°C por 7 min.

Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota de 10 μ l mezclándola con la mitad de su volumen de colorante de corrida (EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0.1% y xileno cianol 0.1%) y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4.5% o de poliacrilamida al 8%.

AMPLIFICACIÓN RADIOACTIVA DEL MARCADOR STR- 44

Se realizaron ensayos radioactivos como control positivo de la técnica. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones reportadas originalmente por Clemens y colaboradores ¹⁸. Las condiciones fueron las mismas que en el ensayo no radioactivo a excepción de utilizar 20 ng de DNA, 0.2 mM de cada de deoxoribonucleótido trifosfato, excepto dCTP que se adiciona 10 veces menos, 2 μ Ci de dCTP 5'-[α -³²P], 15 pmoles de cada oligonucleótido y 1 U de taq polimerasa.

Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota (5 a 6 μ l) y se mezcló con la mitad de su volumen de colorante de corrida (98% de formamida, 10 mM de EDTA, 0.1% de azul bromofenol y 0.1% cianol xileno) se calentó la muestra a 94°C durante 3 min y se sometió a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%. Al terminar la electroforesis, el gel se fijó por 30 min en un baño de metanol y ácido acético al 10%, se secó y se le colocó una película autoradiográfica dejándolo de entre 12 a 72 hrs en exposición a -72°C.

AMPLIFICACIÓN NO RADIOACTIVA DEL MARCADOR 5' DYS - II

Para la región 5' del gen DMD se eligió el marcador s'DYS-II localizado en el promotor de la distrofina cerebral. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a los ensayos reportados por Feener y colaboradores ²¹. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Dys II 5' TCTTGATATATAGGGATTATTTGTGTTTGTATAC 3'
Dys II 5' ATTATGAAACTATAAGGAATAACTCATTTAGC 3'

En 50 μ l de volumen final de reacción se mezclaron: 250 a 300 ng de DNA genómico, 5 μ l de buffer Cetus 10X (Tris-HCl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM y MgCl₂ 15 mM), 0.2 mM de cada deoxirribonucleótido trifosfato, 1.2 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5 U de taq polimerasa y 50 μ l de aceite mineral. La reacción de PCR se llevó a cabo en el Robocycler Gradient 40 de la marca Stratagene y en el termociclador PTC-100 de MJ Research Inc de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 24 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 55°C por 30 seg y polimerización a 63°C por 4 min, la extensión final fue a 63°C por 10 min.

Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota de 10 μ l mezclándola con la mitad de su volumen de colorante de corrida y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4.5% o de poliacrilamida al 8%.

AMPLIFICACION RADIOACTIVA DEL MARCADOR 5'DYS - II

Como control positivo se realizaron ensayos radioactivos siguiendo las condiciones originales reportadas por Feener y colaboradores ²¹. Los pasos fueron semejantes al ensayo no radioactivo a excepción de utilizar 150 ng de DNA genómico, 0.2 mM de cada deoxirribonucleótido trifosfato, excepto dCTP que se adicionó 10 veces menos, 2 μ Ci de dCTP 5'-[α -³²P],

Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota (5 a 6 μ l) y se mezcló con la mitad de su volumen de colorante de corrida, se calentó la muestra a 94°C durante 3 min y se sometió a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%. Al terminar la electroforesis, el gel se fijó por 30 min en un baño de metanol y ácido acético al 10%, se secó y se le colocó una película autoradiográfica dejándolo de entre 12 a 72 hrs en exposición a -72°C.

AMPLIFICACIÓN NO RADIOACTIVA DEL MARCADOR DMD 1c- 2

Para la región 3' se eligió el marcador denominado DMD1c-2 localizado entre los exones 56 y 60 del gen DMD. La reacción se realizó de acuerdo a Powell y colaboradores ⁴⁵. Los oligonucleótidos utilizados fueron:



La reacción se realizó de la siguiente manera: en 30 μ l de volumen final de reacción se añadieron 300 ng de DNA genómico, 3 μ l de solución amortiguadora Cetus 10X (Tris-HCl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM y MgCl₂ 15 mM), 0.2 de cada deoxirribonucleótido trifosfato, 15 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5 U de taq polimerasa y 15 μ l de aceite mineral. La reacción de PCR se llevó a cabo en el Robocycler Gradient 40 de la marca Stratagene y en el termociclador PTC-100 de MJ Research Inc de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 6 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 min, alineamiento a 50°C por 2 min y polimerización a 72°C por 1 min, el tiempo final de incubación fue a 65°C por 5 min.

Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota de 10 μ l mezclándola con la mitad de su volumen de colorante de corrida y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 4.5% o de poliacrilamida al 8%.

AMPLIFICACIÓN RADIOACTIVA DEL MARCADOR DMD1c-2

Como en los ensayos anteriores como control positivo se realizaron ensayos radioactivos siguiendo las condiciones originales reportadas por Powell y colaboradores ⁴⁵. Se siguieron los mismos pasos que el ensayo no radioactivo a excepción de utilizar 100 ng de DNA genómico, 0.2 de cada deoxirribonucleótido trifosfato, excepto dCTP que se adicionó 10 veces menos, 2 μ Ci de dCTP 5'-[α -³²P],

Una vez terminada la reacción se tomó una alícuota (5 a 6 μ l) y se mezcló con la mitad de su volumen de colorante de corrida se calentó la muestra a 94°C durante 3 min y se sometió a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%. Al terminar la electroforesis, el gel se fijó por 30 min en un baño de metanol y ácido acético al 10%. se secó y se le colocó una película autoradiográfica dejándolo de entre 12 a 72 hrs en exposición a -72°C.

GELES DE AGAROSA AL 4.5% ⁵⁰.

Ya que el tamaño de los productos de amplificación en los tres marcadores se encuentran en el rango de 174 a 355 pares de bases ^{18,21,45} fue necesario implementar geles que tuvieran una resolución adecuada para separarlos.

Para separar eficazmente moléculas lineales de DNA en geles de agarosa entre 174 y 355 pares de bases se utiliza preferentemente concentraciones por arriba de 4% ⁵⁰. Para evitar impurezas que repercutieran en la migración del DNA se utilizó agarosa MS-8 (Pronadisa) la cual tiene una temperatura de gelificación baja, lo que permite preparar agarosas concentradas que favorecen la separación de fragmentos pequeños de DNA. Al realizar los ensayos se observó que la concentración con mejor resolución era al 4.5%.

Se preparó agarosa al 4.5% en solución amortiguadora TAE 1X (0.04 M Tris-acetato y 0.089 M EDTA) de la siguiente manera. Se pesaron 4.5 gramos de agarosa y se depositaron en un matraz elenmayer de 300 ml, llevándolo a un volumen de 100 ml con buffer TAE 1X. La solución se calentó en horno de microondas por 1 minuto. El matraz se dejó enfriar en baño María hasta que las burbujas salieran de la solución. La agarosa se agregó en un carro de electroforesis añadiendo 25 μ l de una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1 mg/ml y se colocó el peine. El gel se puso a 4°C durante 30 ó 40 minutos.

Una vez solidificada la agarosa se quitó el peine y se colocó el carro en una cámara de electroforesis con 300 ml de buffer TAE 1X. Se tomaron alicuotas de 5 a 10 μ l de los productos de PCR y se mezclaron con la mitad de su volumen de colorante de corrida. El gel se corrió a un voltaje de 100 volts por 3.5 horas. Terminada la electroforesis el gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta y se le tomó una fotografía mediante el Sistema de Imagen Digital IS-1000 de Alpha Innotech Corporation.

GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 8% ⁵⁰.

Para aumentar la resolución en los productos de amplificación se realizaron geles de poliacrilamida. Para separar eficientemente bandas en el rango de 50 a 300 pares de bases se utilizaron estos geles en una concentración al 8%

Los vidrios, los separadores y el peine para electroforesis se limpiaron primero con etanol absoluto y después se lavaron con dextran, se enjuagaron y se dejaron secar. Se colocaron entre los vidrios separadores de 1.5 mm de grosor asegurándolos con sujetadores a los extremos. La parte inferior del gel se selló con cinta adhesiva o con agarosa. En un vaso de precipitado de 100 ml se colocaron 10 ml de acrilamida al 40 %, 10 ml de TBE 5X (0.089 M Tris-borato y 0.089 M Acido bórico) y 30 ml de agua desionizada, se agitó y en seguida se le añadieron 400 μ l de persulfato de amonio al 10% y 30 μ l de TEMED (N,N,N',-tetrametiletildiamina).

La solución se agregó rápidamente entre los vidrios cuidando de no formar burbujas. Se colocó un peine de 1.5 mm de grosor en la parte superior de los vidrios y se dejó polimerizar el gel de 40 a 50 min. Una vez polimerizado se quitaron los sujetadores de los extremos, se quitó cuidadosamente el peine y se colocaron los vidrios en una cámara de electroforesis sujetándolos con clips. Una vez armada la cámara, se agregó el buffer de

corrida TBE1X cuidando de que el buffer estuviera en contacto con el gel y se lavaron los pozos. Se tomaron alícuotas de 5 a 10 μ l de los productos de PCR y se mezclaron con la mitad de su volumen de colorante de corrida y se corrió a un voltaje de 150 durante 2.5 horas.

Al terminar la electroforesis se desarmó el sistema con cuidado. El gel se tiñió sumergiéndolo en una solución a 0.5 mg/ml de bromuro de etidio durante 5 min. El gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta y se le tomó una fotografía mediante el Sistema de Imagen Digital IS-1000 de Alpha Innotech Corporation.

GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA-UREA AL 6% ⁵⁰.

Los vidrios, los separadores y el peine para electroforesis se limpiaron primero con etanol absoluto y después se lavaron con dextran, se enjuagaron y se dejaron secar. Se colocaron entre los vidrios separadores de 0.3 mm de grosor asegurándolos con sujetadores a los extremos. La parte inferior del gel se selló con cinta adhesiva o con agarosa. En un vaso de precipitado de 100 ml se colocaron 7.5 ml de acrilamida al 40 %, 10 ml de TBE 5X, 21 gr de urea y 30 ml de agua desionizada, se agitó y en seguida se le añadieron 400 μ l de persulfato de amonio al 10% y 30 μ l de TEMED.

La solución se agregó rápidamente entre los vidrios cuidando de no formar burbujas. Se colocó un peine de 0.3 mm de grosor de los denominados dientes de tiburón en la parte superior de los vidrios y se dejó polimerizar el gel de 40 a 50 min. Una vez polimerizado se quitaron los sujetadores de los extremos, se quitó cuidadosamente el peine y se puso este con los dientes hacia el gel, se colocaron los vidrios en una cámara de electroforesis sujetándolos con clips. Una vez armada la cámara, se agregó el buffer de corrida TBE1X cuidando de que el buffer estuviera en contacto con el gel y se lavaron los pozos.

El gel se recorrió durante media hora a 400 volts. Se tomaron alícuotas de 5 a 10 μ l de los productos de PCR y se mezclaron con la mitad de su volumen de colorante de corrida calentándolas durante 3 min a 94°C y enfriándolas inmediatamente en hielo. Se depositaron las muestras y el gel se corrió a un voltaje de 400 volts durante 2 horas. Al terminar la electroforesis se desarmó el sistema con cuidado. El gel se fijó por 30 min en un baño de metanol y ácido acético al 10% y se secó al vacío a 80°C durante 45 min.

Terminado el tiempo se le colocó una placa autoradiográfica y se dejó exponer de 12 a 72 hrs a -70°C. La placa se reveló y el patrón de bandas fue analizado mediante el Sistema de Imagen Digital IS-1000 de Alpha Innotech Corporation.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE UN BANCO GENOMICO

Se obtuvo el DNA de 25 individuos a partir de 5 a 10 ml de sangre como se describe en material y métodos, de los cuales diecisiete pertenecían a 5 familias con un miembro afectado por DMD y los restantes fueron muestras control. Una vez obtenido el DNA las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% para definir su concentración e integridad tal y como se muestra en la figura 3. La determinación de la concentración de DNA se hizo cualitativamente, comparando la intensidad de fluorescencia de la banda problema respecto a un control cuya concentración se conocía. Las muestras fueron rotuladas y guardadas a menos 20°C.

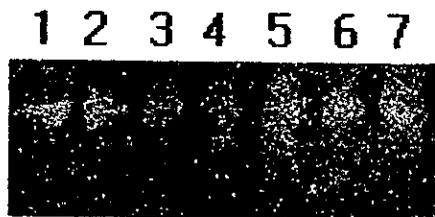


Figura 3. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 - 7 muestras de DNA control.

El gel se recorrió durante media hora a 400 volts. Se tomaron alicuotas de 5 a 10 μ l de los productos de PCR y se mezclaron con la mitad de su volumen de colorante de corrida calentándolas durante 3 min a 94°C y enfriándolas inmediatamente en hielo. Se depositaron las muestras y el gel se corrió a un voltaje de 400 volts durante 2 horas. Al terminar la electroforesis se desarmó el sistema con cuidado. El gel se fijó por 30 min en un baño de metanol y ácido acético al 10% y se secó al vacío a 80°C durante 45 min.

Terminado el tiempo se le colocó una placa autoradiográfica y se dejó exponer de 12 a 72 hrs a -70°C. La placa se reveló y el patrón de bandas fue analizado mediante el Sistema de Imagen Digital IS-1000 de Alpha Innotech Corporation.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE UN BANCO GENOMICO

Se obtuvo el DNA de 25 individuos a partir de 5 a 10 ml de sangre como se describe en material y métodos, de los cuales diecisiete pertenecían a 5 familias con un miembro afectado por DMD y los restantes fueron muestras control. Una vez obtenido el DNA las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% para definir su concentración e integridad tal y como se muestra en la figura 3. La determinación de la concentración de DNA se hizo cualitativamente, comparando la intensidad de fluorescencia de la banda problema respecto a un control cuya concentración se conocía. Las muestras fueron rotuladas y guardadas a menos 20°C.



Figura 3. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 - 7 muestras de DNA control.

ESTANDARIZACION DE TECNICAS

Con la finalidad de implementar la amplificación no radioactiva de 3 repetidos de CA del gen DMD primero se realizó un ensayo radioactivo para el marcador STR-44.

Se modificaron diversas variables, tales como concentraciones de DNA, $MgCl_2$, oligonucleótidos, enzima taq polimerasa así como también número de ciclos y temperatura de alineamiento. Cada una de las variables se movieron una a la vez. Se encontró que las condiciones óptimas para el ensayo fueron: concentración aproximada de DNA de 200 ng, concentración de oligonucleótidos 6.6 pmoles y 0.5 U de taq polimerasa (Gibco), 1.5mM de $MgCl_2$, 62°C de temperatura de alineamiento y 25 ciclos de reacción . En la figura 5-b se muestra el amplificado no radioactivo del marcador STR-44 en un individuo control. En este ensayo se probaron diferentes concentraciones de DNA, en donde en el carril 2 se obtuvo la mejor amplificación. Como un control positivo de la reacción se realizaron ensayos radioactivos, en la figura 5-a se observa en el carril 1 a una mujer control, mostrando dos bandas, en el carril 2 se muestra a un hombre control con una banda.

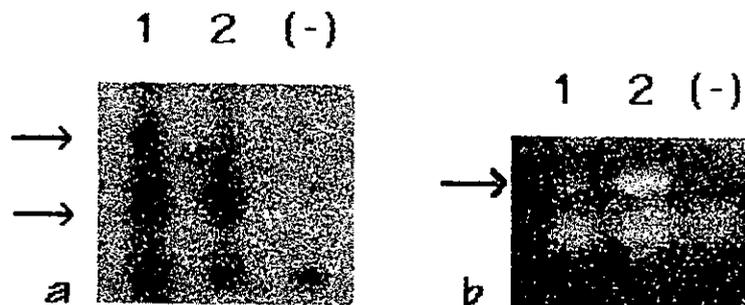


Figura 5. 5-a autorradiografía de un gel desnaturalizante de urea-poliacrilamida al 6% con productos de amplificación del marcador STR-44 en muestras control (flechas). Carril 1 mujer, carril 2 hombre, (-) control negativo. 5-b gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio con productos de la amplificación no radioactiva del marcador STR-44 de una muestra control (flecha). Carril 1 y 2 mismo individuo con diferentes concentraciones de DNA (-) control negativo.

Después de lograr la amplificación de los repetidos CA del marcador STR-44, el siguiente paso fue la amplificación de los repetidos CA del marcador 5'DYS-II. Se realizó un ensayo radioactivo de acuerdo a las condiciones reportadas por Fenner y colaboradores ²¹. Las variables que se modificaron para el ensayo no radioactivo fueron: número de ciclos, concentración de DNA, temperatura de alineamiento y concentración de oligonucleótidos. Se probaron las variables una a la vez. Las condiciones óptimas para realizar el ensayo fueron: una concentración de oligonucleótidos a 1.2 pmoles, concentración aproximada de DNA de 250 ng, una temperatura de alineamiento de 55°C, 0.5 ud de taq polimerasa y 24 ciclos. En la figura 6-b se observa la amplificación no radiactiva del marcador 5'DYS-II, los carriles 1 y 2 son mujeres ya que se logran separar adecuadamente dos bandas, en el carril 3 es un hombre y presenta una banda. Cabe señalar que las muestras del carril 2 y 3 son madre e hijo respectivamente, por lo que el patrón de bandas corresponde a la herencia. En la figura 6-a es un ensayo radioactivo realizado como control positivo de la reacción. El orden de las muestras es el mismo que en el ensayo no radioactivo.

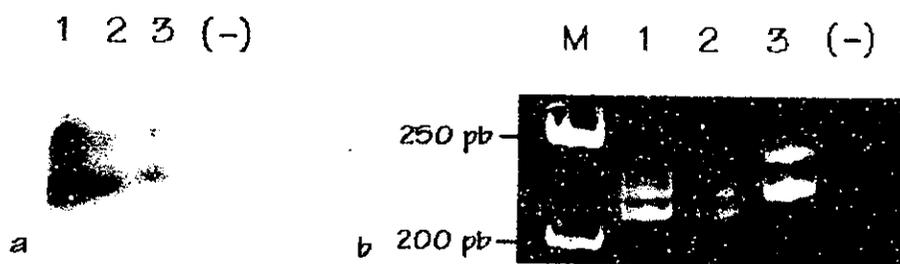


Figura 6. 6-a autorradiografía de un gel desnaturalizante de poliacrilamida-urea al 6% con productos de amplificación radioactiva del marcador 5'DYS-II. Carriles 1 y 2 mujeres, carril 3 hombre. 6-b se observa un gel de poliacrilamida al 6% teñido con bromuro de etidio con los productos de la amplificación no radiactiva del marcador 5'DYS-II. Carril 1 y 2 mujeres, carril 3 hombre, 2 y 3 son madre e hijo respectivamente. M = marcador peso molecular, (-) Control negativo.

Para la amplificación de repetidos CA del marcador DMD1c2 se realizaron los ensayos en base al método reportado por Powell ⁴⁵. Primero se realizaron ensayos radioactivos siguiendo las condiciones originales.

Las variables que se modificaron para el ensayo no radioactivo fueron: concentración de DNA, número de ciclos, concentración de oligonucleótidos y temperatura de alineamiento. Se encontró que las condiciones óptimas fueron: concentración de DNA a 300 ng, 25 ciclos, 15 pmoles de cada oligonucleótido, una temperatura de alineamiento de 50°C y 0.5 u de taq polimerasa. En la figura 7-b se observa la amplificación de repetidos CA del extremo 3', los cariles 1 y 2 son mujeres, sin embargo para este marcador ellas fueron homocigóticas, el mismo patron se presenta en la figura 7-a que es el mismo ensayo pero utilizando radioactividad.

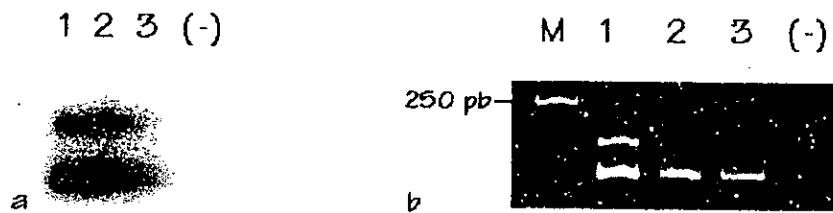


Figura 7. 7-a autorradiografía de un gel desnaturizante de poliacrilamida-urea al 6% con productos de amplificación de repetidos CA en la región 3'. Carril 1 y 2 dna de mujeres, Carril 3 DNA de un hombre. 7-b gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio con productos de la amplificación de repetidos CA del extremo 3' Carril 1 y 2 dna de mujeres, carril 3 dna de hombre. En ambos ensayos las mujeres fueron homocogotas para este marcador. M = marcador de peso molecular. (-) control negativo.

DIAGNOSTICO DE PORTADORAS

Los resultados de diagnóstico se ejemplifican en la familia 2 y en la familia 5. En la figura 8-a observamos los productos de la amplificación no radioactiva de los repetidos CA del marcador STR-44 de la familia 5. La madre I,1 es heterocigota para este marcador, su hijo II,2, que es paciente DMD, posee la banda superior, su hija II,1 posee la misma banda de su hermano y por lo tanto es portadora. En la figura 8-b observamos los productos de la amplificación no radioactiva de los repetidos CA del marcador 5'DYS-II de la familia 5. La

niña II,1 posee una banda que heredó de su padre I,2 y alguna de las dos bandas que heredó de su madre. Para este marcador la madre I,1 fue homocigota. Este marcador no fue informativo ya que se desconoce cual banda materna está relacionada con la enfermedad. En la figura 8-c los productos de la amplificación radioactiva de repetidos CA del marcador DMD1c-2 en la familia 5. Se observa que para todos los individuos este marcador fue homocigoto, y por lo tanto no fue informativo para el diagnóstico.

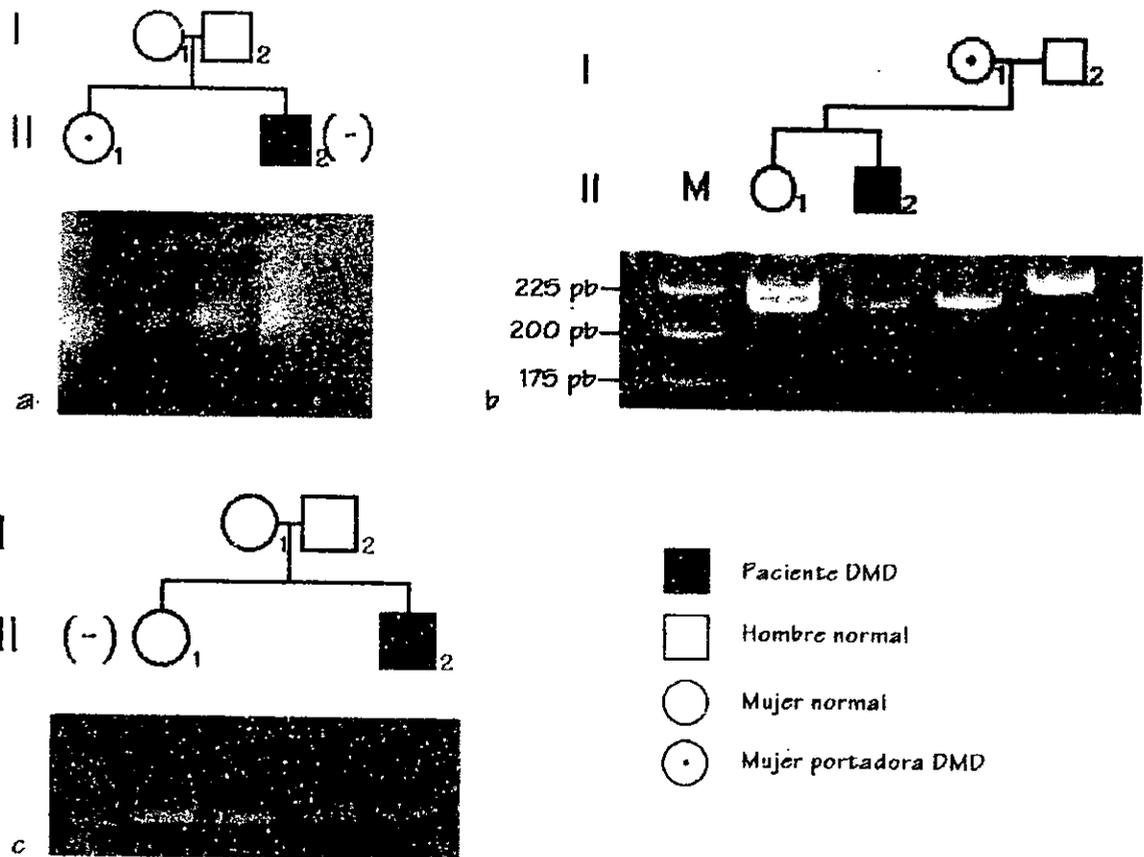


Figura 8. 8-a gel de agarosa al 4.5% teñido con bromuro de etidio con los productos de la ampliificación no radiactiva del marcador STR-44 de la familia 5. Se observa que la madre I,1 es heterocigota y su hija II,2 es portadora ya que posee la misma banda de su hermano II,2. 8-b gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio con los productos de la ampliificación no radiactiva del marcador 5' DYS-II de la familia 5. Este marcador no es informativo por que la madre I,1 fue homocigota. 8-c gel de acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio con los productos de la ampliificación no radiactiva del marcador DMD1c-2 en la familia 5. Para este marcador todos los individuos fueron homocigotos. M = marcador de peso molecular, (-) control negativo

En la figura 9-A se observa los productos de la amplificación no radioactiva de repetidos CA del marcador STR-44 en la familia 2. Se observa que la madre I,1 es heterocigota para este marcador, su hija II,2 posee el alelo inferior y su hijo II,1 posee el alelo superior, por lo que en este caso la niña no es portadora. En la figura 9-B observamos los productos de la amplificación no radiactiva de repetidos CA del marcador 5'DYS-II en la familia 2. Se observa que la madre I,1 fue heterocigota para este marcador, su hija II,2 posee el alelo superior y su hijo II,1 posee el mismo alelo, por lo que para este marcador la niña es portadora. Estos datos sugieren que se llevó a cabo un evento de recombinación entre el marcador 5'DYS-II y el marcador STR-44. En la figura 9-C se observa un gel de agarosa al 4.5% teñido con bromuro de etidio con los productos de la amplificación de repetidos CA del marcador DMD1c-2 en la familia 2. Se observa que para todos los individuos este marcador fue homocigoto y por lo tanto no fue informativo.

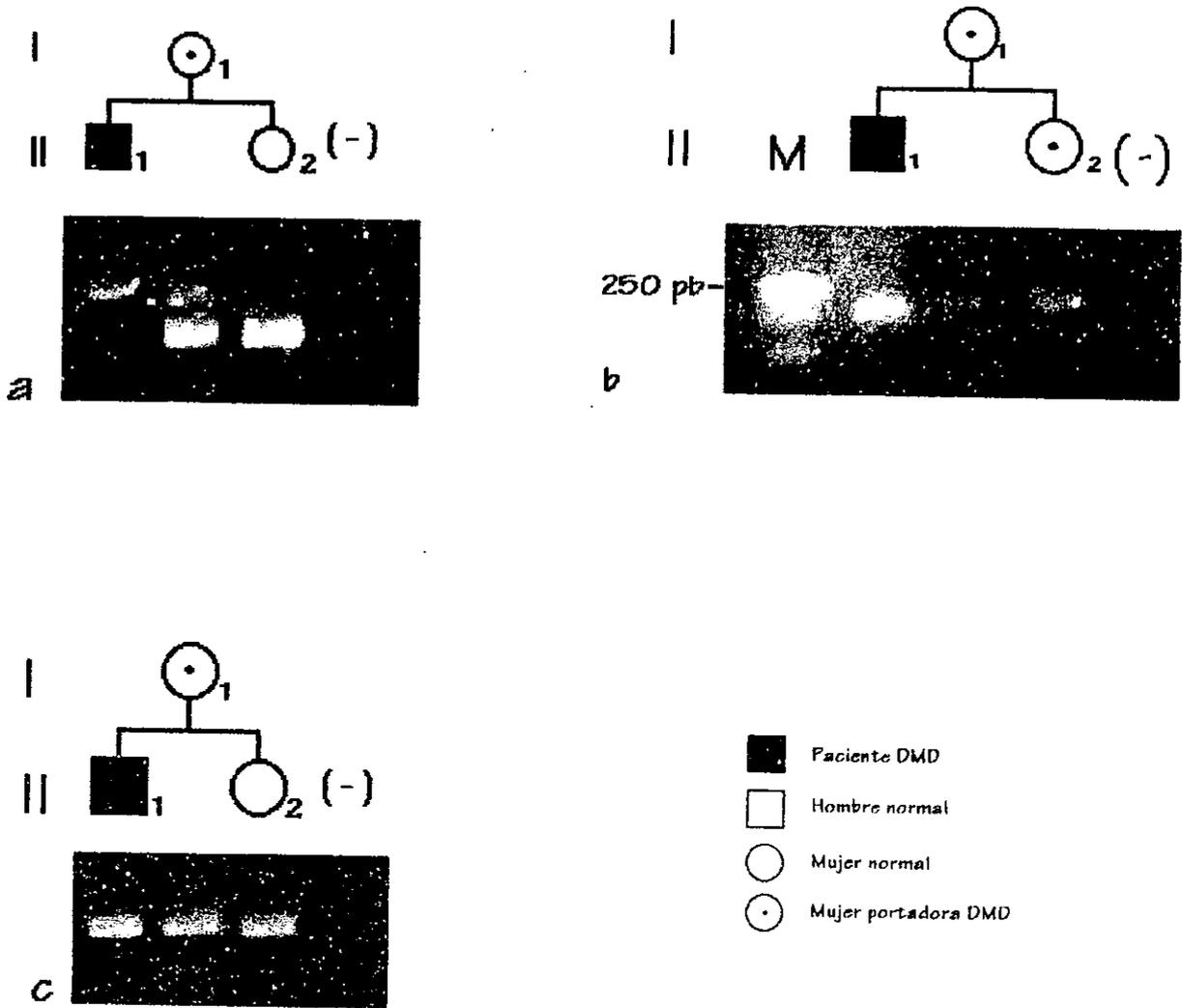


Figura 9. 9-A gel de agarosa al 4.5% teñido con bromuro de etidio con los productos de la amplificación no radioactiva del marcador STR-44 en la familia 2. La madre I,1 es heterocigota, y su hija II,2 no es portadora de DMD. 9-B gel de agarosa al 4.5% teñido con bromuro de etidio con los productos de la amplificación no radioactiva del marcador 5'DYS-II en la familia 2. La madre I,1 fue heterocigota para este marcador, su hija II,2 fue portadora para DMD. 9-C gel de agarosa al 4.5% teñido con bromuro de etidio con los productos de la amplificación no radioactiva del marcador DMD1c-2 en la familia 2. Para este marcador todos los individuos fueron homocigotos. M = marcador de peso molecular, (-) control negativo.

MARCADORES INTRAGENICOS

La heterocigosidad en los marcadores utilizados en este estudio se distribuyó de la siguiente manera: el marcador STR-44 fue heterocigoto en todos los individuos estudiados, el marcador 5' DYS-II fue heterocigoto a excepción de un individuo, y finalmente el marcador DMD1c-2 no fue heterocigoto en ningún individuo. En lo que respecta al diagnóstico, el marcador STR-44 fue el más informativo, seguido del marcador 5' DYS-II que falló en una de las familias. El marcador DMD1c-2 no fue informativo en ninguno de los casos.

DISCUSION

El método para obtener DNA fue adecuado, las concentraciones obtenidas fueron óptimas para realizar los ensayos y no se encontró degradado.

Con el principio del PCR se realizaron las modificaciones necesarias para que los ensayos con isótopos radioactivos se realizaran en la forma no radioactiva. Primero se tomó en cuenta que en los ensayos radioactivos se utilizan concentraciones mínimas de DNA, al reconocer la DNA polimerasa a los oligonucleótidos comienza la polimerización incorporando dCTP 5'-[α -32p] junto con los demás dNTPs a las nuevas cadenas de DNA, éstas al encontrarse en exposición ante una película autorradiográfica emiten radiación que es registrada y evidente al revelar las placas. Si se realiza un ensayo no radiactivo eliminando únicamente el isótopo radioactivo y manteniendo las demás condiciones no se logra ninguna amplificación, o al menos no es perceptible, por lo tanto, para estandarizar las técnicas a la manera no radioactiva lo que se necesita es aumentar la producción del amplificado. Esto se logra de varias maneras: 1) aumentando el número de ciclos, 2) aumentando la temperatura de alineamiento y 3) aumentando concentración de DNA³⁸. Al aumentar el número de ciclos aumentó la producción de bandas inespecíficas, ya que la acción de la enzima decae y se presentan errores en la adición de nucleótidos, estas bandas inespecíficas se pueden confundir o interferir con las amplificaciones

MARCADORES INTRAGENICOS

La heterocigosidad en los marcadores utilizados en este estudio se distribuyó de la siguiente manera: el marcador STR-44 fue heterocigoto en todos los individuos estudiados, el marcador 5' DYS-II fue heterocigoto a excepción de un individuo, y finalmente el marcador DMD1c-2 no fue heterocigoto en ningún individuo. En lo que respecta al diagnóstico, el marcador STR-44 fue el más informativo, seguido del marcador 5' DYS-II que falló en una de las familias. El marcador DMD1c-2 no fue informativo en ninguno de los casos.

DISCUSION

El método para obtener DNA fue adecuado, las concentraciones obtenidas fueron óptimas para realizar los ensayos y no se encontró degradado.

Con el principio del PCR se realizaron las modificaciones necesarias para que los ensayos con isótopos radioactivos se realizaran en la forma no radioactiva. Primero se tomó en cuenta que en los ensayos radioactivos se utilizan concentraciones mínimas de DNA, al reconocer la DNA polimerasa a los oligonucleótidos comienza la polimerización incorporando dCTP 5'-[α -32p] junto con los demás dNTPs a las nuevas cadenas de DNA, éstas al encontrarse en exposición ante una película autorradiográfica emiten radiación que es registrada y evidente al revelar las placas. Si se realiza un ensayo no radiactivo eliminando únicamente el isótopo radioactivo y manteniendo las demás condiciones no se logra ninguna amplificación, o al menos no es perceptible, por lo tanto, para estandarizar las técnicas a la manera no radioactiva lo que se necesita es aumentar la producción del amplificado. Esto se logra de varias maneras: 1) aumentando el número de ciclos, 2) aumentando la temperatura de alineamiento y 3) aumentando concentración de DNA³⁸. Al aumentar el número de ciclos aumentó la producción de bandas inespecíficas, ya que la acción de la enzima decae y se presentan errores en la adición de nucleótidos, estas bandas inespecíficas se pueden confundir o interferir con las amplificaciones

buscadas. Al aumentar la temperatura de alineamiento la incorporación de los oligonucleótidos es más específica porque favorece las uniones entre las purinas y las pirimidinas, con ello se eliminaron bandas inespecíficas pero no se aumentó el producto de amplificación. Al aumentar la concentración de DNA se dispuso de mayor muestra blanco para realizar la reacción, y por tanto se produjo mayor amplificación de los repetidos CA, con lo que fueron visibles en geles teñidos con bromuro de etidio.

Existen varias ventajas al utilizar la amplificación no radioactiva sobre la radioactiva, que permiten implementar esta metodología prácticamente en cualquier laboratorio de biología molecular. En la tabla 2 se ejemplifican las principales diferencias entre ambos métodos,

	RADIOACTIVO	NO RADIOACTIVO
Concentración de DNA para reacción	20 ng	200 a 300 ng
Sustratos radioactivos	dCTP 5'-[α -32p]	no utiliza
Equipo necesario para el manejo de muestras	mamparas, guantes, equipo de contención de desechos, equipo de contención de muestras, equipo de contención de isótopos, lugar exclusivo de trabajo.	Guantes, campana de flujo laminar
Tiempo empleado de trabajo	20 a 72 horas	8 horas
Visualización de amplificados	mediante exposición en placas autorradiográficas	geles de agarosa al 4.5% y geles de poliacrilamida al 8% teñidos con bromuro de etidio

Tabla 2. Principales diferencias entre el método radioactivo y el no radioactivo para amplificar regiones con repetidos CA.

El estado portador para la DMD, en mujeres en riesgo, se hacia mediante la determinación

de los niveles de creatinina fosfocinasa en suero, sin embargo esta prueba no aportaba datos precisos ya que los niveles de la enzima se sobrelapan en un individuo en diferentes tiempos ^{12,23,28,51}. Posteriormente se desarrolló la técnica de Fragmentos de Restricción Polimórficos en su Tamaño (RFLP's) los cuales ya atacaban el problema a nivel molecular sin embargo era necesario analizar a varios miembros de una familia con al menos 8 marcadores diferentes lo que implicaba mucho tiempo de trabajo y una gran cantidad de recursos ^{3,18,49,51,57}. Con el descubrimiento de secuencias repetidas en tandem dentro del genoma de eucariontes se dio un gran avance en los estudios de ligación, ya que estas secuencias presentan un amplio polimorfismo útil para el diagnóstico molecular. Se han localizado al menos 11 secuencias de este tipo en el gen DMD ^{18,21,32,49,51}.

El uso de los marcadores para el consejo genético depende de dos criterios principales: la fracción de recombinación y la frecuencia de heterocigocidad. Si se maneja, por ejemplo, un marcador con muy baja frecuencia la mayoría de las mujeres pueden ser homocigotas para un alelo común. Esta situación no produce información para realizar el diagnóstico de portadoras ²⁶.

El uso de varios marcadores para realizar el diagnóstico es necesario, ya que proveen información más exacta. No se puede ocupar solo un marcador para este propósito por que un fenómeno de recombinación se puede llevar a cabo en la región del marcador produciendo una predicción errónea. Por lo anterior se decidió manejar al menos tres marcadores para poseer una exactitud de un 99% ¹⁷ distribuidos a lo largo del gen, uno en la región inicial 5', otro ubicado en la región intermedia y el ultimo en la región terminal 3' ⁴³.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores se eligieron los marcadores con el mayor índice de heterocigocidad para los extremos 5' y 3', así como para una región intermedia del gen DMD: Para la región 5' se eligió uno localizado en el promotor de la distrofina cerebral denominado 5' DYS-II que posee una heterocigocidad de 0.82, produce 8 alelos que se encuentran en un rango de 214 a 228 pb, de ellos los más frecuentes son el A6 con 19%, A3 y A5 con 10% ²¹. Para la región intermedia se eligió uno localizado en el

intron 44 del gen DMD denominado STR-44 que posee una heterozigoidad de 0.89, produce 12 alelos de entre 174 y 204 pb de los cuales los alelos más frecuentes son el L con 22.8%, el H con 19.3% y el P con 15.8% ¹⁸. Finalmente para la región 3' se eligió uno localizado en el segmento que corresponde a los exones 56 y 60 del gen DMD denominado DMD1c-2 con una heterozigoidad de 0.46, produce 5 alelos con tamaños de entre 245 a 355 pb, de entre ellos los más frecuentes son el BB3 con 67%, B34 con 15% y BB1 con 12% ⁴⁵.

El marcador mas informativo en este estudio fue el STR-44, le sigue el marcador 5' DYS-II quién falló en una de las familias estudiadas, y por último el marcador DMD1c-2 no fue informativo en ninguno de los casos. La frecuencia de heterocigosidad que presentaron para este estudio estos marcadores fue la siguiente: el marcador STR-44 fue heterocigoto en todos los casos, el marcador 5' DYS-II fue heterozigoto excepto en un individuo y finalmente el marcador DMD1c-II no presentó heterocigosidad. El hecho de que este marcador no fuera informativo en ninguno de los casos se puede derivar de que los estudios de frecuencia reportada para este marcador fueron realizados en población caucásica, por lo tanto, el estudio de este marcador en otros grupos étnicos puede mostrar diferencias en grado o distribución de polimorfismos ¹⁸. En 1996 se realizó el primer estudio de portadoras en 21 mujeres mexicanas en riesgo para DMD en el cuál se utilizó este marcador, sin embargo, al igual que en el presente trabajo fue homocigoto, estos resultados sugieren algún rasgo específico de este locus en la población mexicana ^{2,19}.

El diagnóstico molecular se implementó en dos familias, en las tres familias restantes no se contó con las muestras sanguíneas de las mujeres a quienes iba dirigido el diagnóstico.

El diagnóstico molecular no se pudo realizar en la familia 5 por que la madre presenta sólo el marcador STR-44 informativo (figura 8-a). Con la evidencia de un marcador no es factible el diagnóstico, como ya se comentó se necesitan al menos tres marcadores, para ello se necesitaría realizar estudios con otros marcadores encontrados en los extremos del gen. Para la región 5' se podría ocupar el marcador localizado en el intrón numero 1 del gen DMD, a 25 kb río abajo del promotor de distrofina muscular denominado 5' DYS MSA

que posee una heterocigocidad de 0.57⁴³. También se podrían ocupar los marcadores localizados en el promotor de la distrofina cerebral denominados 5' DYS-I y 5' DYS-III los cuales poseen una heterocigocidad de 0.786 y 0.51 respectivamente ²¹, o el localizado en el promotor de la distrofina muscular denominado 5' DYS MSB con una heterocigocidad de 0.17 ⁴³. Para el extremo 3' se podrían utilizar los marcadores localizados en la región 3' no traducida (3' UTR^o), el denominado MPIP con una heterocigocidad de 0.20 ⁴¹, el denominado 3' DYS MS ⁴², o el reportado por Beggs con una heterocigocidad de 0.34 ⁷.

El diagnóstico molecular no se pudo realizar en la familia 2 ya que para el marcador 5'DYS-II la niña es portadora (figura 9-a y 10-1) en cambio para el marcador STR-44 la niña no es portadora (figura 9-b y 10-2). Estos datos sugieren que entre ambos marcadores se presentó un fenómeno de recombinación. Tanto en familias afectadas como en individuos normales se ha observado una alta frecuencia de recombinación en el gen DMD. Se ha estimado que la recombinación intragénica ocurre en un rango de un 10% a 12%, 4 veces el rango esperado para este gen en base a su tamaño. Se ha propuesto que este rango tan alto de recombinación se debe a la localización de dos puntos calientes ⁴¹. El punto caliente mayor abarca al intron 44 y el intron 50 (figura 10-a), y el punto caliente menor se encuentra a partir del promotor de la distrofina muscular (intron 1) y el exon 8 (figura 10-b)⁴¹.

La recombinación entre el extremo 5' y el intrón 44 se distribuye de la siguiente manera: la fracción de recombinación entre el extremo 5' y el exon 10 es de 4%, un valor muy alto en relación al área, por otro lado encontramos que la fracción de recombinación reportada entre los exones 15 y 44 es de 0.5% lo que representa recombinaciones muy esporádicas en esta región ⁴¹. Siguiendo este patrón es muy probable que la recombinación en la niña de la familia 2 haya tenido lugar en el punto caliente menor (figuras 10-b, 10-c y 10-d). Sin embargo para poder delimitar el área de recombinación es necesario emplear marcadores del tipo RFLP's que se encuentren distribuidos en varios lugares de esta zona, tales como DXS142, DXS206, DXS164 y DXS270 localizados en los exones 1 ,9 ,11 y 40 respectivamente ⁴¹.

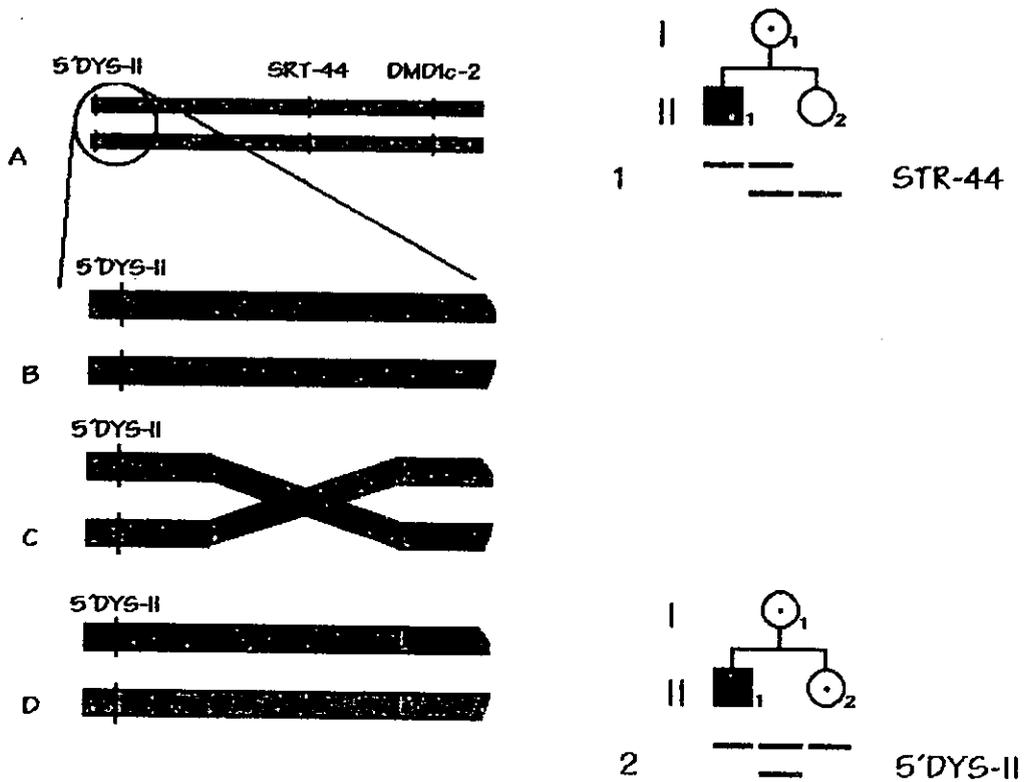


Figura 10. Recombinación en la familia 2. A) se observa los dos genes que posee la madre, cada uno esquematizado de un color diferente. Para el marcador STR-44 la niña no es portadora (10-1). Sin embargo para el marcador 5'DYS-II (10-2), la niña si es portadora, esto se debe posiblemente a una recombinación que se pudo llevar a cabo en la región del punto caliente menor. (B - D). En rojo se esquematizan los puntos calientes mayor y menor del gen DMD.

Cuando se presenta un fenómeno de recombinación en la región de los marcadores el diagnóstico de portadoras no se puede implementar ⁴³. En esta situación el diagnóstico se puede realizar buscando la mutación que produce la enfermedad, ya que ésta es un predictor preciso de la misma ²⁶. Las metodologías que se pueden emplear para este propósito atacan al problema a diferentes niveles, por ejemplo, para encontrar alguna alteración del gen a nivel DNA como mutaciones puntuales, deleciones o inserciones se emplean las técnicas de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y electroforesis de geles desnaturalizantes con gradiente (DEGEN), para encontrar las mismas alteraciones pero a nivel del mRNA se emplean los ensayos de RT-PCR⁴⁸, y por último, para encontrar alteraciones que disrumpen el marco de lectura produciendo alguna proteína errónea se utilizan los ensayos de Proteína Truncada ⁴⁸.

Los ensayos realizados con marcadores del tipo VNTR sin utilizar sustratos radioactivos son útiles, ya que son un método fácil y rápido para predecir el estado portador de mujeres en riesgo para DMD, esto es de gran valor ya que la importancia principal en el diagnóstico de portadoras es ofrecer el consejo genético a tiempo, y de esta manera ayudar a elegir con calma y sin presiones el futuro adecuado de una familia.

REFERENCIAS

- 1- Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinge A, Wolff JA, Davies KE. (1991) "Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs". *Nature* 352:815-818.
- 2- Arenas ADJ (1996) "Análisis molecular del gen de la distrofia muscular de Duchenne". Tesis Doctoral. UNAM, México.

Cuando se presenta un fenómeno de recombinación en la región de los marcadores el diagnóstico de portadoras no se puede implementar ⁴³. En esta situación el diagnóstico se puede realizar buscando la mutación que produce la enfermedad, ya que ésta es un predictor preciso de la misma ²⁶. Las metodologías que se pueden emplear para este propósito atacan al problema a diferentes niveles, por ejemplo, para encontrar alguna alteración del gen a nivel DNA como mutaciones puntuales, deleciones o inserciones se emplean las técnicas de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y electroforesis de geles desnaturalizantes con gradiente (DEGEN), para encontrar las mismas alteraciones pero a nivel del mRNA se emplean los ensayos de RT-PCR⁴⁸, y por último, para encontrar alteraciones que disrumpan el marco de lectura produciendo alguna proteína errónea se utilizan los ensayos de Proteína Truncada ⁴⁸.

Los ensayos realizados con marcadores del tipo VNTR sin utilizar sustratos radioactivos son útiles, ya que son un método fácil y rápido para predecir el estado portador de mujeres en riesgo para DMD, esto es de gran valor ya que la importancia principal en el diagnóstico de portadoras es ofrecer el consejo genético a tiempo, y de esta manera ayudar a elegir con calma y sin presiones el futuro adecuado de una familia.

REFERENCIAS

- 1- Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, Wolff JA, Davies KE. (1991) "Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs". *Nature* 352:815-818.
- 2- Arenas ADJ (1996) "Análisis molecular del gen de la distrofia muscular de Duchenne". Tesis Doctoral. UNAM, México.

- 3- Bakker E, Goor N, Wrogemann K, Kunkel LM, Fenton WA, Krakauer DM, Jahoda MG, Van ommen GJ, Hofker MH, Mandel JL, Davies KE, Willard HF, Sandkuyl L, Essen AJ, Sachs ES, Pearson PL.(1985) "Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular Dystrophy with closely linked RFLPs". *Lancet* 1:655-658.
- 4- Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D y Nudel U. (1990) "A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution". *Biochem. J.* 272: 557-560.
- 5- Barrera AS, Ortiz RL, Rojas MA, Resendez PD.(1993) "Reacción en cadena de la polimerasa". *Cien Desarr Ene-Feb*:50-60.
- 6- Barlett RJ, Pericak-Vance MA, Koh J, Yamaoka LH, Chen JC, Hung W-Y, Speer MC, Wapenaar MC, Van Ommen GJB, Bakker E, Pearson PL, Kandt RS, Siddique T, Gilbert JR, Lee JE, Sirotkin-Roses MJ y Roses AD. (1988) "Duchenne muscular dystrophy: high frequency of deletions". *Neurology* 38: 1-4.
- 7- Beggs AH, Kunkel LM (1990) "A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin". *Nucleic Acids Res.* 18:1931.
- 8- Bies RD, Caskey CT y Fenwick R (1992) "An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function". *J Clin Invest* 90: 666-672.
- 9- Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH y Davies KE. (1992) "Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in schwannoma cells". *Hum Molec Genet* 1: 103-109.
- 10- Blake DJ, Tinsley JM y Davies KL (1994) "The emerging family of dytrophin-related proteins" *Trends in Cell* 4:19-23.

- 11- Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, Dimauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP.(1988) "Duchenne Muscular Dystrophy: Deficiency of Dystrophin at the Muscle Cell Surface". *Cell* 54:447-452.
- 12- Bonilla E, Schmidt B, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Oliveira AB, Chang HW, Servidei S, Ricci E, Younger DS, Dimauro S.(1988) "Normal and Dystrophin-Deficient Muscle Fibers in Carriers of the Gene for Duchenne Muscular Dystrophy". *Am J Pathol* 133:440-445.
- 13- Boyce F M, Beggs A H, Feener C y Kunkel LM. (1991) "Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter". *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1276-1280.
- 14- Bulman DE, Murphy GE, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton GR, Ray PN.(1991) "Differentiation of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Phenotypes with Amin-and Carboxy-Terminal Antisera Specific for Dystrophin". *Am J Hum Genet* 48:295-304.
- 15- Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton GR, Ray PN.(1987) "A cDNA Clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene". *Nature* 328:434-437.
- 16- Bushby KMD (1994) "The muscular dystrophies" *Baill Clin Neurol* 3(2):407-430.
- 17- Chakraborty R, Zhong y, De Andrade M, Clemens PR, Fenwick RG y Caskey CT (1994) "Linkage disequilibria among (CA)_n polymorphisms in the human dystrophin gene and their implications in carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophies". *Genomics* 21:567-570.
- 18- Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RS, Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT.(1991) "Carrier Detection and Prenatal Diagnosis in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Families, Using Dinucleotide Repeat Polymorphisms". *Am J Hum Genet* 49:951-960.

- 19- Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Penaloza L, Salamanca F, Kofman S, Mercado R y Montanez C (1997) "Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region". *Am J Med Genet Jun 13*;70(3):240-246
- 20- Dunckley MG, wells DJ, Walsh FS y Dickson G (1993) "Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo" *Hum Mol Genet* 2 (6) 717-723.
- 21- Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM.(1991) "Rapid detection of CA polymorphisms in Cloned DNA: Application to the 5' Region of the Dystrophin Gene". *Am J Hum Genet* 48:621-627.
- 22- Fujimura FK (1994) "Diagnosis and the new genetics". *Curr Opin Biotech Dec*;5(6):654-662
- 23- Gruemer HD, Miller GW, Chinchill VM, Leshner TR, Blasco AP, Hassler CR, Nance WE.(1985) "Prediction of carrier Status in Duchenne Dystrophy by Creatine Kinase Measurement". *Am J Clin Pathol* 84:655-658.
- 24- Hammonds RG.(1987) "Protein Sequence of DMD Gene is Related to Actin Binding Domain of α -Actinin". *Cell* 51:1.
- 25- Hodgson SV, Abbs S, Clark S, Manzur A, Heckmatt JZH, Dubowitz V y Bobrow M. (1992) "Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy, with special reference to mental ability". *Neuro Disord* 2: 269-276.
- 26- Hodgson SV, Bobrow M (1989) "Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy". *Br Med Bull Jul*;45(3):719-744

- 27- Hoffman EP y Schwartz L (1991) "Dystrophin and disease" *Mol Asp Med* (12): 175-194.
- 28- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori K, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey TC, Shapiro F, Kunkel LM.(1988) "Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's Muscular Dystrophy". *N Engl J Med* 318:1363-1368.
- 29- Hoffman EP, Robert HB, Kunkel LM. (1987) "Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus". *Cell* 51:919-928.
- 30- Hoffman EP.(1994) "La miopatía de Duchenne". *Mun Cient* 13:224-232.
- 31- Kempter B (1992) "Quick preparation of high molecular weight DNA freezin". *TIBS* 8:7-8.
- 32- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM.(1987) "Complete Cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and Preliminary Genomic Organization of the DMD Gene in Normal and Affected Individuals". *Cell* 50:509-517.
- 33- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. (1988) "The complete Sequence of Dystrophin Predicts a Rod-shaped Cytoskeletal Protein". *Cell* 53:219-228.
- 34- Kunkel LM, Hoffman EP. (1989) "Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics". *Br Med Bull Jul*;45(3):630-643.
- 35- Lindenbaum MH, Carbonetto S.(1993) "Dystrophin and partners at the cell surface". *Curr Biol* 3:109-111.

- 36- Lisker Y, Armendares S. (1994) "Introducción a la genética humana". El manual moderno. México. 219-225p.
- 37- Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint T y Davies KE (1989) "Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies". Br Med Bull 45(3) 659-680.
- 38- Matheu CC (1991) "Protocols in human molecular genetics" Humana Press, Clifton, New Jersey.
- 39- Monaco AP y Kunkel LM (1987) "A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene" TIG 3(2) 33-37
- 40- Morgan JE, Hoffman EP, Partridge TA. (1990) "Normal Myogenic cells from Newborn Mice Restore Normal Histology to Degenerating Muscles of the mdx Mouse". J Cell Biol. 111:2437-2449.
- 41- Oudent C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. (1992) "Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions". Hum Mol Genet 1:599-603.
- 42- Oudet C, Heilig R y Mandel JL (1990) "An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene". Hum Genet. 84:283-285.
- 43- Oudet C, Heilig R, Hanauer A y Mandel JL (1991) "Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination" Am J Hum Genet 49:311-319.
- 44- Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. (1989) "Conversion of mdx myofibre from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblasts". Nature. 337:176-178.22

- 45- Powell JF, Fodor FH, Cockburn DJ, Monaco AP y Craig IW (1991) "A dinucleotide repeat polymorphism at the DMD locus". *Nucleic Acids Res* 19:1159.
- 46- Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkrants H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaude M y Kahan (1993) "Efficient adenovirus mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice". *Nature* 361:647-650.
- 47- Rajendra KS y Chamberlain JS (1996) "Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells" *Hum Mol Genet* 5(7):913-921.
- 48- Roberts RG, Barby TFM, Manners R, Bobrow M y Bentley DR (1991) "Direct detection of Dystrophin gene rearrangements by analysis of Dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes". *Am J Hum Genet* 49:298-210.
- 49- Roberts RG. (1995) "Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies". *Adv Genet.* 33: 177-231.
- 50- Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989) "Molecular cloning a laboratory manual". Segunda edicion". Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- 51- Schwartz LS, Tarleton J, Popovich B, Seltzer WK, Hoffman EP.(1992) "Flourescent Multiplex Linkage Analysis and Carrier Detection for Duchenne/Becher Muscular Dystrophy". *Am J Hum Genet* 51:721-729.
- 52- Scott MO, Sylvester JE, Heiman-Patterson T, Shi YJ, Fieles W, Stedman H, Burghes A, Ray P, Worton R y Fischbeck KH. (1988) "Duchenne muscular dystrophy gene expression in normal and diseased human muscle". *Science* 239:1418-1420.

- 53- Sekizawa MD, Kimura MD, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R y Sato T (1996) "Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood". *Neurology* 46:1350-1353.
- 54- Tartelet JC, Schwartz CE.(1991) "The use of a New Multiplex PCR Assay Significantly Improves the Rapid Detection of Deletions in the Dystrophin Gene". *Am J Hum Genet* 49:461-462.
- 55- Tinsley JM, Blake DJ y Davies KE. (1993) "Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site". *Hum. Molec. Genet.* 2: 521-524.
- 56- Weber JL, May PE.(1989) "Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction". *Am J Hum Genet* 44:388-396.
- 57- White R, Lalonel JM.(1988) "Cartografía cromosómica con marcadores de ADN". *Inv Cien* 139:12-20.
- 58- Wood DS, Zeviani M, Prella A, Bonilla E, Salviati G, Miranda AF, DiMauro S y Rowland LP. (1987) "Is nebulin the defective gene product in Duchenne muscular dystrophy?". *New Eng J Med* 316:107-108.
- 59- Worton RG y Thompson MW (1988) "Genetic of Duchenne muscular dystrophy" *Ann Rev Genet* 22:601-629.
- 60- Xiuyuan H, Ray PN, Gordon M, Thompson MW, Worton RG. (1990) "Duplicational Mutation at the Duchenne Muscular Dystrophy Locus: Its frequency, Distribution, Origin and PhenotypeGenotype Correlation". *Am J Hum Genet* 46:682-695.
- 61- Zellweger, H.; Niedermeyer, E. (1965) "Central nervous system manifestations in

childhood muscular dystrophy (CMD) I". *Ann. Paediat.* 205: 25-42,

62- Zubrzycka-Gaam EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN y Worton RG. (1988) "The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle". *Nature* 333: 466-469.