

122

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DEL MARCADOR pERT87.8/Taa1 EN FAMILIAS
CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ESMERALDA LIRA ROMERO

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MIGUEL ANGEL ALCANTARA ORTIGOZA

MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

SEPTIEMBRE DE 2002



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
 "Análisis del marcador pERT87.8/Taq I en familias con distrofia
 muscular de Duchenne (DMD)"
 realizado por Lira Romero Esmeralda
 con número de cuenta 09119923-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario
 Propietario
 Propietario
 Suplente
 Suplente

M. en C. Miguel Angel Alcántara Ortigoza
 Dra. Ariadna Estela González del Angel
 Dra. Angélica González Oliver
 M. en C. Gabriel López Velázquez
 M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

[Handwritten signatures]

FACUL

AS

Consejo Departamental de Biología

~~M. en C. Juan Manuel Rodríguez Cháv~~



**DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGIA**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Maestro en Ciencias Miguel Ángel Alcántara Ortigoza el haber dirigido amablemente este trabajo de tesis.

A la Dra. Angélica González Oliver, a la Dra. Ariadna González del Angel, al Maestro en Ciencias Gabriel López Velázquez y a la Maestra en Ciencias Guadalupe Ordaz Téllez, les doy las gracias por el tiempo que se tomaron para la revisión de esta tesis y por los oportunos comentarios que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Así mismo quiero agradecer a la Bióloga Elizabeth Hernández Ursua el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio, por sus enseñanzas y amistad.

Quiero agradecer especialmente a mi familia, la comprensión, paciencia y aliento que me brindaron para seguir adelante.

Agradezco infinitamente a mi Mamá María Luisa Romero la entrega, sacrificio amor y toda la ayuda que me ha brindado para poder alcanzar mis aspiraciones.

A mi Papá José Lira por corregirnos y enseñarnos a salir adelante.

Quiero agradecer especialmente a mi hermano José Luis Lira, el haber dedicado los mejores años de su vida a trabajar duramente para ayudarnos a seguir estudiando y por haber sacrificado muchos de sus sueños por nosotros.

A mi hermano Juan Manuel Lira, muchas gracias por ser la inspiración y ejemplo de lucha, esfuerzo, dedicación y por mostrarnos que a pesar de los obstáculos se puede llegar arriba.

A Laura Lira por estar a mi lado siempre, por su disposición y ayuda en los momentos difíciles. Gracias por los días de desvelo que compartiste conmigo para ver concluido este trabajo, por ser una gran amiga y hermana.

A mi hermana Magos por el apoyo que nos ha brindado en todo momento.

A Damián Vivar agradezco enormemente el apoyo en todos estos años en los cuales me ha ayudado a crecer, a luchar, y seguir adelante. Gracias por su gran amor y amistad.

A Laura de Alba y Efraín Vivar porque también han contribuido con su ayuda y ejemplo a la obtención de estos logros.

A Fernando, a Luis, a Jassiel por alegrar nuestras vidas, y con mucho cariño a Lupita, a quien me hubiera gustado ver correr, reír y estar entre nosotros.

A todos ustedes Gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	14
JUSTIFICACIÓN	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
1. Población objetivo y estudio clínico	15
2. Estudio Molecular	16
2.1 Aislamiento del ADN Genómico	16
2.2 Análisis de RFLPs	17
2.2.1 Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R	17
2.2.2 Reacción de amplificación y análisis de restricción	17
2.2.3 Electroforesis en geles de agarosa	18
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS	37

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AG	asesoramiento genético
ALD	aldolasa
bp	pares de bases
C	dominio c-terminal de la distrofina
cDNA	DNA complementario
CPK	creatinina fosfocinasa
D.O.	densidad óptica
DGAC	complejo glicoproteico asociado a distrofina
DMB	distrofia muscular tipo Becker
DMD	distrofia muscular tipo Duchenne
dNTPs	mezcla de los cuatro 2-desoxirribonucleótidos, 5-trifosfato
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
F	forward
FA	frecuencias atéticas
H1-H4	dominios bisagra de la distrofina
IH	índice de heterocigocidad
Kb	kilobases
KDa	kilodaltones
LDH	lactodeshidrogenasa
M-PCR	reacción en cadena de la polimerasa múltiple
mRNA	RNA mensajero
PAGE	electroforesis en geles de poli(acrilamida)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pERT	del inglés «phenol-enhancement recovery technique»
PO	portadora obligada
POI	portadora obligada informativa
PONI	portadora obligada no informativa
R	reverse
RFLP	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RT-PCR	reverso-transcripción acoplada a PCR
SGOT	transaminasa glutámico oxalacética
SSCP	polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
STRs	secuencias cortas repetidas en tandem (DNA microsatélite)
T	polimorfismo RFLP pERT/87.8 Taq I
TE	amortiguador de tris-EDTA
UI	unidades internacionales
V	volts
VNTRs	secuencias repetidas en tandem de número variable (DNA minisatélite)
WCLB	buffer de lisis para glóbulos blancos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	3
Signo de Gowers en DMD.	
Figura 2.	5
Ubicación del gen DMD en el cromosoma X banda Xp21.2.	
Figura 3.	7
Localización de secuencias promotoras en el gen DMD.	
Figura 4.	9
Organización en dominios de la proteína distrofina.	
Figura 5.	10
Complejo glicoproteico asociado a distrofina (DGAC).	
Figura 6.	19
Patrón de amplificación y restricción del polimorfismo pERT87.8/ Taq I.	
Figura 7.	24
Asignación y exclusión del estado portador en hermanas.	
Figura 8.	25
Presencia de alelo de riesgo en hermana.	
Figura 9.	26
Exclusión de alelo de riesgo en hermana.	
Figura 10.	27
Evento mutacional de <i>novo</i> .	
Figura 11.	28
No concordancia de alelo paterno.	
Figura 12.	29
Gel de no paternidad.	

RESUMEN

La distrofia muscular tipo Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular de carácter letal que se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X.

La enfermedad es ocasionada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína distrofina.

La aplicación de técnicas de Biología Molecular, tales como los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) han contribuido al diagnóstico molecular de esta enfermedad y a la detección de madres portadoras.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la eficiencia del marcador tipo RFLP pERT87.8/TaqI (intrón 13 del gen DMD) para el asesoramiento genético, en una muestra de familias mexicanas.

Se analizaron 166 familias (74.6% casos únicos) integradas al menos por el caso índice y la madre. Se realizó la amplificación del pERT87.8/TaqI, seguida de la restricción respectiva (alelo mayor T1 y alelo menor T2).

Se obtuvieron las frecuencias alélicas, así como el índice de heterocigocidad y a través del análisis de ligamiento genético se procedió a determinar el estado de portadoras en todas las mujeres emparentadas en primer grado.

83 madres (50%) fueron informativas (heterocigotas T1/T2), el resto fueron homocigotas. 4 madres resultaron ser no portadoras (mutación de *novo*). Se pudo asignar el estado portador en 20 hermanas y se descartó dicho estado en otras 23 hermanas.

En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo T2 fue el más frecuente (0 58%).

En una familia no hubo concordancia de alelo paterno y mediante el análisis del marcador D1S80 se documentó no paternidad. Así 28 familias (16.86 %) de las 166 estudiadas pudieron recibir un asesoramiento genético de certeza.

La utilidad del marcador pERT87.8/Taq I para brindar un asesoramiento genético fue baja, aún contando con un alto índice de heterocigocidad en las madres estudiadas. El bajo número de familias beneficiadas, lo atribuimos a la estructura familiar inadecuada para el estudio y a la predominancia de casos únicos.

INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es el padecimiento neuromuscular hereditario más frecuente del ser humano.¹ Fue descrita inicialmente por Edward Meryon en 1852 y posteriormente, Duchenne de Boulogne (1868) describió detalladamente la entidad, definiéndola como una enfermedad que afecta a niños al inicio de su infancia.^{1, 2}

Los signos clínicos de la enfermedad se hacen evidentes entre las edades de 2 a 5 años. Los primeros síntomas que se presentan son problemas para caminar, tendencia a caerse, incapacidad para correr, saltar, subir escaleras y posteriormente dificultad para levantarse de una posición sentada o acostada. Otro signo importante es la pseudohipertrofia de gemelos, debida a la acumulación de grasa y tejido conectivo en el músculo y presencia de signo de Gowers positivo³ (**figura 1**).

Otra característica adicional de la enfermedad, son los valores elevados de ciertas enzimas en el suero, como la aldolasa (ALD), la deshidrogenasa láctica (LDH), la transaminasa glutámico oxalacética (SGOT) y la creatinina fosfocinasa (CPK), esta última se encuentra elevada de 50 a 100 veces sobre su valor normal.⁴ Alrededor de los 11 y 12 años la debilidad muscular ocasiona que los niños con DMD pierdan su capacidad de caminar y la mayoría de estos mueren a finales de la segunda década de vida, generalmente por neumonía o falla respiratoria.^{2, 3} Aproximadamente 1/3 de los pacientes con DMD presentan un coeficiente intelectual por debajo de la población normal, esta deficiencia intelectual no es progresiva ni esta correlacionada con la gravedad de la enfermedad.^{5, 6, 7}

La distrofia muscular de Becker (DMB) es una variante alélica de la DMD y se presenta como la forma benigna de la enfermedad.³ En la DMB la progresión de la enfermedad es más lenta, la incapacidad para caminar generalmente se pierde en la mayoría de ellos después de los 15 años y raramente se presenta retraso mental. Algunos de los casos pueden llevar un patrón de vida normal hasta los 40 a 50 años.^{3, 5}

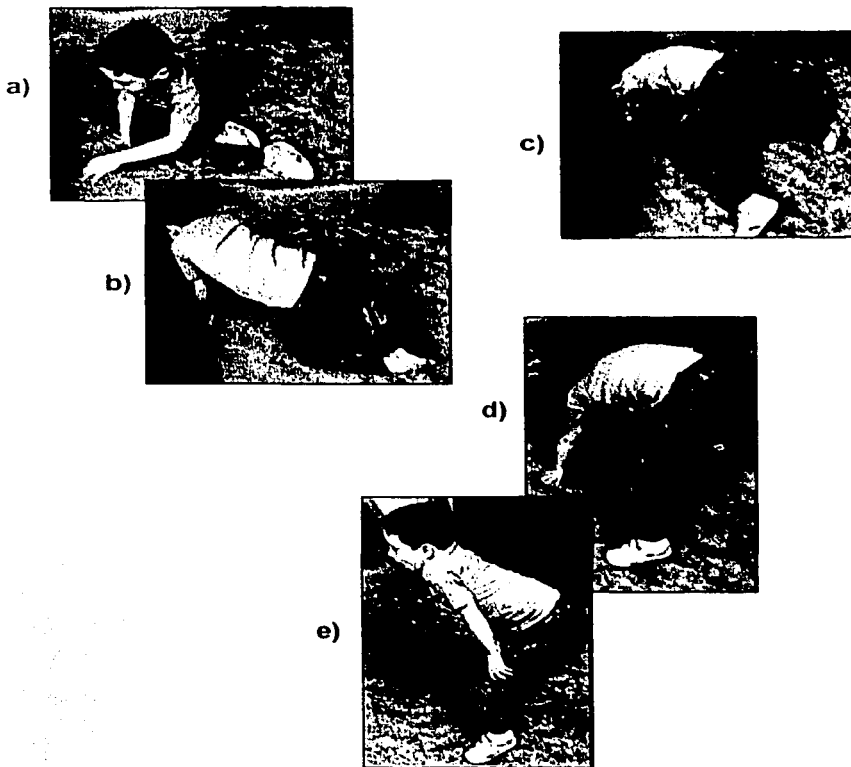


Figura 1. Signo de Gowers positivo. Debido al debilitamiento muscular de la cintura pélvica y femoral, los pacientes con DMD adoptan una forma distintiva de levantarse del piso. Inicialmente apoyan sus manos en el piso a); posteriormente elevan ambas rodillas b) y c); y una vez obteniendo cierta firmeza, colocan sus manos en las rodillas d) y e). De esta manera pueden ponerse completamente de pie.

GENÉTICA DE LAS DMD/DMB

Las DMD/DMB se heredan en forma recesiva ligada al cromosoma X.⁸ La mutación presente en el gen de los individuos afectados, se puede originar como resultado de una mutación de *novo* (30% de los casos), o puede ser heredado a través de mujeres portadoras.^{4, 9, 10, 11}

La incidencia estimada para la DMD en la población caucásica es de uno por cada 3000 hombres recién nacidos vivos,¹² mientras que la incidencia para la DMB, es menos frecuente, uno por cada 30,000 - 40,000.¹³

Por otra parte, la enfermedad puede manifestarse ocasionalmente en mujeres (<8%) bajo condiciones que eliminen el alelo normal, por ejemplo monosomias de cromosomas sexuales (síndrome de Turner),³ translocaciones recíprocas entre un autossoma y el cromosoma X¹⁴ y en aquellos casos que involucran inactivación preferencial del cromosoma X normal.¹⁵

Las manifestaciones clínicas que las mujeres pueden presentar son, agrandamiento de las pantorrillas, dificultad para subir escaleras, debilitamiento muscular en diversos grados y ocasionalmente incapacidad severa.²

EL GEN DMD

El gen DMD, es el más grande del humano hasta ahora conocido.¹⁶ Se encuentra localizado en el cromosoma X en la banda Xp21.2¹⁷ (figura 2).

La localización del gen se logró a través de estudios citogenéticos y por análisis de ligamiento.¹⁸ Posteriormente se caracterizó por clonación tipo posicional gracias a un fragmento del extremo 5' denominado pERT87.⁹

El gen contiene aproximadamente 2.4 millones de nucleótidos, dispuestos en 79 exones, lo que equivale al 0.05% del genoma humano completo y al 1% del DNA del cromosoma X.^{19, 20}

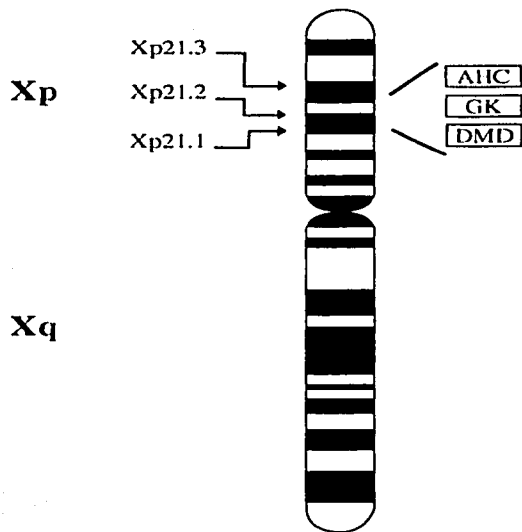


Figura 2. Representación del cromosoma X con bandeo G y ubicación del gen DMD en la banda Xp21.2. (Walker et. al., 1993).

Este gen permanece altamente conservado en la evolución, debido presumiblemente a su gran tamaño y a su alto número de exones.²¹

El gen presenta una tasa elevada de mutación²¹ la cual puede estar relacionada con el tamaño del gen²² y con algunos elementos presentes en los intrones que podrían contribuir a su inestabilidad.²³

El control de la transcripción del gen DMD es complejo.^{3, 5, 24} Hasta el momento se han reportado 8 promotores diferentes en el gen DMD, al menos tres de ellos controlan las isoformas musculares de la distrofina de 427 (KDa)^{25,26,27,28,29} (**figura 3**).

El gen DMD consta de 79 exones y codifica para un mRNA de aproximadamente 14,000 nucleótidos. El nivel más alto de transcripción se encuentra en el músculo esquelético y representa del 0.1 al 0.2% del total de especies del mRNA. Así mismo, se han observado niveles de transcripción bajos en tejido neuronal y músculo liso, cerca del 5% y 1% respecto del músculo esquelético.^{30, 31}

Cabe mencionar que la expresión de la forma neuronal probablemente esta involucrada con el grado de retraso mental en algunos de los individuos afectados con DMD.^{32, 33}

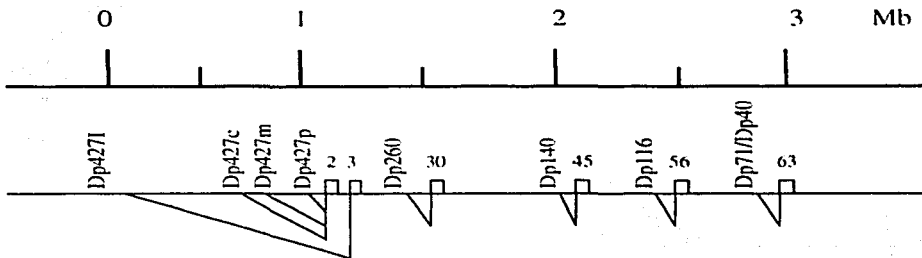


Figura 3. Localización de los diferentes promotores del gen DMD que controlan la expresión de las diferentes isoformas de la distrofina: Dp427l (células linfoblastoides), Dp427c (cerebro), Dp427m (músculo), Dp427p (células de Purkinje), Dp260 (retina), Dp140 (sistema nervioso central), Dp116 (células de Schwann) y Dp71/Dp40 (tejidos no musculares como hígado y células totipotenciales). (Emery, 1998).

LA PROTEÍNA DISTROFINA

La distrofina tiene un tamaño de 427 kDa y pertenece al grupo de proteínas de unión a actina, de la familia de las espectrinas.³⁴

Esta constituida aproximadamente de 3,700 aminoácidos, dispuestos en 4 dominios; un dominio amino-terminal, un dominio central «rod», uno rico en cisteína y uno carboxilo terminal^{35, 36} (**figura 4**).

El dominio amino terminal esta constituido por 240 aminoácidos y es parecido en secuencia y función a la α -actinina, una proteína de unión a actina.^{34, 37}

El dominio central, es el más grande, y esta constituido por 2800 aminoácidos, distribuidos en una serie de 24 repetidos homólogos, cada uno con 109 aminoácidos en promedio y dispuestos a manera de triples alfa hélices.³⁸ Este dominio presenta cuatro regiones «bisagra» (H1-H4) ricas en prolina a las cuales se les atribuye la flexibilidad de la molécula.^{34, 39}

El tercer dominio, constituido por 250 aminoácidos es rico en cisteínas y esta involucrado en la unión del complejo glicoproteico asociado a distrofina (DGAC)⁴⁰ (**figura 5**).

El último dominio corresponde a la región carboxilo terminal; esta constituido por 420 aminoácidos y presenta homología con la utrofina, proteína codificada en el cromosoma 6. Dos terceras partes de este dominio interactúan con varias proteínas transmembranales con las que forma los complejos sarcoglicano y distroglicano.^{34, 41, 42, 43}

Esta proteína conforma cerca del 0.002% de la proteína total del músculo estriado y aproximadamente el 5% de las proteínas del citoesqueleto.³⁵

Diversos estudios han corroborado que la distrofina interviene directamente en la estabilidad membranal durante la contracción muscular, en la transducción de fuerza contráctil al medio extracelular, en la organización de membranas especializadas y manteniendo las concentraciones de los componentes celulares.^{34, 44, 45} Así la ausencia total o parcial, o la deficiencia funcional de la proteína ocasiona ruptura del sarcolema durante la contracción y relajación muscular y la consecuente sustitución de este tejido por componentes conectivos (fibrosis endomisial). Estos eventos explican las manifestaciones clínicas de los pacientes con DMD.^{36, 46, 47}

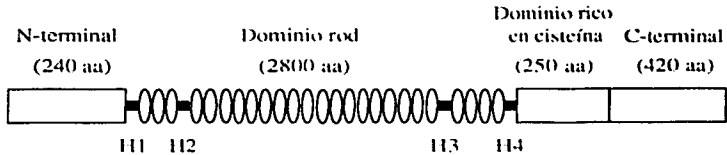


Figura 4. Representación esquemática de la organización en dominios de la proteína distrofina, de 427 kDa. El dominio central "rod" compuesto de 24 unidades repetidas es interrumpido por 4 regiones ricas en prolina (H1-H4). (Emery, 1998).

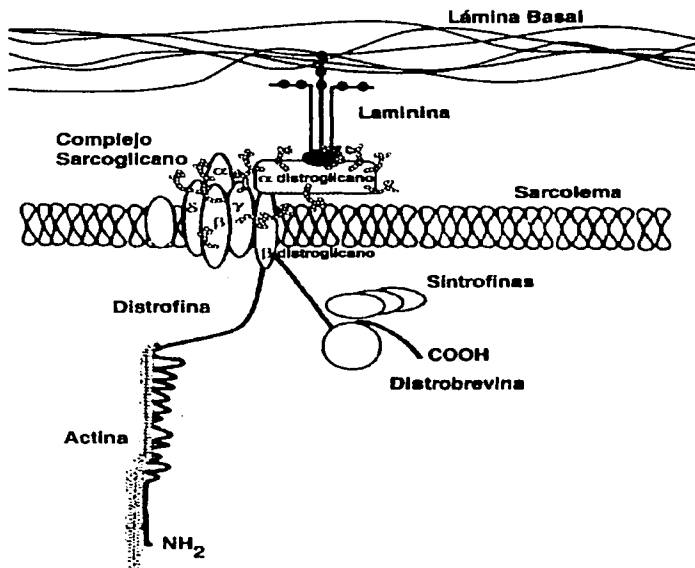


Figura 5. Organización del complejo glicoproteico asociado a distrofina (DGAC). Se distinguen dos subcomplejos: distroglicano y sarcoglicano. El subcomplejo distroglicano está constituido por dos proteínas, el β -distroglicano que es una proteína transmembrana ligada por su dominio amino intracitoplásmico a la distrofina, y por su extremo carboxilo al α -distroglicano, este se une a un componente de la matriz extracelular conocido como merosina o laminina. El subcomplejo sarcoglicano está constituido por cinco proteínas denominadas: α -sarcoglicano o adhalina, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano, δ -sarcoglicano y sarcospan (25 kDa). Componentes celulares adicionales, tales como las sintrofinas y la proteína distrobrevina, descubiertos recientemente, se unen a la distrofina por el dominio C-terminal. (Emery, 1998).

GÉNESIS Y TIPO DE MUTACIONES EN EL GEN DMD

A partir de la localización y clonación del gen DMD, se ha podido determinar que las deleciones intragénicas son las responsables de aproximadamente el 60% de los casos de DMD/DMB.⁴⁸

Estas deleciones en el gen son muy heterogéneas, pueden eliminar desde un exón, hasta el gen completo,⁴⁹ incluso han sido descritos una variedad de síndromes de genes contiguos que involucran diferentes porciones de la banda Xp21.⁵⁰

Múltiples estudios han determinado al menos dos sitios en el gen altamente susceptibles para sufrir deleciones, se han denominado «puntos calientes» existiendo uno mayor y otro menor.^{51, 52}

El «punto caliente» mayor se ha localizado en el intrón 44 el cual presenta un gran tamaño. Cerca de las 2/3 partes de las deleciones que se detectan en pacientes con DMD, se encuentran en este sitio.^{38, 52, 53} Las deleciones localizadas en esta región se extienden solo en dirección 3' a partir del punto caliente y llegan a ser aproximadamente de 200 kb.⁵⁴

El «punto caliente» menor se encuentra en el intrón 7. En este sitio las deleciones se extienden en dirección 5' y 3'. Algunos casos de DMB se asocian a mutaciones localizadas en este punto.⁵⁴

Así mismo se ha detectado que el 35% de los pacientes con DMD no presentan deleciones, probablemente presenten microdeleciones, que conduzcan al corrimiento del marco de lectura, o mutaciones puntuales que originen codones de término, eliminen sitios de «splicing» o disminuyan la función promotora.⁵⁵ Estas mutaciones puntuales se han localizado en varios pacientes a través de la técnica de análisis de conformación de cadena sencilla (SSCP) y análisis de heterodúplex con secuenciación. Su distribución es heterogénea.^{56, 57, 58}

Por otra parte, las duplicaciones parciales están presentes en un 6-8% de los pacientes DMD/DMB y se ha descrito un caso de DMD ocasionado por la inserción de un elemento retrotransponible L1 en secuencias codificantes del gen. ^{53, 59}

Debido a que no existe una correlación entre el tamaño de la deleción y la gravedad de la enfermedad, ^{7, 45} se ha postulado que la presencia de un fenotipo Duchenne o Becker es dependiente del marco de lectura. Así en los pacientes con DMD, las mutaciones presentes en el gen, generan un cambio en el marco de lectura, dando como resultado proteínas truncadas, contrariamente en los pacientes con DMB las eliminaciones provocan un marco de lectura abierto, lo que genera una proteína parcialmente funcional. ⁹

Sin embargo existen excepciones, ya que se han observado deleciones en pacientes con DMD que producen un marco de lectura abierto, e inversamente, enfermos con DMB que presentan deleciones que rompen el marco de lectura. ⁶⁰ Se piensa que esta situación obedece al procesamiento post-transcripcional del mRNA de la distrofina. ⁶¹

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS DMD/DMB Y DETECCIÓN DE PORTADORAS

Con el empleo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha facilitado en gran medida el análisis de deleciones en el gen DMD. ⁶²

Inicialmente la técnica utilizada para la detección de deleciones fue el Southern blot. Estos estudios requieren de 7 a 12 sondas que abarcan la longitud total del cDNA, ^{63, 64} sin embargo, actualmente se han diseñado ensayos de amplificación múltiple (PCR múltiple) como el 9 plex o el 5 plex, que permiten amplificar conjuntamente varias regiones del gen, situadas en los llamados «puntos calientes» mayor y menor y con ello detectar hasta el 98% de las deleciones intragénicas. ^{65, 66} La ventaja de este método radica en que es rápido, se requiere poca cantidad y calidad de DNA, y representa un bajo costo. ^{65, 67}

En cuanto a la detección de portadoras, la determinación de los niveles de creatinina fosfocinasa (CPK), en suero, fue la prueba más comúnmente empleada durante los años 60's y 70's,⁶⁸ sin embargo estos niveles pueden variar en un mismo sujeto cuando se realizan diferentes mediciones en tiempos distintos, además la distribución de los niveles de la enzima se llega a traslapar entre mujeres normales y portadoras, dando resultados no concluyentes.^{69, 70}

El análisis de distrofina por inmunoblot e inmunohistoquímica en músculo, también ha sido una herramienta empleada en la detección de portadoras, no obstante, en muchas ocasiones generan resultados inconsistentes y se consideran poco confiables.⁷¹

El empleo de métodos que parten del análisis de DNA brindan resultados más consistentes, estas pueden ser de tipo directo como el Southern blot cuantitativo, el M-PCR cuantitativo, los RT-PCR, etc. o de tipo indirecto tales como los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), los repetidos en tandem de número variable (VNTRs) o las secuencias cortas repetidas en tandem (STRs).^{3, 5, 72}

Las pruebas de tipo indirecto (análisis de ligamiento) se llevan a cabo cuando no se han identificado mutaciones en el caso índice. Son de gran utilidad en casos familiares de DMD/DMB y en aquellos casos de asignación de no portadoras con un solo miembro afectado, siempre y cuando la madre sea informativa (heterocigota).^{5, 72}

Los RFLP han sido ampliamente utilizados y se basan en el análisis de sitios de restricción, estos sirven como marcadores para seguir la segregación de los cromosomas en un árbol genealógico. De esta manera se puede asignar o excluir el estado de portadora entre las familiares femeninas de primer grado, o identificar el alelo de riesgo.^{5, 7}

Diversos RFLPs han sido identificados en secuencias no codificantes del gen DMD. Una de estas secuencias corresponde al fragmento pERT87.8 (intrón 13). Este polimorfismo está estrechamente ligado al locus de la enfermedad y se ha visto que presenta un porcentaje bajo de recombinación y un alto índice de heterocigocidad 5% y 50% respectivamente.^{4, 8, 70}

Este RFLP ha sido ampliamente utilizado para consejo genético en distintas poblaciones.⁸

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia del marcador tipo RFLP pERT87.8/TaqI (intrón 13 del gen DMD) para el asesoramiento genético, en una muestra de 166 familias mexicanas con DMD/DMB.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. - Determinar el índice de heterocigocidad, en la muestra de mujeres mexicanas.
2. - Determinar las frecuencias alélicas presentes en la población de estudio.
3. - Asignar o excluir el estado de portadora en las mujeres de las 166 familias analizadas.

JUSTIFICACIÓN.

Hasta el momento aún no se ha logrado desarrollar un tratamiento curativo para la DMD. Los esfuerzos a nivel mundial se han enfocado principalmente al aspecto preventivo, a través de la detección de portadoras y el diagnóstico prenatal.

La detección de portadoras es un elemento de suma importancia, ya que permite conocer el riesgo de recurrencia en una familia, y con ello brindar un asesoramiento genético de certeza a las familias afectadas.

El marcador pER87.8/TaqI ha sido ampliamente utilizado en distintas poblaciones, sin embargo, para la población mexicana no se ha reportado su empleo. Debido a que presenta una alta frecuencia de heterocigocidad y un bajo índice de recombinación, este marcador podría ser de utilidad para el diagnóstico de mujeres portadoras.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN, OBJETIVO Y ESTUDIO CLÍNICO

166 familias mexicanas, no relacionadas, fueron incluidas en el estudio. 128 fueron DMD y 35 fueron DMB. De tres familias no se contaba con muestras de los casos índice por fallecimiento. Los pacientes fueron diagnosticados en el Departamento de Genética y Neurología del Instituto Nacional de Pediatría.

El diagnóstico clínico se realizó con base en la exploración física, historia familiar, determinación del nivel de creatinina fosfocinasa (CPK) en suero, electromiografía y biopsia muscular.

La clasificación de los pacientes en fenotipos DMD o DMB, se realizó tomando en cuenta la edad de inicio de la enfermedad, evolución y la edad de pérdida de la deambulación. Los pacientes que dejaron de caminar antes de los 13 años se clasificaron como DMD, mientras que los pacientes con pérdida de la deambulación después de los 18 años se consideraron como DMB.

Se incluyeron sólo a los familiares de primer grado de los casos índice (n= 163). Así, se analizaron 33 padres, 49 hermanos y 274 mujeres, 166 de ellas fueron madres y 108 fueron hermanas.

De las 166 madres incluidas en el estudio, 42 contaban con antecedentes familiares de hermano, tío, primo, por rama materna u otro hijo afectado con DMD/DMB y fueron catalogadas como portadoras obligadas (PO). El resto de las mujeres (n=124) no contaban con antecedentes familiares y por lo tanto se catalogaron como posibles portadoras.

2. ESTUDIO MOLECULAR

2.1 Aislamiento de DNA Genómico

La obtención de DNA se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica, proveniente de pacientes y familiares, siguiendo el método que se describe a continuación:

Se tomaron de 7-15 ml de sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA, los leucocitos se separaron por centrifugación a 2500 r.p.m., se lavaron con amortiguador para células rojas y se lisaron con buffer de lisis (WCLB). Se realizó extracción fenólica y el exceso de fenol fue retirado con 2 lavados de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. El DNA se precipitó con NaCl [1M] y etanol absoluto a -20°C , se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 200-300 μl de amortiguador TE pH 8.0.

El DNA se cuantificó haciendo una dilución 1:250 de DNA genómico, agua bidestilada y se cuantificó en un espectrofotómetro leyendo a una longitud de onda de 260 nm y usando la siguiente formula:

$$[\text{DNA}] \text{ (g)/(l} = (\text{DO } 260) \text{ (F) (Factor de dilución)}$$

donde:

DO: Densidad óptica a una λ de 260nm

F: Constante equivalente a $0.05(10.0) = 50 \mu\text{g}$ de DNA

Factor de dilución: equivalente a 1:250 μl

El criterio de pureza de fenol (lectura a 250 nm) y proteínas (lectura a 280 nm), se obtuvo calculando el cociente entre estas lecturas y la lectura a 260 nm (DNA), el cociente por encima de 1.6 se consideró adecuado para estudio.

La integridad del DNA se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a 100 V por 30 min. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador con luz UV.

La integridad del DNA se consideró como óptima cuando se observó la banda nítida de alto peso molecular 23kb del marcador de tamaño molecular fago λ /Hind III.

2.2 Análisis de RFLPs

2.2.1 Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R

El DNA de los pacientes DMD/DMB y de sus familiares, se amplificó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los siguientes pares de oligonucleótidos.

F: GTCAGTTGGTCAGTAAAAGCCC

R: CAGATCGTCGACCAATTTAAAACCCACAGCAG

Los oligonucleótidos se prepararon utilizando el método de fosforoamidita en un oligosintetizador (Pharmacia TM) y se purificaron en columnas de Sephadex G-25 TM

2.2.2 Reacción de amplificación y análisis de restricción

La amplificación se llevó a cabo mezclando 500 ng de DNA genómico en una solución con amortiguador para el fragmento StoffelTM de la Taq polimerasa ([10 mM] tris HCL, pH 8.3, [50 mM] KCL), 2.0 UI de DNA polimerasa Taq StoffelTM, [0.1 μM] de oligonucleotido iniciador, [150 μM] de dNTPs, [1.5 mM] de MgCl₂, en un volumen de reacción final de 50 μl.

La reacción de amplificación se realizó en un Termociclador (DNA Thermal Cycler 480 de Perkin Elmer Cetus) bajo las siguientes condiciones:

Se inició con una desnaturalización a 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 50 segundos, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión a 70°C por 3 minutos y una elongación final a 72°C por 4 minutos.

La restricción se llevó a cabo mezclando los productos de amplificación obtenidos, con 3 UI de la enzima de restricción Taq I, a 65°C durante toda la noche.

La enzima TaqI reconoce la secuencia
fragmentos con extremos cohesivos.



y genera

2.2.3 Electroforesis en geles de Agarosa

15 μ l de los productos de restricción se corrieron durante 30 minutos a 100 V en geles de agarosa al 2.5%, se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador con luz UV con película Polaroid 667™

Se dedujo el tamaño molecular de cada amplificado en base a su migración y por comparación con el marcador de tamaño molecular.

En todas las reacciones de amplificación/restricción se corrieron en forma paralela muestras con genotipos conocidos (controles) para cada una de las combinaciones posibles de RFLP.

Se procedió a identificar los genotipos de acuerdo al patrón de restricción. El producto de amplificado para estudiar el polimorfismo T1 es de 145 pb, el cual cuando es digerido por la enzima de restricción Taq I genera dos fragmentos, uno de 71 pb y otro de 74 pb.

Se ha denominado por convención alelo (T1) al que no contiene el sitio de restricción para la enzima y alelo 2 (T2) al que si lo tiene (**Figura 6**).

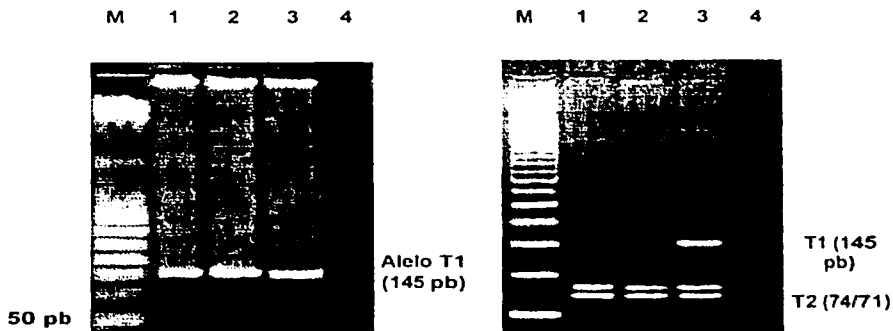


Figura 6. Geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio que muestran los patrones de amplificación y restricción del polimorfismo pERT87 8/Taq I.

Panel A. Amplificación de Taq I. M marcador de tamaño molecular (fago λ /Hind III escalera de 50 pb). Carril 1 Producto de amplificación sujeto masculino. Carriles 2 y 3 productos de amplificación sujetos femeninos (145 pb). Carril 4 control negativo

Panel B. Patron de restricción de Taq I. M marcador de tamaño molecular (fago λ /Hind III escalera de 50 pb)

Carril 1 Alelo T2 sujeto masculino (74/71 pb) Carril 2 Alelo T2 femenino. Carril 3 Alelo T1/T2 sujeto femenino (145 pb) y (74/71 pb). Carril 4 control negativo.

RESULTADOS

Mediante los análisis de árboles genealógicos previamente realizados por el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Pediatría, se pudo conocer que 42 (25.3%) de las madres, eran portadoras obligadas (PO), el resto 124 (74.6%) fueron catalogadas como portadoras probables.

Con estos antecedentes se procedió a efectuar la detección molecular de portadoras a través de los estudios de RFLPs.

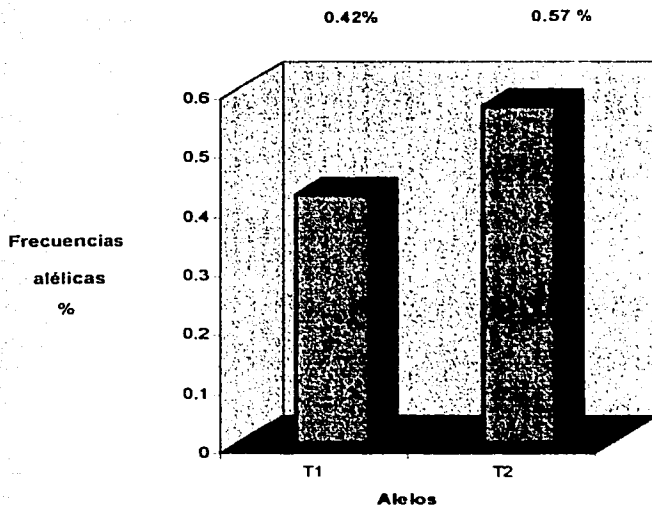
En cuanto a las concentraciones e integridad del DNA obtenido estas fueron óptimas, las muestras de DNA no mostraron degradación alguna después de la extracción y pudieron ser restringidas.

Uno de los objetivos iniciales fue la determinación de las frecuencias alélicas de nuestra población en estudio, para lo cual se analizaron un total de 365 alelos pertenecientes a 166 madres y a 33 padres.

Se pudo evidenciar que el alelo T2 fue el más frecuente (0.57%) respecto al alelo T1(0.42%) (**Gráfica 1**). Al comparar estos resultados con los valores que se reportan para otras poblaciones se puede observar que no existen diferencias significativas con respecto a una población hindú, y si existen diferencias significativas con poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas (**Tabla 1**).

En cuanto al índice de heterocigocidad, de las 166 madres estudiadas el 50.0% (n=83) fueron informativas (heterocigotas T1/T2). El otro 50% de las madres fueron homocigotas.

De las 42 madres con antecedentes familiares solo 23 (13.85%) fueron informativas (POI) y 19 (11.44%) fueron no informativas (PONI), así mismo de las madres catalogadas como posibles portadoras, 60 fueron informativas (36.14%) y el resto, 64 (38.55%) no lo fueron.



Gráfica 1. Distribución de frecuencias alélicas. Se observa que el alelo T2 se presenta con una frecuencia mayor (0.57%) en la población en estudio con respecto al alelo T1 (0.42%)

Tabla 1. Frecuencia de polimorfismos en diferentes poblaciones

POBLACIÓN	T1 (%)	T2 (%)
CHINOS	98/145 (0.68)	47/145 (0.32)
GALESES	(no esp.) (0.26)	(no esp.) (0.74)
JAPONESES	80/114 (0.70)	34/114 (0.30)
INGLESES	42/150 (0.28)	108/150 (0.72)
CAUCÁSICOS	27/105 (0.26)	78/105 (0.74)
HINDUES	24/57 (0.42)	33/57 (0.57)
NIGERIANOS	6/28 (0.21)	22/28 (0.78)
TURCOS	28/117 (0.24)	89/117 (0.76)
MEXICANOS *	155/365 (0.42)	210/365 (0.57)

* El presente estudio
(Tomado de Alcántara, 1998.)

De las 42 familias con antecedentes de la enfermedad, el análisis por RFLPs permitió determinar el estado portador en 10 (9.26%) de las hermanas, y permitió así mismo descartar dicho estado en otras 10 hermanas (**figura 7**). En 5 hermanas con madres PO no se pudo determinar el estado portador por carecer de la muestra del padre.

De las 124 familias sin antecedentes de la enfermedad (casos únicos), se pudo establecer el estado de portadora probable en 10 hermanas (9.26%) (**figura 8**), y se pudo excluir el estado portador en 13 de ellas (12.03%) (**figura 9**). De igual manera, no se pudo determinar el estado portador en 7 hermanas (6.48%) por falta de muestra del padre.

En 4 familias se detectaron eventos mutacionales de *novo*, debido a que había hermanos varones sanos que compartían el mismo alelo del caso índice (**figura 10**).

Es importante señalar que en una familia no hubo concordancia de alelo paterno y se sospechó que se trataba de un caso de no paternidad. Las muestras de esta familia se sometieron a análisis por PCR y PAGE del marcador tipo VNTR denominado D1S80, el cual es altamente polimórfico y es ampliamente utilizado en la asignación y exclusión de paternidad. A través de este estudio se pudo establecer la no paternidad en una hija (**figura 11**).

Finalmente el marcador pERT87.8 Taq I, pudo por sí solo brindar un asesoramiento genético (AG) a 28 familias (16.86%) de las 166 estudiadas.

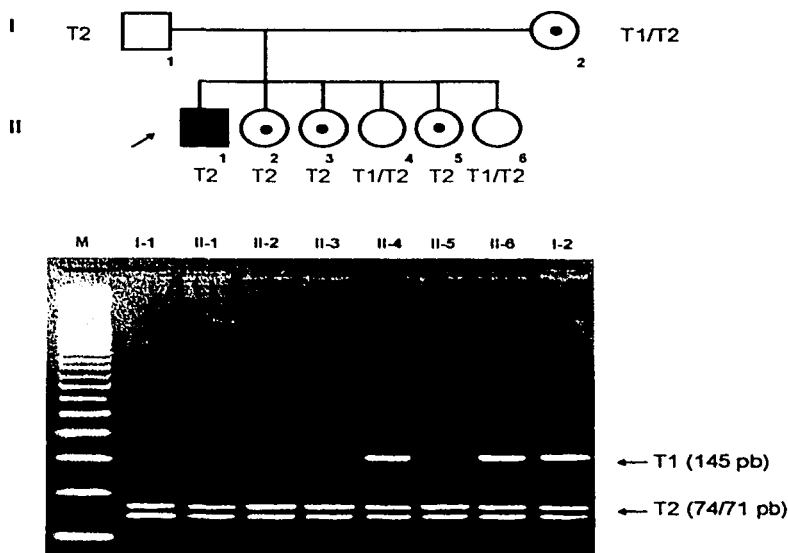


Figura 7. Asignación y exclusión del estado portador en hermanas de un caso índice. Se trata de un caso familiar en el que la madre es portadora obligada informativa (POI) para TaqI. El alelo de riesgo es T2 y fue heredado a tres de las hermanas, lo cual las hace portadoras. Las hermanas heterocigotas T1/T2 heredaron el alelo sano de la madre T1 y el alelo T2 sano del padre, con lo que se emite el diagnóstico de no portadoras.

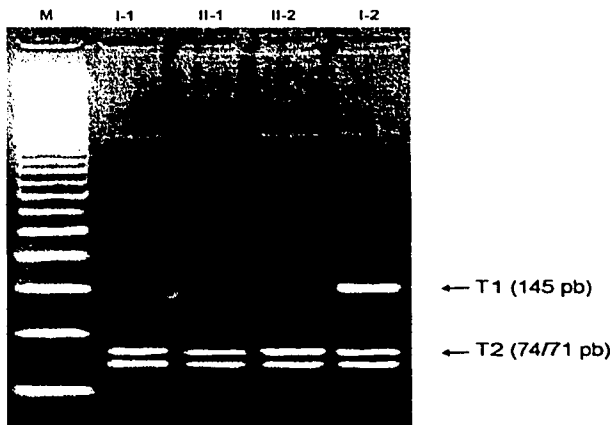
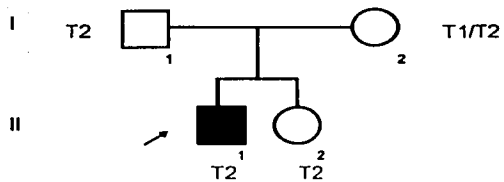


Figura 8. Presencia de alelo de riesgo en hermana. El análisis de TaqI indica que II-2 ha heredado el mismo alelo que esta afectado en II-1 de esta manera II-2 se cataloga como portadora probable.



Figura 9. Exclusión de alelo de riesgo en hermana. En esta familia el análisis de RFLPs fue útil para descartar la presencia de alelo de riesgo T2 en II-1. No se cuenta con antecedentes familiares, pero I-2 es informativa T1/T2. II-2 heredó el alelo sin riesgo T1, por lo que se puede inferir que aunque I-1 fuera portadora, II-2 tiene 90% de posibilidades de no ser portadora del padecimiento.

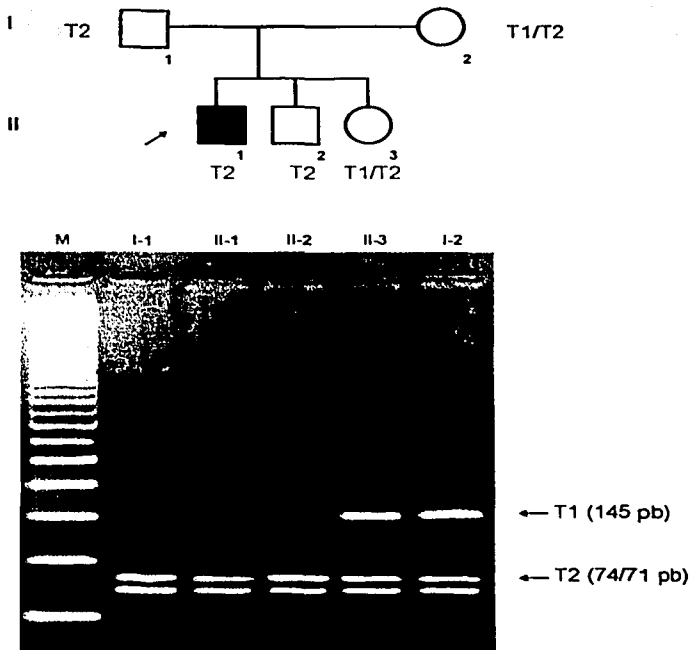


Figura 10. Evento mutacional de novo. Se observa que II-2 heredó el mismo alelo que II-1, lo que indica que el alelo materno no está afectado. En el caso de II-3 se puede excluir el estado de portadora, debido a que el alelo que presenta no es de riesgo. Se trata probablemente de una mutación en la línea germinal.

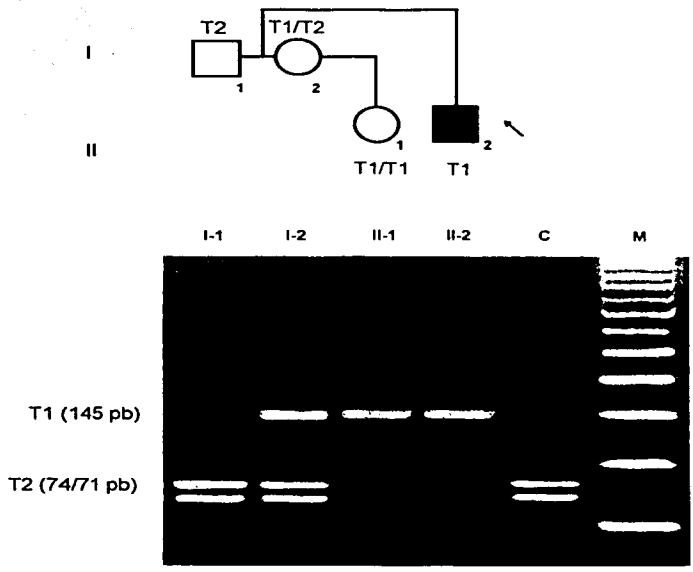


Figura 11. No concordancia de alelo paterno. Se puede observar que II-2 ha heredado el alelo de riesgo T1 de I-2 y II-1 ha heredado un alelo T1 de I-2 y otro alelo que no corresponde a I-1, lo que permite pensar que se trata de un caso de no paternidad.

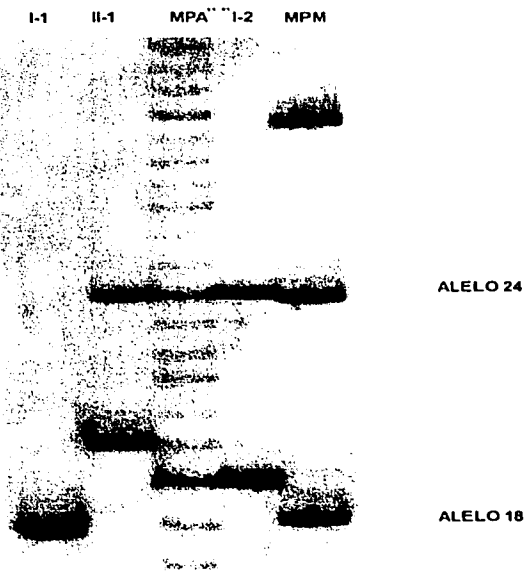


Figura 12. Análisis de no paternidad mediante el marcador DIS80. El análisis permite confirmar que I-1 no es el padre de II-1 puesto que hay inexistencia de los alelos de I-1 en II-1. I-2 alelo materno.

DISCUSIÓN

Las DMD/DMB son enfermedades hereditarias de carácter letal. Desafortunadamente, a pesar de los enormes esfuerzos que se llevan a cabo para su tratamiento, hasta el momento sigue sin existir un tratamiento curativo.^{3,73}

Recientemente se han implementado novedosos métodos terapéuticos, como el trasplante de mioblastos en músculos deficientes en distrofina⁷⁴, la utilización de vectores con capacidad de integrar el gen normal en las células^{75,76}, la inyección del propio gen en tejido muscular,⁷⁷ entre otros. Sin embargo, estas terapias han tenido éxito solo en modelos animales y están aún lejos de llevarse a cabo en humanos.^{3,73}

Por lo anterior la determinación del estado portador sigue siendo una de las estrategias más utilizadas dentro del aspecto preventivo.

Por mucho tiempo, e incluso actualmente en algunas instituciones de 2do. y 3er. nivel, el diagnóstico de madres portadoras, se lleva a cabo tomando en cuenta los niveles de la enzima creatinina fosfocinasa (CPK) y el análisis bayesiano, no obstante estos estudios proporcionan resultados de baja confiabilidad.^{70,71,78}

La aplicación de herramientas moleculares en el estudio de enfermedades hereditarias, como las DMD/DMB, han permitido mejorar notablemente el asesoramiento genético.⁷⁹

Uno de los beneficios inmediatos de los estudios de genética molecular, es la identificación de marcadores genéticos que pueden ser utilizados para la detección de madres portadoras y para diagnóstico prenatal.⁷

Con la clonación del gen DMD, se han logrado identificar secuencias polimórficas tanto dentro como fuera del gen, que han servido como marcadores para la detección de madres portadoras a través de pruebas de ligamiento, debido a que se heredan en forma mendeliana y segregan junto con el gen de interés.^{4,9}

Uno de los intereses principales en nuestro estudio, fue evaluar la eficiencia del marcador polimórfico tipo RFLP pERT87.8/TaqI, como estrategia molecular de tipo indirecto en la detección de madres y hermanas portadoras, para posteriormente poder brindar el asesoramiento genético adecuado a las familias afectadas.

Fue primeramente necesario tomar en cuenta que la madre fuera informativa (heterocigota), segundo que existiera la posibilidad de asignar o excluir el alelo de riesgo en las hijas de madres sin antecedentes familiares y por último la posibilidad de asignar o excluir el alelo mutado en las hermanas de familias con madres portadoras obligadas (PO).

De esta manera, de las 166 madres incluídas en el estudio, 83 fueron informativas (50.0%). Este valor de heterocogocidad se consideró bueno para iniciar el análisis de ligamiento.

Estudios previos, nos permitieron conocer que 42 de las madres incluídas en el estudio eran portadoras obligadas por genealogía (PO) ya que habían tenido al menos un hijo afectado de DMD/DMB y familiares en la misma generación o por rama materna, y el resto 124 estaban en riesgo de haber heredado el gen DMD alterado. Así de las 42 madres (PO), solo 23 fueron informativas y 19 fueron no informativas (PONI). Para estas últimas el estudio no fue de utilidad. Así mismo, de las madres (en riesgo) catalogadas como posibles portadoras, 60 fueron informativas y 64s no lo fueron.

El análisis de ligamiento permitió entonces asignar el estado portador en 10 hermanas con antecedentes familiares y se descartó dicho estado en otras 10.

En 5 hermanas no se pudo determinar el estado de portadora o no portadora, por carecer de la muestra del padre. De haber conocido el alelo paterno se podría haber identificado si el alelo de riesgo estaba siendo heredado efectivamente por la madre y como resultado catalogarlas como portadoras, o el alelo presente correspondía a un alelo paterno no afectado y diagnosticarlas como no portadoras.

En el caso de las familias con casos únicos, el análisis permitió asignar el estado portador en 10 hermanas y excluirlo en otras 13. De igual manera, no se pudo determinar el estado portador o no portador en 7 hermanas por falta de muestra del padre y en una familia por carecer de la muestra del caso índice por fallecimiento.

Finalmente el marcador pudo por sí solo brindar un asesoramiento genético (AG) de certeza en 28 familias de las 166 estudiadas.

De los resultados expuestos anteriormente podemos notar que la eficiencia del marcador para brindar un AG de certeza, fue baja, aún contando con un alto índice de heterocigocidad.

Existen varios factores a considerar con relación a este bajo número de familias beneficiadas. Uno de ellos tiene que ver con el número de madres informativas, ya que como se mencionó anteriormente, de las 166 madres informativas, 83 fueron heterocigotas, en el resto 83 que resultaron ser homocigotas la evaluación del ligamiento no es posible mediante el uso de este marcador.

Utilizar otros marcadores con un alto polimorfismo en las poblaciones, como los VNTRs o las secuencias repetidas en tándem de nucleótidos CA, o los STRs podrían mejorar la eficiencia del asesoramiento genético en nuestro estudio.

Otro factor importante de considerar es la estructura familiar, ya que a pesar de contar con un alto índice de heterocigocidad, en muchas familias el análisis no tuvo relevancia debido a que no existían hijas en las familias en las cuales poder asignar o excluir el alelo de riesgo.

Otro factor limitante en nuestro estudio, fue no contar con varias muestras provenientes de los padres, de hermanos sanos o enfermos, así como con las muestras de algunos casos índice, el análisis de estas muestras aportará mayor información. En algunos casos esta información permitirá determinar el estado portador o no portador en hermanas. A pesar de que en algunos casos se puede inferir que alelo se esta

heredando, en muchos otros es sumamente indispensable conocer con precisión que alelo esta presente en determinados miembros de la familia, para con ello poder emitir un diagnóstico definitivo.

Adicionalmente, el alto número de familias con casos únicos no permite dar un asesoramiento genético certero, sólo es posible estimar un valor de probabilidad. Desafortunadamente en nuestro estudio el número de familias con casos únicos fue muy alto 124 (74.7%), circunstancia que a la vez sugiere un alto número de mutaciones de *novο*, tal como ha sido reportado para la población Hindú y una población mexicana. ¹⁶

Por otra parte, en relación con el AG de certeza, es importante tomar en cuenta que puede existir algún error de predicción debido a la alta frecuencia de recombinación intragénica que presenta el gen DMD. ⁸¹ Aunque para esta región 5' y regiones aledañas ubicadas en dirección centromérica se ha considerado un riesgo de recombinación baja (0.3%),⁸² es importante tenerlo en cuenta, ya que si se presenta un evento de recombinación distante al marcador, el diagnóstico de portadoras podría condicionar falsos negativos y positivos en la asignación o exclusión de portadoras.

En el caso específico de nuestro estudio, no se llevó a cabo alguna prueba para determinar el índice de recombinación, sólo se estimó a partir de otros estudios, sin embargo debió ser un elemento de suma importancia realizar dicha determinación para conocer de manera precisa el error de asignación.

Para disminuir el riesgo de error de asignación debido a la recombinación que presenta el gen, el empleo de al menos dos marcadores informativos distantes entre sí, debe ser incluido en este tipo de estudios. En este caso la posibilidad de un diagnóstico erróneo se reduce de forma significativa.

Para evitar falsos positivos o falsos negativos, la utilización de 3 a 5 marcadores intragénicos que cubran todo el locus, aumentará todavía más la certeza del diagnóstico.

Otro factor que puede provocar error en la predicción del riesgo genético, es el fenómeno de mosaicismo germinal, que puede deberse a mutaciones en la estirpe de las células gonadales, lo que se estima ocurre con una frecuencia del 8-12%.⁸³ Al presentarse mosaicismo germinal el diagnóstico no es de certeza, el riesgo de recurrencia dependerá del número de células germinales con el gen alterado. Este problema se complica en algunas mujeres portadoras, quienes además de mosaicismo germinal presentan mosaicismo somático.⁸⁴

Otro de los factores que pueden intervenir en el establecimiento de un diagnóstico correcto y el consejo genético acertado, es la heterogeneidad genética, esto es que puedan existir dos o más entidades distintas y que sin embargo presenten un cuadro clínico muy similar. En el caso de las DMD/DMB se han detectado niños con la enfermedad que presentan niveles de distrofina en músculo normales y el análisis molecular del gen DMD no revela anomalías, posiblemente la causa de la enfermedad en éstos individuos se deba a un desorden autosómico recesivo raro, como la distrofia muscular de cintura (LGMD), que en varios casos es indistinguible de la DMD.⁸⁵

Además de los factores antes mencionados, existe otro elemento a considerar en el AG de las familias con DMD cuando se emplea el análisis de ligamiento, tal es el caso de la no paternidad en familiares femeninos de primer grado. Esto se menciona debido a que en nuestro estudio fue posible detectar la presencia de un alelo en una hija que no concordaba con el alelo paterno, esta situación nos llevó a pensar en la posibilidad de un caso de no paternidad y mediante el empleo del marcador polimórfico tipo VNTRs, DIS80 (1p36) fue posible determinar la no paternidad en la hermana del caso índice.

De lo anterior podemos hacer evidente que un caso de no paternidad puede condicionar falsos positivos o falsos negativos en la asignación de portadoras, especialmente si no se observa una concordancia de alelo paterno, sin embargo, ya que los RFLPs representan sistemas bialélicos, esta situación puede pasar desapercibida en la mayoría de los casos.

Por otra parte, con relación a las frecuencias alélicas, el alelo más frecuente fue T2 con un valor de 58%. Comparando con las demás poblaciones, la población que se asemeja a la muestra incluida en este estudio es la hindú, las otras poblaciones asiáticas no guardan semejanza con nosotros en este polimorfismo ya que sus distribuciones están invertidas en cuanto frecuencias, T1 es más frecuente. La población caucásica y africana guarda una proporción mayor de T2.⁸²

Evaluar un número tan grande de familias con un solo marcador, no resulta ser de gran utilidad como se ha podido evidenciar, sin embargo, cabe mencionar que este marcador no ha sido estudiado en poblaciones mexicanas, lo cual finca las bases para el estudio de otros marcadores o el empleo de otros métodos de análisis.

Existen muchas limitaciones que impiden dar con 100% de seguridad el AG, sin embargo, la combinación de diferentes técnicas moleculares permitiría asignar el estado portador o no portador en un mayor número de familias, tales técnicas podrían incluir por ejemplo la evaluación de dosis génica mediante MQ-PCR que es una método ampliamente utilizado para indagar en forma directa el estado portador de mujeres emparentadas en casos índices con delección o duplicación en el gen DMD, o el empleo de métodos fluorescentes que son sumamente sensibles, y que en la actualidad se están utilizando ampliamente.⁸⁶

CONCLUSIONES

1. La utilidad del marcador pERT87.8/Taq1 para brindar un asesoramiento genético fue baja a pesar de contar con un índice alto de heterocigocidad.
2. El bajo número de familias beneficiadas, se puede atribuir a la estructura familiar inadecuada para el estudio y a la predominancia de casos únicos.
3. La no paternidad puede condicionar falsos positivos o negativos en la asignación de portadoras, si sólo se analiza un RFLP.

SUGERENCIA

El empleo de un mayor número de marcadores y contar con una estructura familiar idónea, podría incrementar la eficiencia diagnóstica del análisis de ligamiento.

REFERENCIAS

1. Jay V, Vajsar J. **The dystrophy of Duchenne.** Lancet. 2001; 357:550-552.
2. Emery A, (editors) **Duchenne muscular dystrophy.** Chap. 2. 2th. Ed. Oxford University Press. 1993.
3. Scriver ChR, Beaudet AL, Sly WS (editors). **The metabolic and molecular basis of inherited disease. In: The X-linked muscular dystrophies.** Part 19, Chap. 140. (Vol.III). 7th. Ed. McGraw Hill Inc. 1995.
4. Worton RG, Thompson MW. **Genetics of Duchenne muscular dystrophy.** Ann. Rev. Genet. 1988; 22:601-629.
5. Bushby KM. **The muscular dystrophies.** Baillière's Clin. Neurol 1994;3:407-430.
6. Ogasawara A. **Downward shift in IQ in persons with Duchenne muscular dystrophy compared to those with spinal muscular atrophy.** Am. J. Ment. Retard. 1989; 93:544-53.
7. Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint T, Davies KE, Speer A. **Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies.** Br. Med Bull. 1989; 45:654-568.
8. Worton RG, Burghes AH. **Molecular Genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy.** Int. Rev. Neurobiol. 1988; 22:601-12.
9. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener CA, Kunkel LM. **Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD): genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals.** Cell 1987; 50:509-517.

10. Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B. **High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients.** Clin. Genet. 1996; 50:327-31.
11. Alcántara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutiérrez G, Saldaña Y, Maulen I, Lee R, Macías M and Orozco L. **High frequency of *de novo* deletions in mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling.** Clin. Genet. 1999; 55:376-380
12. Mostaccioulo ML, Lombardi A, Cambissa V, Danieli GA, Angelinic. **Population data on benign and severe forms of X linked muscular dystrophy.** Human. Genet. 1987; 75:217-23.
13. Gardner-Medwin D. **Clinical features and classification of the muscular dystrophies.** Br. Med. Bull. 1980; 36: 109-115
14. Bodrug SE, Holden JJA, Ray PN, Worton RG. **Molecular analysis of X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy.** EMBO J. 1991; 10:3931-3939.
15. Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I. **Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy.** Clin. Genet. 1998; 52:102-7.
16. Monaco AP, Kunkel KM. **A giant locus for the Duchenne and Becker muscular dystrophy gene.** 1987; 3(2)33-37.
17. Burmeister M, Monaco AP, Gillard EF, Van Ommen GJB, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Kunkel LM, Lehrach H. **A 10-Megabase map of human Xp21, including the Duchenne muscular dystrophy gene.** Genomics 1988; 2:189-202.

18. Walker A, Hart K, Cole C, Hodgson S, Johnson L, Dubowitz V, Bobrow M. **Linkage studies in Duchenne and Becker muscular dystrophies.** J. Med. Genet. 1986; 23:538-547.
19. Den Dunnen JT. **Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD gene by homologous YAC recombination.** Hum. Mol. Genet. 1992; 12:474-82.
20. Salcedo M, Orozco L. **Genética Molecular de las Distrofias musculares tipo Duchenne y Becker.** Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1992; 49 (2): 115-120.
21. Hoffman EP, Monaco AP, Feener CA, Kunkel LM. **Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans.** Science. 1987; 238:347-350
22. Moser, H. **Duchenne muscular dystrophy: Pathogenic aspects and genetic prevention.** Human Genet. 1984; 66:17-40.
23. Mc Naughton JC, Hughes G, Jones WA, Stuckwell PA, Klamut HJ, Petersen GB. **The evolution of an intron in the human dystrophin gene.** Genomics. 1997; 40:294-304.
24. Gilgenkrantz H, Hugnot JP, Lambert M, Chafey P, Kaplan JC, Kahan A. **Positive and negative regulatory DNA elements including a CCArGG box are involved in the cell type-specific expression of the human muscle dystrophin gene.** J. Biol. Chem. 1992; 267:10823-33.
25. Emery A, (editors). **Neuromuscular Disorders: Clinical and Molecular Genetics.** Chap. 3. Ed. Jhon Wiley and Sons. 1998

26. Rodríguez M, Santiesteban R, González SL, Guerra R, Plascencia M, Carrero M, Montejo Y, Chi D. **Alteraciones en el electroretinograma de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne y su relación con las deleciones del gen responsable de la enfermedad.** Rev. Cubana de Oftalmol. 1999;12(2):129-35.
27. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald-Netter Y. **Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells.** Nature 1990; 344:64-65.
28. Gorecki DC, Monaco AP, Derry JMJ, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. **Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters.** Hum. Mol. Genet. 1992; 1:505-510.
29. Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN. **Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene.** Mol. Cell. Biol. 1990; 10:193-208.
30. Chelly J, Kaplan JC, Maire A, Gautron S, Kahn A. **Transcription of the human dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues.** Nature. 1988; 333: 858-860.
31. Roberts RG. **Dystrophin, its gene, and the dystrophinopathies.** Adv. Genet. 1995; 33: 177-231.
32. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zats M. **Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23 a in DMD.** Am. J. Hum. Genet. 1991; 39:437-434.

33. Uchino M, Terramoto H, Naoe H, Miike T, Yoshioka K, Ando M. **Dystrophin and dystrophin related protein in the central nervous system of normal controls and Duchenne muscular dystrophy.** *Acta Neuropatol.* 1994; 87: 129-134.
34. Ahn AH, Kunkel LM. **The structural and functional diversity of dystrophin.** *Nature Genet.* 1993; 3:283-291.
35. Small JV, Fürst DO, Thurnell LE. **The cytoskeletal lattice of muscle cell.** *Eur. J. Biochem.* 1992; 208: 559-572.
36. Campbell KP. **Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage.** *Cell* 1995; 80:675-679.
37. Hammonds RG. **Protein sequence of DMD gene is related to Actin Binding Domain of α -Actin.** *Cell.* 1987; 51:1
38. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. **The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein.** *Cell.* 1988; 533:219-228.
39. Koenig M, Kunkel LM. **Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility.** *J. Biol. Chem.* 1990; 265:4560-4569.
40. Suzuki A, Yoshida M, Hayashi K, Ozawa E. **Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain in the first half of the carboxy-terminal domain.** *FEBS lett.* 1992; 308: 154-160.
41. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KI. **The emerging family of dystrophin related proteins.** *Trends in Cell Biology.* 1994; 4:19-23.

42. Lindembaum MH, Carbonetto S. **Dystrophin and patterns at the cell surface.** *Curr Biol.* 1993; 3:109-111.
43. Worton RG. **Muscular dystrophies: Diseases of the Dystrophin-glycoprotein complex.** *Science.* 1995; 270:755-756.
44. Hoffman EP, Watkins SC, Slayter HS, Kunkel LM. **Detection of a specific isoform of alpha-actinin with antisera directed against dystrophin.** *J. Cell. Biol.* 1989; 108: 503-510.
45. Kunkel LM, Hoffman EP. **Duchenne/Becker muscular dystrophy: A Short overview of the gene the protein, and current diagnostics.** *Br. Med. Bull.* 1989; 45:630-643.
46. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. **Expression of transforming growth factor-b-1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy.** *Am. J. Pathol.* 1994; 144:221-6.
47. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. **Dystrophin protects the sarcolemma from stress developed during muscle contraction.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 3710-14.
48. Banerjee M, Verma IC. **Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene?.** *Am. J. Med. Genet.* 1997; 68:152-7.
49. Tuffrey S, Chambert S, Bareil C, Sarda P, Coubes C, Echenne B, Demaille J, Clausters M. **Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test.** *Hum. Genet.* 1998; 102:334-342.

50. McCabe ERB, Towbin J, Chamberlain JS, Baumbach LA, Selzer WK, Ommen GJB, Kunkel LM, Witkowski J. **cDNA probes for the Duchenne muscular dystrophy locus demonstrate a previous undetectable deletion in a patient with dystrophic myopathy, glycerol kinase deficiency and congenital adrenal hypoplasia.** J. Clin. Invest. 1989; 83:95-99.
51. Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies K. **Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies.** Nature. 1987; 329:638-642.
52. Oudet C, Hanaver A, Clemens P, Caskey CT, Mandel JL. **Two hot spots of recombination in the DMD gene correlates with the deletions prone regions.** Human. Mol. Genet. 1992; 1:599-603.
53. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blondin LAJ. **Topology of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 1115 deletions and duplications.** Am. J. Hum. Genet. 1989; 45: 835-847.
54. Hu X, Burghes AHM, Ray PN, Thompson MW, Murohy EG, Worton RG. **Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophy.** J. Med. Genet. 1988; 25:369-376.
55. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. **Point mutations in the dystrophin gene.** Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 1992; 89:2331-7.
56. Grompe M. **The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids.** Nature Genet. 1993; 5:111-117.

57. Todorova A, Danieli GA. **Large majority of single-nucleotide mutations along the dystrophin gene can be explained by more than one mechanism of mutagenesis.** Hum. Mut. 1997; 9:537-547.
58. Prior TW, Bartolo C, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AH, Mendell JR. **Nonsense mutations in a Becker muscular dystrophy and an intermediate patient.** Hum. Mut. 1996; 7:72-75.
59. Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. **Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy.** J. Clin. Invest. 1993; 91:1862-1867
60. Gilgenkrantz H, Chelly J, Lambert M, Recan D, Barbot JC, Van Omen GJB, Kaplan JC. **Analysis of molecular deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies.** Genomics. 1989; 5:574-580.
61. Winnard AV, Klein ChJ, Coovert DD, Prior T, Papp A, Snyder P, Bulman DE, Ray PN, McAndrew P, King W, Moxley RT, Mendell JR, Burghes AHM. **Characterization of translational frame exception patients in Duchenne/Becker muscular dystrophy.**
62. Saiki RH. **PCR protocols A guide to methods and applications** 1990.
63. Kunkel LM, Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett D. **Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular Dystrophy.** Nature. 1986; 322:73-85.

64. Cross GS, Speer A, Rosenthal A, Forrest SM, Smith TJ, Edwards Y, Flint T, Hill D, Davies KE. **Deletions on fetal and adult muscle cDNA in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients.** EMBO J. 1987; 6:32777-83.
65. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. **Detection of 98% DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction.** Hum. Genet. 1990;86:45-48.
66. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PNN, Caskey CT. **Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification.** Nucl. Acids Res. 1988; 23:11141-11156.
67. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (editors) **PCR Potocols: A guide to methods and applications. In optimization of PCRs ; Amplification of genomic DNA; thermostable DNA polymerases; procedures to minimize PCR-product carry-over, sample preparation from blood, cells and other fluids; multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular Dystrophy; basic equipment and supplies.** Academic Press, orlando FL, 1990.
68. Perry TB, Fraser FC. **Variability of serum creatine phosphokinase activity in normal women and carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy.** Neurology. 1973; 223:1316-23.
69. Gruemer HD, Miller GM, Chinchill VM, Leshner TR, Blasco AP, Hassler CR, Nance WE. **Prediction of carrier status in Duchenne dystrophy by creatine kinasa measurement.** Am. J. Clin. Pathol. 1985;84: 655-658.

70. Hodgson SV, Bobrown M. **Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy.** Br. Med. Bull. 1989; 45:719-744.
71. Pegoraro E, Schimke RN, Garcia C, Stern H, Cadaldini M, Angelini C, Barbosa E, Carroll J, Marks WA, Neville HE, Marks H, Appleton S, Toriello H, Wessel HB, Donnelly J, Johnson PC, Taber JW, Weiss L, Hoffman EP. **Genetic and biochemical normalization in female carriers of Duchenne muscular dystrophy: evidence for failure of dystrophin production in dystrophin-competent myonuclei.** Neurology 1995; 45:677-690.
72. Laing NG. **Molecular genetics and genetic counselling for Duchenne/Becker muscular dystrophy.** Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser. 1993; 3:37-84.
73. Engel AG. **Gene therapy for Duchenne dystrophy.** Annals neurol. 1993; 34 (1): 3-4.
74. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. **Conversion of mdx myofibre from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblast.** Nature. 1989; 337: 176-178.
75. Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkrants H, Couton D, Cartud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaude M y Kahan. **Efficient adenovirus mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice.** Nature. 1993; 361: 647-650.
76. Rajendra KS, Chamberlain JS. **Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 Kb dystrophin cDNA to muscle cells.** Hum. Mol. Genet. 1996; 5(7): 913-921.

77. Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walash FS, Gurusinghe A, Wolff JA, Davies KE. **Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs.** *Nature.* 1991; 352:815-818.
78. Álvarez LM, Ortiz JDM, Narro JA, Solís AJG, Morales AA. **Evaluación de la actividad de la creatininafosfocinasa (CPK) para la detección de portadoras de distrofia muscular tipo Duchenne en familias de la ciudad de Monterrey, México.** *Rev. Invest. Clin.* 1990; 42:39-45.
79. Laing NG. **Molecular genetics and genetic counselling for Duchenne/Becker muscular dystrophy.** *Mol. Cell. Biol. Hum. Dis. Ser.* 1993; 3:37-84.
80. Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B. **High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular Dystrophy patients.** *Clin. Genet.* 1996; 50:327-31.
81. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley Dr, Bobrow M. **Accurate assesment of intragenic recombination frequency within the duchenne muscular distrophy gene.** *Genomics.* 1990; 7:602-606.
82. Alcántara Ortigoza MA. 1998. **Estudio molecular de las distrofias musculares tipos Duchenne y Becker.** Tesis Maestría (Maestría en ciencias Biología), Facultad de Ciencias UNAM. pp 107.
83. Bakker E, Van Broeckhoren, Bonten EJ, Van de Vooren MJ, Veenema H, Van Hul W, Van Ommen GJB, Vandemberghe A, Pearson PL. **Germiline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations.** *Nature.* 1987; 329:554-556.

84. Bunyan DJ, Robinson DO, Collins AL, Cockwell AE, Bullman HMS, Whittaker PA. **Germiline and somatic mosaicism in a female carrier of Duchenne muscular dystrophy.** Human genet. 1994; 93:541-544.
85. Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, Nonaka MD, Sugita H, Arahata MD. **The frequency of patients with dystrophyn abnormalities in a limb-girdle patient population.** Neurology 1991; 41:1491-1496.
86. Schwartz LS, Tarleton J, Popovich B, seller WK, Hoffman EP. **Fluorescent Multiplex Linkage Analysis and Carrier detectin for Duchenne/Becker muscular dystrophy.** Am. J. Hum Genet. 1992; 51:721-729.